



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

**PERFIL CITOPATOLÓGICO DE PACIENTES ATENDIDAS NA CASA DA  
MULHER E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO CAURENOICO CONTRA  
LINHAGENS DE CÂNCER CERVICAL**

SILVIA MARIA MACHADO DA ROCHA

BELÉM-PA

2018

SILVIA MARIA MACHADO DA ROCHA

**PERFIL CITOPATOLÓGICO DE PACIENTES ATENDIDAS NA CASA DA  
MULHER E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO CAURENOICO CONTRA  
LINHAGENS DE CÂNCER CERVICAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha

BELÉM-PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- R672p Rocha, Sílvia Maria Machado da  
Perfil citopatológico de pacientes atendidas na Casa da Mulher e avaliação da atividade do ácido caurenóico contra linhagens de câncer cervical / Sílvia Maria Machado da Rocha. — 2018  
64 f. : il. color
- Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia celular (PPGNBC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.  
Orientação: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia  
Coorientação: Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha.
1. Papilomavírus Humano. 2. Ácido Caurenóico. 3. Câncer Cervical. 4. Citopatologia. I. Bahia, Marcelo de Oliveira, *orient.* II. Título
- 

CDD 571.6

**SILVIA MARIA MACHADO DA ROCHA**

**PERFIL CITOPATOLÓGICO DE PACIENTES ATENDIDAS NA CASA DA  
MULHER E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÁCIDO CAURENOICO CONTRA  
LINHAGENS DE CÂNCER CERVICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Apresentação e aprovação em 28/02/2018

Banca Examinadora:

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia

**Universidade Federal do Pará – UFPA**

**Avaliador:** Prof. Dr. Leopoldo Silva de Moraes

**Faculdade Metropolitana da Amazônia – FAMAZ**

**Avaliador:** Prof. Dr. Moisés Hamoy

**Universidade Federal do Pará – UFPA**

BELÉM-PA

2018

Aos meus pais (*in memoriam*), minha eterna gratidão pela educação e ensinamentos de vida. Pelo exemplo de família, e que com muito amor, estímulo aos estudos e carinho, forneceram toda a base necessária para que pudesse chegar até aqui;

À minha filha, Juliana, razão da minha existência;

À minha família, por toda força e incentivo.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele nada é possível. E, em cada adversidade, me deu forças para continuar e colocou pessoas em minha frente que me apoiaram e me deram sustentação para seguir adiante.

Ao meu amado irmão Carlos Rocha, exemplo de profissional e ser humano, que forneceu todo amparo que necessitei para ingressar, cursar e concluir este curso, sempre incentivando e buscando me direcionar na aquisição de conhecimentos indispensáveis para a execução desse trabalho. Mano, nada disso seria possível sem ti. Muito obrigada!

Aos meus familiares pelas orações, incentivo e escuta, para que eu conseguisse vencer as dificuldades. Em especial à minha querida irmã Simone Rocha, pelas contribuições ao longo das disciplinas, estudando comigo, ajudando nas atividades, conseguindo fazer com que eu ultrapassasse um período bem difícil aonde quase fraquejei; e ao meu sobrinho Danilo Machado, pela extrema prontidão em ajudar a concluir esse trabalho. Obrigada!

Ao professor Marcelo de Oliveira Bahia, por aceitar ser meu orientador, mostrando-se sempre disponível e dinâmico.

Ao professor Rommel Rodriguez Burbano, pela colaboração na execução do estudo, fundamental para o desenvolvimento da pesquisa.

À equipe do Laboratório de Citogenética Humana do ICB/UFPA, pela grande colaboração na fase de execução dos experimentos da pesquisa.

Aos colegas de mestrado, pelos momentos e conhecimentos partilhados, em especial à minha amiga e companheira de estudos, Lorena Gomes, que acompanhou cada momento de conquista, e de adversidade, oferecendo sempre apoio e se mostrando colaborativa. Saibas que tornaste menos difícil o dia-a-dia.

Aos professores do Programa, que muito me ensinaram ao longo desses anos.

À equipe da secretaria da Pós-graduação, sempre ajudando a resolver os problemas que surgiram ao longo desse tempo.

Aos meus colegas de trabalho, da Casa da Mulher e do IONPA, que torceram por mim e incentivaram minha caminhada.

Às minhas amigas Nalia Gomes e Kátia Tojal, que sempre me impulsionaram a seguir em frente, sempre exaltando minha capacidade e estimulando a buscar meus objetivos e conquistar novos espaços.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Para todas as grandes coisas exigem-se lutas penosas e um preço muito alto. A única derrota da vida é a fuga diante das dificuldades. O homem que morre lutando é um vencedor.

Pe. Tiago Alberione (Fundador das Irmãs Paulinas)

## RESUMO

SILVIA, M. R. **Perfil citopatológico de pacientes atendidas na casa da mulher e avaliação da atividade do ácido caurenoico contra linhagens de câncer cervical.** 2018-64f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

O câncer do colo do útero (CCU), de grande importância para saúde pública, sendo considerado o 4º tipo de câncer que mais acomete mulheres no mundo, possui como principal fator de risco infecções por papilomavírus humanos (HPVs). Aproximadamente 70% de mulheres com câncer de colo de útero encontram-se em regiões menos desenvolvidas, o que demonstra uma relação socioeconômica. Os papilomavírus pertencem à família Papillomaviridae, que abrangem mais de 40 gêneros, dos quais cinco são compostos de HPVs, com pelo menos 200 espécies já descritas associadas a infecções humanas. Estes vírus são envelopados, esféricos e possuem como genoma DNA de fita dupla. Os HPVs possuem tropismo por células epiteliais e infecções persistentes podem levar a transformações intraepiteliais progressivas com evolução para lesões precursoras do câncer cervical, e por fim câncer. A infecção por HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum em todo o mundo e a maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terá contato com o vírus durante algum momento da vida. No presente estudo foram analisados o perfil citopatológico de pacientes atendidas em uma Unidade de Referência Secundária em Câncer Ginecológico do município de Belém/PA e a atividade do ácido caurenoico contra linhagens de câncer cervical. Para tanto houve a identificação do perfil dos achados microbiológicos e citopatológicos nos exames realizados pelo laboratório da Casa da Mulher, durante o período de um ano, sendo utilizados dados de 2.202 exames preventivos de câncer de colo de útero (PCCU), apresentando fraca correlação entre faixa etária e frequência de achados microbiológicos e alterações patológicas. Já os achados microbiológicos, apresentaram a presença de três espécies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida* sp. (12,44%) e *Trichomonas vaginalis* (0,68%). A prevalência de anormalidades citológicas correspondeu a 5,72%. As atipias celulares de significado indeterminado a 2,679%, e a proporção total das lesões neoplásicas potencialmente malignas foi de 1,09%. O aumento da cobertura de PCCU na população feminina precisa ser alcançado e a promoção da saúde deve ser efetivada por meio de parcerias intersetoriais, participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida. Já a avaliação do efeito genotóxico e mutagênico do ácido caurenoico (AC) em linhagens de câncer cervical foi realizada com a utilização de linhagens HeLa (HPV18-positivo), CaSki (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo), sendo que o AC mostrou forte correlação positiva com os indicadores de genotoxicidade avaliados. Em concentrações elevadas, inibiu a expressão dos genes E6 e E7 de HPV, que interferem na regulação do ciclo celular. E, mesmo sendo observados efeitos genotóxicos, os ensaios apontaram para possibilidade do uso do AC como matéria-prima de agentes terapêuticos para câncer cervical com presença de HPV, assim como em pesquisas futuras sobre as funções de E6 e E7.

Palavras chave: Papilomavírus humano. Ácido Caurenoico. Câncer Cervical. Citopatologia.



## ABSTRACT

ROCHA, S. M. **Cytopathological profile of patients attended at the woman's home and evaluation of caurenoic acid activity against cervical cancer strains.** 2018-64p. Masters dissertation. Federal University of Pará, Belém, 2018.

Cervical cancer (CC), which is of great importance for public health, is considered to be the 4th most common type of cancer in the world. Human papillomavirus (HPV) infections are the main risk factor. Approximately 70% of women with CC are in less developed regions, demonstrating a socioeconomic relationship. Papillomavirus belong to the family Papillomaviridae, with more than 40 genera, of which five are composed of HPVs, with at least 200 species already described associated with human infections. These virus are enveloped, spherical and have a double-stranded DNA genome. HPVs have tropism by epithelial cells and persistent infections can lead to progressive intraepithelial transformations with evolution to precursor lesions of cervical cancer, and finally cancer. HPV infection is the most common sexually transmitted infection in the world, and most sexually active people, men and women, will have contact with the virus at some point in their lives. In the present study, the cytopathological profile of patients treated at a Secondary Reference Unit in Gynecological Cancer of the city of Belém / PA and the activity of caurenoic acid against cervical cancer lines were analyzed. The profile of the microbiological and cytopathological findings was verified in the examinations carried out by the Casa da Mulher laboratory during a period of one year, using data from 2,202 cervical cancer preventive exams (PCCU), showing a weak correlation between age range and frequency of microbiological findings and pathological alterations. The microbiological findings were the presence of three species: *Gardnerella vaginalis* (23.48%), *Candida* sp. (12.44%) and *Trichomonas vaginalis* (0.68%). The prevalence of cytologic abnormalities corresponded to 5.72%. Atypia cells of undetermined significance corresponded to 2.679%, and the total proportion of potentially malignant neoplastic lesions was 1.09%. The increase in PCCU coverage in the female population needs to be achieved and health promotion must be effected through intersectoral partnerships, popular participation, and collective accountability for quality of life. On the other hand, the evaluation of the genotoxic and mutagenic effect of caurenoic acid (CA) in cervical cancer lines was performed using HeLa (HPV18-positive), CaSki (HPV16-positive) and C33A (HPV-negative). AC showed a strong positive correlation with the genotoxicity indicators evaluated. At high concentrations, it inhibited the expression of E6 and E7 HPV genes, which interfere with cell cycle regulation. Although genotoxic effects were observed, the assays pointed to the possibility of using CA as feedstock for therapeutic agents against cervical cancer with HPV, as well as future research on E6 and E7 functions.

Key words: Human papillomavirus. Caurenoic acid. Cervical cancer. Cytopathology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1: Ilustração mostrando a aparência externa do HPV.....	16
Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV.....	17
Figura 3: Modelo de atuação das proteínas E6 e E7 do HPV sobre proteínas da célula.....	18
Figura 4: História natural do câncer cervical, relacionando incidências de infecção pelo HPV, lesões pré-cancerosas e câncer. ....	20

### ARTIGO II

Figura 1: Efeitos genotóxicos do ácido caurenico nas linhagens HeLa, CaSki e C33A.....	45
Figura 2: Efeito do ácido caurenico sobre a expressão dos oncogenes HPV E6 e E7 nas linhagens HeLa e CaSki de câncer cervical.....	48

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

Tabela 1: Frequência dos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, no Estado do Pará, de setembro de 2012 a agosto de 2013, e frequência de mulheres que responderam nunca ter realizado o PCCU, por faixa etária.....	31
Tabela 2: Frequências das alterações citológicas encontradas nos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, de setembro de 2012 a agosto de 2013.....	31

### ARTIGO II

Tabela 1: Resumo dos alvos e referências dos oito genes no estudo de transcrição.....	41
Tabela 2: Lista de primers utilizados para a análise de expressão dos genes HPV E6 e E7 por RT-PCR.....	42
Tabela 3: Efeitos genotóxicos do ácido caurenico sobre células das linhagens HeLa, CaSki e C33A de câncer cervical.....	43
Tabela 4: Correlação entre a concentração de ácido caurenico e os efeitos genotóxicos.....	44
Tabela 5: Correlação entre a concentração de ácido caurenico e transcrição gênica. A estatística foi calculada a partir das médias de valores da quantificação relativa de expressão gênica nas células de câncer cervical HeLa e CaSki em relação à linhagem C33A.....	46

### ANEXO

Tabela 1. Distribuição dos exames citopatológicos, por faixa etária, a partir de informações registradas nos livros de controle de PCCU (2012 e 2013) da Casa da Mulher.....	58
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CAF – Cirurgia de Alta Frequência

CASA – Centro de Atenção em Saúde

CCU – Câncer do Colo do Útero

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HOL – Hospital Ophir Loyola

HPV – Papilomavírus Humano

HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau

IARC - International Agency for Research on Cancer

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

LSIL- Lesão Intraepitelial de Baixo Grau

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCCU – Preventivo do Câncer do Colo do Útero

PNI – Programa Nacional de Imunizações

SESMA – Secretaria Municipal de Saúde de Belém

TAG/OPAS – Grupo Técnico Assessor de Imunizações da Organização Pan-Americana de Saúde

WHO – World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>I.1</b>	<b>CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: EPIDEMIOLOGIA.....</b>	<b>14</b>
<b>I.2</b>	<b>PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....</b>	<b>16</b>
<b>I.3</b>	<b>LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO.....</b>	<b>18</b>
<b>I.4</b>	<b>EXAME CITOPATOLÓGICO – TESTE PAPANICOLAU.....</b>	<b>21</b>
<b>I.5</b>	<b>CASA DA MULHER.....</b>	<b>23</b>
<b>I.6</b>	<b>ÁCIDO CAURENOICO.....</b>	<b>24</b>
<b>II.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
<b>II.1</b>	<b>OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>26</b>
<b>II.2.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>26</b>
<b>III.</b>	<b>ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>III.1</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>27</b>
<b>III.2</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>35</b>
<b>IV.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>51</b>
<b>V.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>VI.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: EPIDEMIOLOGIA**

O câncer do colo do útero (CCU) é considerado um importante problema de saúde pública. Foi estimada a ocorrência de 527 mil casos novos no mundo, em 2012, configurando, assim, o quarto tipo de câncer mais comum na população feminina. Cerca de 70% dos casos diagnosticados ocorrem em regiões menos desenvolvidas e, quase um quinto ocorre na Índia. A taxa de incidência vem diminuindo, ao longo das últimas três décadas, na maioria dos países em processo de transição socioeconômica. Tal fato reflete, principalmente, as implementações de programas de prevenção. Geralmente a doença começa a partir dos 30 anos e seu risco aumenta rapidamente até atingir as faixas acima de 50 anos (WHO, 2017).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o biênio 2016/2017, no Brasil, são esperados por ano 16.340 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este é o tipo de câncer mais incidente na Região Norte (23,97/100 mil). Nas Regiões Centro-Oeste (20,72/100 mil) e Nordeste (19,49/100 mil), ocupa a segunda posição; na Região Sudeste (11,30/100 mil), a terceira; e, na Região Sul (15,17 /100 mil), a quarta posição (INCA, 2015).

De acordo com a última estimativa mundial, essa neoplasia foi responsável por cerca de 265 mil óbitos em mulheres em 2012, sendo que 87% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento. A última informação para mortalidade no Brasil aponta para 5.430 mortes de mulheres por este tipo de câncer, em 2013. A sobrevivência em cinco anos obteve melhora ao longo dos anos, variando de menos de 50% para mais de 70% em todo o mundo, de uma forma geral. No Brasil, para o período de 2005 a 2009, ficou em torno de 61% (INCA, 2015).

O principal fator de risco para este câncer é a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Infecções persistentes por HPV podem levar a transformações intraepiteliais progressivas que podem evoluir para lesões precursoras do câncer cervical, as quais, se não diagnosticadas e tratadas adequadamente, evoluem para o câncer. A infecção por HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum em todo o mundo e a maioria das pessoas sexualmente ativas, homens e mulheres, terá contato com o vírus durante algum momento da vida (BORGES et al., 2004).

Aproximadamente 291 milhões de mulheres no mundo apresentam infecção por HPV em algum período da vida, correspondendo a uma prevalência de 10,4%. Entretanto, mais de 90% dessas novas infecções regridem espontaneamente em seis a dezoito meses. Existem hoje

12 tipos de HPV reconhecidos como oncogênicos pela International Agency for Research on Cancer (IARC). Desses, os mais comuns são o HPV16 e o HPV18 (INCA, 2015). Já foram identificados mais de 200 genótipos diferentes de HPV, estando este vírus presente em mais de 90% dos casos de Câncer Cervical.

A frequência da infecção por HPV declina com o aumento da idade em mulheres com citologia oncótica normal (NOMELINI et al., 2007). O tabagismo, particularmente, pode ser considerado fator independente relacionado a lesões cervicais precursoras e câncer invasivo (BOSCH et al., 1992; SARDANA et al., 1994; MURTA et al., 1998; DERCHAIN et al., 1999; MUÑOZ et al., 2001). Pacientes que apresentam apenas alterações citológicas por HPV mostram um percentual de regressão de aproximadamente 85% (MITCHELL et al., 1986; MURTA et al., 1999).

Com relação aos agentes sexualmente transmissíveis, o HPV é considerado um importante fator na oncogênese cervical, porém outros carcinógenos, o estado imunológico do indivíduo, a nutrição e inúmeros outros fatores ditam se a infecção continua subclínica (latente), transforma-se em um pré-câncer ou acaba progredindo para um câncer (CRUM, 1996). Segundo Weinberg (2008), os 5% da mortalidade mundial por câncer a partir de carcinomas cervicais são muito atribuídos a infecções por HPV.

A infecção genital por HPV se inicia com a penetração do vírus na superfície do colo uterino, induzindo uma resposta celular local e sistêmica. A resposta celular local vai refletir a capacidade de atuação das células de Langerhans, como primeira linha de defesa (RAMA et al., 2006). Já a resposta sorológica pode significar apenas a presença do vírus como infecção transitória ou recém-adquirida (COURSAGET, 2003).

O tabagismo diminui significativamente a quantidade e função das células de Langerhans, células apresentadoras de antígenos e que são responsáveis pela ativação da imunidade celular local contra o HPV. Fatores que levam à supressão ou abolição da imunidade celular, como o uso de drogas citotóxicas em transplantados, imunodeficiências inatas ou adquiridas como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), aumentam a capacidade do HPV de persistir no indivíduo (PEREYRA & PARELLADA, 2003).

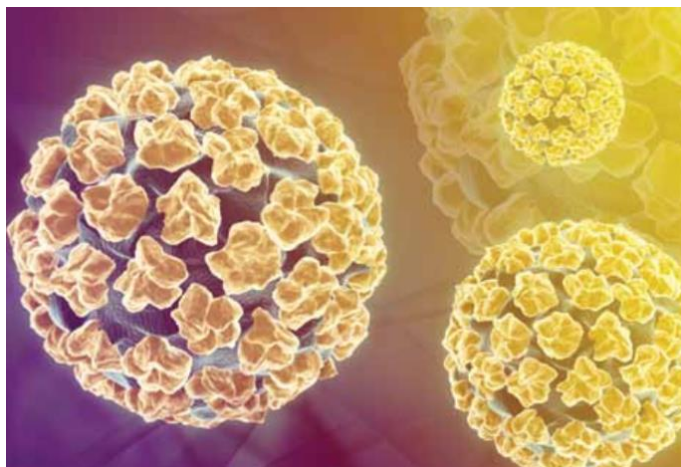
Em uma revisão sistemática, Ayres e Silva (2010) constataram que os estudos de prevalência de infecção pelo HPV publicados no Brasil, em sua maioria, analisam dados de mulheres que procuraram serviços de saúde para rastreamento ou tratamento. Muitos apresentam dados exclusivamente de mulheres com resultados de exame citopatológico

alterados. Além disso, os achados não são analisados em conjunto, dificultando a compreensão da distribuição dessa infecção a partir do que está disponível na literatura especializada.

Sousa et al. (2011) avaliaram o perfil dos exames citológicos do colo do útero realizados no Laboratório Central do Estado do Pará no ano de 2008. A frequência encontrada para alterações citológicas sugestivas de câncer invasor está entre as maiores relatadas pela literatura brasileira em demanda proveniente dos serviços de atenção primária à saúde, além de apresentar-se mais elevada nas mulheres que nunca haviam realizado o PCCU (Preventivo de câncer de colo uterino). Este indicador pode estar evidenciando uma falha de cobertura na prevenção do câncer de colo do útero no Estado do Pará.

## I.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Segundo o comitê internacional de taxinomia viral (*International Committee on Taxonomy of Viruse*) os HPVs pertencem à família *Papillomaviridae* (ICTVdB, 2016). São vírus não envelopados de simetria icosaédrica (**Figura 1**), com capsídeo composto por 72 capsômeros e um genoma de DNA dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases (MUÑOZ et al., 2006; GARCIA et al., 2009).



**Figura 1:** Ilustração mostrando a aparência externa do HPV.

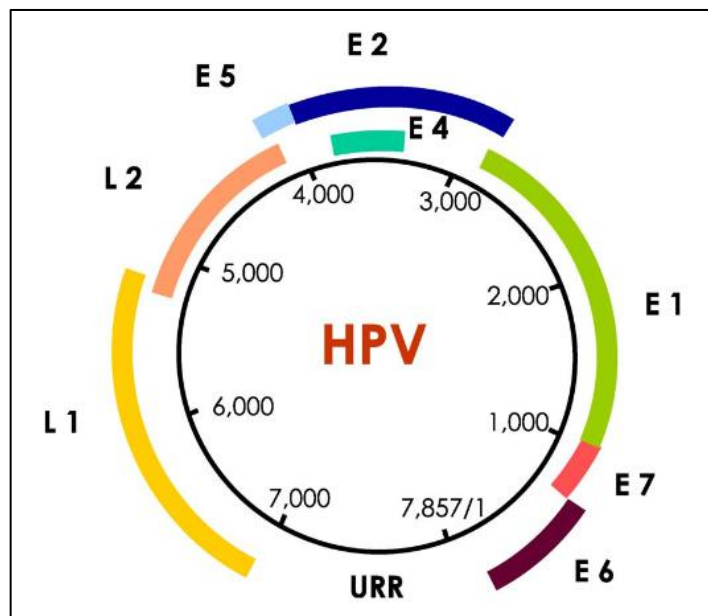
Fonte: Instituto do HPV. <<http://www.incthpv.org.br>> (Acesso em 18 Set 2007).

Cerca de 40 tipos de HPV já identificados infectam o trato genital feminino (GARCIA et al., 2009). Os tipos de HPV são classificados entre vírus de alto ou baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas à transformação neoplásica (DE VILLIERS et al., 2004). O risco oncogênico do vírus está diretamente relacionado ao comportamento de seu genoma no núcleo da célula hospedeira. HPVs de baixo risco oncogênico tendem a manter o seu DNA íntegro, circular e episomal, diferente dos HPVs de alto risco oncogênico, cujas



fitas de DNA circular se abrem, sofrem deleções e se integram ao genoma da célula hospedeira (MUÑOZ et al., 2006; SCHEURER et al., 2005).

O genoma do HPV (**Figura 2**) possui oito partes conhecidas como fases de leitura aberta (Open Reading Frames) e uma região não-codificadora. As fases de leitura aberta possuem uma região com genes que se expressam precocemente (*Early region*), composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, e outra com genes que se expressam tardiamente (*Late region*), composta pelos genes L1 e L2). Somando-se a isso, o genoma é dotado de uma região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*), variando de 400 a 1000 pares de bases, localizadas entre as regiões L1 e E6 (BURD, 2003; MUÑOZ et al., 2006).



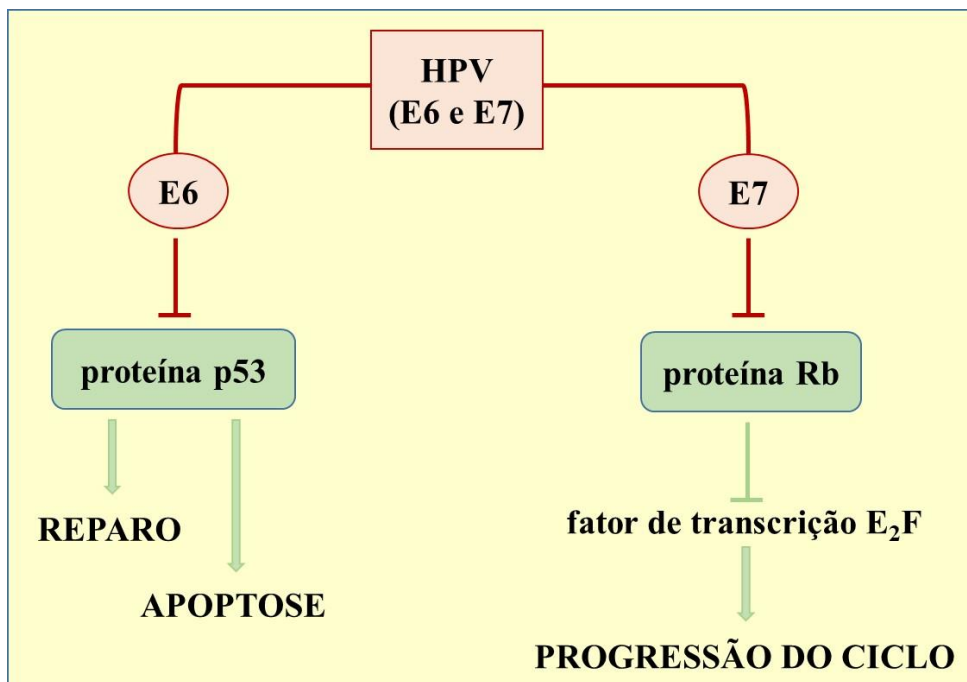
**Figura 2:** Representação esquemática do genoma do HPV

Fonte: Muñoz et al. (2006).

Os genes E1 e E2 codificam proteínas que são vitais para a replicação do DNA viral e controle da transcrição gênica do vírus. O gene E4 codifica uma proteína E4 estrutural que tem um papel importante na alteração da matriz intracelular (citoesqueleto), maturação e liberação das novas partículas virais. A função do gene E5 não é bem conhecida, mas provavelmente codifica uma proteína com atividade fraca na transformação celular. As proteínas E6 e E7 são importantes para a amplificação do genoma viral. As regiões tardias L1 e L2 codificam as proteínas virais dos capsídeos durante os últimos estágios da replicação dos vírus, sendo mais expressas nas células que apresentam grande expressão de E4 (MUÑOZ et al., 2006; SCHEURER et al., 2005). Na maioria das infecções há controle pela resposta imune celular.

Somente em aproximadamente metade dos expostos há soroconversão (ALMONTE et al., 2010).

O ciclo é iniciado quando as partículas infecciosas atingem a camada basal do epitélio, havendo integração do genoma viral com o genoma humano. Com a integração, o vírus perde parte de seu principal gene de regulação, o E2, levando ao aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7, que conduzirão à imortalização celular. A proteína E6 do HPV16, por exemplo, inibe a proteína p53 celular (proteína supressora de tumor, que nas células saudáveis é ativada por danos na dupla hélice e auxilia no reparo de DNA e indução à apoptose – a morte celular programada (**Figura 3**) e assim pode contribuir para a transformação maligna. A proteína E7 viral pode ligar-se a outra proteína supressora de tumor, a pRb (proteína de retinoblastoma, que em células saudáveis é um controlador negativo do ciclo celular em G1 ao manter-se ligada a fatores de transcrição E<sub>2</sub>F), causando um estímulo mitogênico, com multiplicação desordenada e manutenção de células mutadas. De certa forma, o HPV induz o câncer ao limitar a capacidade imune do organismo humano à infecção (PASSOS et al., 2008; ROCHA, 2013).



**Figura 3:** Modelo de atuação das proteínas E6 e E7 do HPV sobre proteínas da célula.

### I.3 LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO

Vários estudos mostram que a infecção pelo vírus HPV precede o desenvolvimento de lesões malignas, e tem sido associada a lesões precursoras de câncer cervical (PINTO, TULIO e CRUZ, 2002; THOMISON, THOMAS e SHROYER, 2008). Essas lesões precursoras são

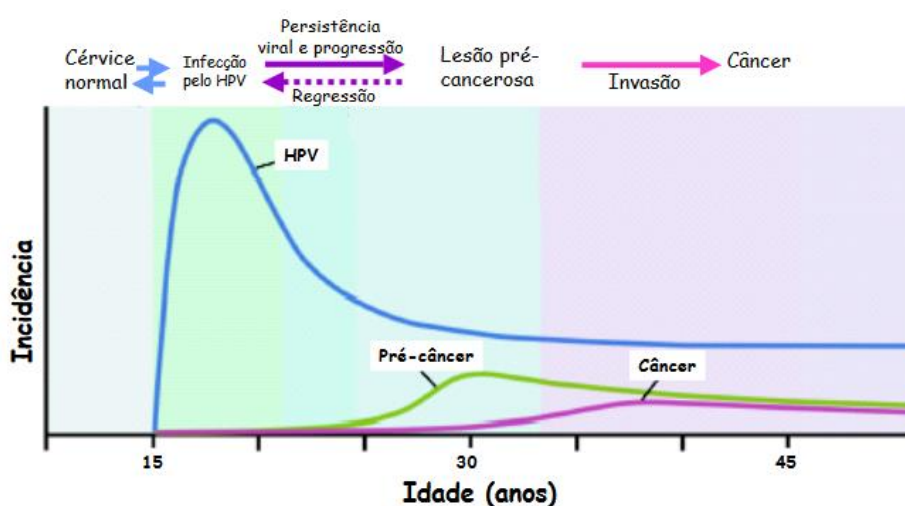
entendidas como alterações cervicais pré-malignas, que constituem uma série de modificações no epitélio original e, quando não tratadas, podem evoluir para o câncer do colo do útero (MEDEIROS et al., 2005).

As lesões apresentam-se em diferentes graus evolutivos, do ponto de vista citohistopatológico, sendo classificadas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de graus I (lesões de baixo grau), II e III (lesões de alto grau), mas são curáveis em até 100% dos casos quando tratadas precoce e adequadamente. Quando o rastreamento é realizado dentro de padrões de qualidade, apresenta uma cobertura de 80% para o câncer invasor e, se as lesões iniciais são tratadas, a redução da taxa de câncer cervical invasor pode chegar a 90% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Foi adotada a terminologia “lesão intraepitelial” em substituição ao termo neoplasia, além de estabelecer dois níveis (baixo e alto graus), separando as lesões com potencial morfológico de progressão para neoplasia maligna daquelas mais relacionadas com o efeito citopático viral, com potencial regressivo ou de persistência. Foi incluída ainda a possibilidade diagnóstica de suspeição de microinvasão. Recomendando-se enfaticamente que seja evitado o uso de outras nomenclaturas e classificações, além das aqui já contempladas, evitando-se a perpetuação de termos eventualmente já abolidos ou em desuso, os quais em nada contribuem para o esclarecimento diagnóstico (INCA, 2012).

A classificação citológica mais atual do esfregaço cervical é o Sistema de Bethesda. Ela incorporou vários conceitos e conhecimentos adquiridos que, resumidamente, são: o diagnóstico citológico deve ser diferenciado para as células escamosas e glandulares; a inclusão do diagnóstico citomorfológico sugestivo da infecção por HPV, devido às evidências do envolvimento desse vírus na carcinogênese dessas lesões, dividindo-as em lesões intraepiteliais de baixo (LSIL) e alto (HSIL) graus, ressaltando o conceito de possibilidade de evolução para neoplasia invasora; e a introdução da análise da qualidade do esfregaço. Essa classificação foi revista em 1991 e 2001, porém sem mudanças estruturais (INCA, 2012).

A partir do momento em que a mulher inicia sua atividade sexual, passa a ser possível adquirir uma infecção pelo HPV. No modelo proposto para a história natural do câncer cervical (**Figura 4**), essa infecção pode regredir, espontaneamente, ou levar à LSIL, cuja progressão resultaria na HSIL e, eventualmente, no câncer cervical invasor. Por outro lado, também é possível a progressão direta da infecção pelo HPV para a HSIL. A evolução das lesões intraepiteliais cervicais é um processo reversível, sendo possível sua regressão espontânea (BOSCH ET AL., 2002; SCHIFFMAN & CASTLE, 2003).



**Figura 4:** História natural do câncer cervical, relacionando incidências de infecção pelo HPV, lesões pré-cancerosas e câncer.

Fonte: Adaptado de Schiffman & Castle, 2003.

Conhecer a história natural do CCU, particularmente a duração das lesões precursoras, pode ajudar na determinação da frequência de rastreamento. A lesão precursora mais importante é a HSIL, que pode regredir ou progredir para carcinoma invasor em um longo período de tempo (ZEFERINO e DERCHAIN, 2006).

Considerando que o HPV quase sempre participa da oncogênese cervical, a vacinação anti-HPV apresenta potencial para reduzir a carga de doença cervical e lesões precursoras. O Ministério da Saúde adotou a vacina quadrivalente contra HPV que confere proteção contra HPV de baixo risco (HPV 6 e 11) e de alto risco (HPV 16 e 18), tendo maior evidência de proteção e indicação para pessoas que nunca tiveram contato com o vírus (SAÚDE, 2014).

A incorporação da vacina contra HPV no Programa Nacional de Imunizações, pelo Ministério da Saúde, tornou-se realidade a partir de 2014, sendo ofertada em esquema vacinal estendido, composto por três doses (0, 6 e 60 meses), a partir da recomendação do Grupo Técnico Assessor de Imunizações da Organização Pan-Americana de Saúde (TAG/OPAS), após aprovação pelo Comitê Técnico de Imunizações do Programa Nacional de Imunização (PNI), reconhecendo a necessidade de dados iniciais em longo prazo sobre tal esquema (BRASIL, 2014).

Inicialmente, a população alvo da vacinação contra HPV correspondeu às meninas na faixa etária de 11 a 13 anos. A partir de 2015, o Ministério da Saúde ampliou a faixa etária, priorizando as meninas na faixa etária de 9 a 11 anos; meninas e mulheres vivendo com HIV, na faixa etária de 9 a 26 anos; e meninas indígenas na faixa de 9 a 13 anos de idade (BRASIL,

2015). O esquema vacinal passou a ser composto de duas doses, com intervalo de 6 (seis) meses entre estas, não havendo mais a necessidade da terceira dose, a partir de 2016. No caso das meninas e mulheres vivendo com HIV manteve-se o esquema estendido de três doses (BRASIL, 2016).

A partir deste ano, 2017, o calendário nacional de imunização incorporou o seguinte público alvo e esquema de vacinação contra HPV: meninas de 9 a 14 anos de idade, e meninos de 11 a 14 anos de idade, seguindo esquema de duas doses de vacina quadrivalente, com intervalo de 6 (seis) meses entre estas. Crianças e jovens, de ambos os sexos, vivendo com HIV, na faixa etária de 9 a 26 anos, com esquema estendido de três doses, seguindo intervalo de 0, 2 e 6 meses entre as doses (BRASIL, 2017).

Cabe lembrar que a vacinação é uma ferramenta de prevenção primária e também não substitui o rastreamento do câncer, pois a vacina não confere proteção contra todos os subtipos oncogênicos de HPV. Da mesma forma, a vacina não confere proteção contra outras doenças sexualmente transmissíveis e, por isso, a importância do uso do preservativo em todas as relações sexuais.

O rastreamento do câncer do colo do útero no Brasil, recomendado pelo Ministério da Saúde, é através do exame citopatológico ou Papanicolau em mulheres de 25 a 64 anos. A rotina é a repetição deste exame a cada três anos, após dois exames normais consecutivos realizados com um intervalo de um ano. A efetividade do programa de controle do câncer cervical é alcançada com a garantia da organização, da integralidade e da qualidade dos serviços, bem como do tratamento e do seguimento das pacientes (INCA, 2015).

#### **I.4 EXAME CITOPATOLÓGICO – TESTE PAPANICOLAU**

Georgio Nicholas Papanicolau (1883-1962), médico citologista grego que em 1914 passou a atuar no departamento de anatomia da Universidade Cornell em Nova York e realizou estudos do ciclo menstrual dos porquinhos-da-índia, cujo sangramento não é visível, e não elimina tecidos ao menstruar. Utilizando um espécuro nasal e cotonetes, ele fazia raspagem das células cervicais e as espalhava em lâminas de vidro para microscopia. Com isso, descobriu que, naqueles animais, as células eliminadas do colo do útero passavam por mudanças cíclicas, assim como os hormônios, concluindo que poderia utilizar a morfologia celular como referência para prever o exato estágio do ciclo menstrual. Ao final dos anos 1920, Papanicolau estendeu essa técnica a pacientes humanas, constatando que a predição também era possível, através da análise das células obtidas do colo do útero humano (MUKHERJEE, 2012). Papanicolau iniciou

essas coletas citológicas em sua esposa, pois, como se sabe, as mulheres, à época, eram restritas ao lar, eram tidas como incapazes para a sexualidade e apenas tinham a função de maternar e serem esposas; por isso, seus corpos não deveriam ser expostos em nenhuma hipótese (MARTINS, 2004).

Após quase uma década aprofundando seus estudos, através da leitura de lâminas de esfregaços normais, o citologista pensou na possibilidade de que a importância real do exame estivesse relacionada aos esfregaços patológicos, passando a dedicar-se ao estudo destes. Através da coleta e análise de diversas lâminas de mulheres com todos os tipos de doenças ginecológicas, iniciou a busca por alguma marca patológica nas células esfoliadas, descobrindo que ao fazer a raspagem de células do colo do útero, encontrava “formas bizarras e anômalas”, com membranas, núcleos e citoplasmas bem diferentes das células normais, ficando evidente que se tratava de um novo exame para detecção de células malignas. Com seu exame, Papanicolau adiantaria o relógio do diagnóstico, dando às mulheres, a possibilidade de receber tratamento preventivo e reduzir, grandemente, a possibilidade de desenvolver um câncer. Malignidades curáveis, pré-invasivas, passariam a ser detectáveis (MUKHERJEE, 2012).

A partir dos estudos de Papanicolau, analisando esfregaços citológicos cérvico-vaginais, que demonstraram a presença de células atípicas sem características evidentes de malignidade, mas que foram julgadas como modificações malignas incipientes, foi possível estabelecer o diagnóstico e o estudo das formas iniciais da neoplasia do colo do útero, uma vez que, até então, praticamente só se diagnosticava o carcinoma invasor clinicamente manifesto (FRANCO, 2003).

Em 1988 (WHO, 1988), o Ministério da Saúde passou a seguir a recomendação da Organização Mundial da Saúde para que o teste de Papanicolau fosse realizado a cada três anos em mulheres com idade entre 25 e 60 anos, após dois exames anuais negativos, com representação adequada da junção escamo-colunar e o canal endocervical. Posteriormente, em 1997, o Ministério da Saúde em parceria com o INCA, implantou o programa Viva Mulher, de âmbito nacional, envolvendo seis localidades brasileiras (Curitiba, Recife, Brasília, Rio de Janeiro, Belém e estado de Sergipe), tendo como população-alvo as mulheres pertencentes a uma faixa etária mais restrita, entre 35 e 49 anos (BRASIL, 2001)

Com base nesta experiência, as ações foram expandidas para todo o país, como Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero chamado Viva Mulher. A primeira ação desenvolvida foi de intensificação, no período de agosto a setembro de 1998, com a adoção de estratégias para estruturação da rede assistencial e estabelecimento de um sistema de

informações para o monitoramento das ações e dos mecanismos para mobilização e captação de mulheres, assim como definição das competências nos três níveis de governo. Em 2002, o fortalecimento e a qualificação da rede de atenção primária, bem como a ampliação de centros de referência possibilitaram a realização de uma segunda fase de intensificação, que priorizou as mulheres que jamais haviam se submetido ao exame preventivo ou que estavam sem fazê-lo há mais de três anos (BRASIL, 2011).

## **I.5 CASA DA MULHER**

Em Belém, foi criado o Centro de Atenção à Saúde da Mulher (CASA da Mulher), em janeiro de 2002, como uma Unidade de Referência Secundária em Oncologia Mamária e Ginecológica, Pré-natal de Alto Risco e Planejamento Familiar, sendo também voltada para o atendimento de mulheres vítimas de violência sexual e/ou doméstica. Esse Serviço recebe usuários (as) das Unidades Básicas de Saúde e Estratégia Saúde da Família, em sua maioria residentes em Belém, sendo mantida pela Prefeitura Municipal de Belém. Apesar de ser a Referência Secundária para municípios de Belém, recebe uma parcela significativa de pacientes oriundos (as) de outros municípios paraenses, e até mesmo outros estados.

A maioria absoluta de pacientes recebidos na Unidade é do sexo feminino, mas existe um pequeno quantitativo do sexo masculino, encaminhado para o serviço devido a problemas mamários, mais especificamente, por apresentarem ginecomastia. Esses pacientes são, geralmente, encaminhados para procedimentos cirúrgicos e recebem alta em intervalo curto de tempo.

A entrada no serviço deveria ocorrer via central de regulação de consultas da Secretaria Municipal de Saúde de Belém (SESMA), aonde seria agendada a consulta médica e assegurado o atendimento com dia e hora marcados. Porém, uma parcela significativa de pacientes ainda chega ao Centro diretamente com suas guias de referência e contrarreferência em mãos, em busca de matrícula e agendamento de consulta médica.

Mulheres com resultados alterados de exames de Mamografia (categorias BI-RADS 0, 3, 4, 5 e 6), Ultrassonografias Mamárias que identifiquem presença de nódulos ou cistos, são parte da clientela deste Serviço, aonde são realizados exames complementares, como biópsias ou punções aspirativas, que possam confirmar ou descartar o diagnóstico positivo para Câncer de Mama. Além disso, também é realizado o atendimento dos casos de abscesso mamário e mastite.

No caso das patologias uterinas, a Casa atende mulheres com resultados alterados em exames citopatológicos, seguindo as recomendações do Ministério da Saúde, através das Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (BRASIL, 2011), sendo realizados diversos exames para detecção precoce do câncer, bem como para tratamento das lesões precursoras.

Nos casos de alterações benignas, as mulheres ficam em controle no próprio serviço e, em casos confirmatórios de câncer mamário ou de colo uterino, são encaminhadas para o hospital de referência terciária para tratamento (SESMA, 2012).

A cada mês, a Casa da Mulher recebe cerca de 130 mulheres com resultado de exames citopatológicos alterados, as quais são matriculadas e agendadas para consultas com diversos profissionais, que compõem a equipe interprofissional do Serviço, como Enfermeiras, Médicos, Nutricionistas, Assistentes Sociais e Psicólogas. O primeiro atendimento, pós-acolhimento, corresponde a uma Consulta de Enfermagem, em que será esclarecido seu diagnóstico citopatológico, bem como fornecidas as orientações necessárias ao seu preparo para o (s) procedimento (s) ao (s) qual (is) será submetida, conforme a necessidade e seguindo as Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero (INCA, 2016).

Em seguida, a mulher passa na Consulta Médica, sendo submetida aos procedimentos necessários, seja Colposcopia, Biópsia do Colo do Útero e/ou Cirurgia de Alta Frequência (CAF). E, conforme suas necessidades, com os demais componentes da equipe do Serviço. Após conclusão diagnóstica e recebimento do resultado do exame histopatológico realizado, ocorre o devido direcionamento e orientação da paciente. Caso confirmatório de Câncer Cervical, encaminhamento para o Hospital de Referência Terciária Oncológica do Pará – Hospital Ophir Loyola (HOL), com dia e hora marcados para atendimento médico. E, caso o resultado negativo para Câncer, a paciente fica em controle no próprio Centro por período de tempo variável, conforme seu diagnóstico e quadro clínico.

## **I.6    ÁCIDO CAURENOICO**

O Brasil é bastante conhecido pela exuberância e variedade de suas plantas tropicais, e a utilização dessas plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (BALUNAS; KINGHORN, 2005; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), apontam que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suprir as necessidades de assistência médica



primária (FARNSWORTH,1985; CRAGG; NEWMAN, 2000; FONSECA; PEREIRA, 2004; CRAGG; NEWMAN, 2005). Sendo que a maior parte das terapias tradicionais envolve o uso de plantas *in natura* ou produtos manufaturados a partir de seus extratos ou princípios ativos (MORAES *et al.*, 2003). Mais de 25% dos fármacos comercializados são drogas derivadas de produtos naturais de plantas (ROCHA, 2013).

A Copaibeira (nome genérico dado às várias espécies do gênero *Copaifera* Linn, família Leguminosae, espalhadas por todas as regiões tropicais do planeta) possui como espécies principais *C. reticulata* Ducke, *C. officinalis* Linn e *C. langsdorffii* Desf, e fornece um oleorresina conhecido como bálsamo ou óleo de copaíba, que tem sido utilizado há vários séculos pelos índios brasileiros com inúmeras propriedades a ele atribuídas (DEL NUNZIO, 1995). No Brasil, a espécie *C. langsdorffii* Desf é particularmente importante por estar distribuída por todo o território nacional (LEITE, 1993).

O oleorresina de Copaíba é um líquido viscoso e transparente, com a cor variando do amarelo-pálido ao castanho-claro dourado, podendo ser incolor. Seu cheiro é forte e penetrante, e seu sabor acre e um pouco amargo (PIO CORREA, 1984). Ele é constituído por uma parte sólida (50 – 60% de seu peso) composta por terpenos e diferentes ésteres e resinoides, e uma parte volátil (40 – 50%) composta por uma mistura de óleos essenciais (DEL NUNZIO, 1995).

Relatos sobre o uso do óleo de copaíba na medicina popular da Amazônia brasileira têm sido documentados na literatura, com numerosas aplicações de relevante importância médica, incluindo ação anti-inflamatória, diurética, antiulcerogênica, antitumoral, antimelanoma, antilipoperoxidação e antioxidante (OHSAKI *et al.*, 1994; DEL NUNZIO, 1995; PAIVA *et al.*, 2002, GOMES *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2011). Este produto natural tem grande representação social e econômica na região amazônica, já que representa cerca de 95% de toda a produção de resina oleosa no Brasil (MEDEIROS & VIEIRA, 2008). Além disso, os diterpenos, ácidos caurenoico e poliáltico presentes no óleo puro parecem apresentar propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias (TAPPIN *et al.*, 2004; COMELLI JR. *et al.*, 2010)

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1 Objetivo Geral**

Analisar o perfil citopatológico de pacientes atendidas em uma Unidade de Referência Secundária, em Belém/PA; e avaliar a atividade do ácido caurenóico contra linhagens de câncer cervical.

### **II.2. Objetivos Específicos**

- Identificar o perfil dos achados microbiológicos e citopatológicos nos exames realizados pelo laboratório da Casa da Mulher, em Belém/PA, durante o período de um ano;
- Avaliar o efeito genotóxico e mutagênico do ácido caurenóico nas linhagens de câncer cervical HeLa, CaSki e C33A;
- Analisar o efeito do tratamento com ácido caurenóico nas linhagens HeLa, CaSki e C33A sobre transcrição de genes envolvidos no ciclo celular;
- Analisar o efeito do tratamento com ácido caurenóico nas linhagens HeLa e CaSki sobre a expressão dos genes E6 e E7 de HPV.

### III. ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### III.1 ARTIGO 1.

##### **Perfil dos exames citopatológicos do colo do útero realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, Brasil**

Sílvia Maria Machado da Rocha<sup>1, 2</sup>, Marcelo de Oliveira Bahia<sup>3</sup>, Carlos Alberto Machado da Rocha<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Curso de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; <sup>2</sup>Casa da Mulher (Centro de Atenção à Saúde da Mulher), Belém, Pará, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Ensino - Recursos Naturais, Design e Infraestrutura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, Pará, Brasil

#### **RESUMO**

O câncer cervical costuma apresentar progressão lenta e silenciosa, mantendo-se entre os mais incidentes no Brasil. Seu rastreamento é realizado pelo exame de Papanicolaou, o qual, além da detecção precoce do câncer, permite a pesquisa de agentes infecciosos. Procedeu-se um estudo retrospectivo analítico sobre os resultados do exame de Papanicolaou realizado na Casa da Mulher em Belém, Estado do Pará, de setembro de 2012 a agosto de 2013, com dados dos livros de preventivos do câncer de colo do útero (PCCU). No período, foram realizados 2.202 exames PCCU na Casa da Mulher, a maior parte destes (52,36%) proveniente de mulheres na faixa dos 40 a 60 anos de idade. A faixa etária na amostra apresentou fraca correlação positiva ( $r_s = 0,1429$ ) com a frequência de achados microbiológicos e fraca correlação negativa ( $r_s = -0,2571$ ) com a frequência de alterações citopatológicas. Os achados microbiológicos foram identificados em três espécies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida* sp. (12,44%) e *Trichomonas vaginalis* (0,68%). A prevalência de anormalidades citológicas nos exames foi de 5,72%, não diferindo significativamente ( $p = 0,7546$ ) das relatadas em outras publicações. As atipias celulares de significado indeterminado corresponderam a 2,679%, ficando abaixo da faixa estimada pelo INCA. A proporção total das lesões neoplásicas potencialmente malignas (lesão escamosa intraepitelial de alto grau e carcinoma) foi de 1,09%, com maior frequência na faixa etária de 30 a 39 anos. O aumento da cobertura de PCCU na população feminina precisa

ser alcançado e a promoção da saúde deve ser efetivada por meio de parcerias intersetoriais, participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida.

**Palavras-chave:** Saúde Pública; Prevenção Secundária; Teste de Papanicolaou; Neoplasias do Colo Uterino

### **Correspondência**

Sílvia Maria Machado da Rocha

Centro de Atenção à Saúde da Mulher (Casa da Mulher) Endereço: Tv. Bom Jardim, 370.

Bairro: Cidade Velha. CEP: 66023-140 Belém-Pará-Brasil

Tel.: +55 (91) 3242-0642 E-mail: silviamdarocha2@gmail.com

## **INTRODUÇÃO**

Nas décadas mais recentes presenciamos uma transição na distribuição epidemiológica de neoplasias no Brasil. Ao mesmo tempo em que aumenta a incidência de alguns tipos de câncer geralmente associados ao elevado status socioeconômico (câncer de mama, próstata, cólon e reto), verifica-se a persistência de altas taxas de neoplasias normalmente associadas com a pobreza (câncer de colo uterino, pênis, estômago e cavidade oral)<sup>1</sup>.

A estimativa para 2016/2017 no Brasil aponta para aproximadamente 576.000 casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma (175.760 casos novos) será o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata (61.200), mama feminina (57.960), cólon e reto (34.280), pulmão (28.220), estômago (20.520) e colo do útero (16.340). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é o mais incidente na Região Norte do Brasil (23,97/100.000 habitantes)<sup>2</sup>.

A prevenção secundária do câncer relaciona-se à detecção de lesões pré-malignas ou malignas iniciais na ocasião em que o tratamento é potencialmente curativo. O teste de Papanicolaou representa a principal estratégia em programas de rastreamento para o controle do câncer cervical<sup>3</sup>. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), uma cobertura da população-alvo de no mínimo 80% e a garantia de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados possibilitam reduzir em 60% a 90% a incidência de câncer uterino invasivo<sup>4</sup>. Entretanto, a maioria das capitais brasileiras não consegue atingir essa meta<sup>5</sup>.

Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade por câncer uterino diminuiu mais de 80% entre 1930 e 2012, principalmente devido à assimilação generalizada do teste de

Papanicolaou para a prevenção e detecção precoce do câncer cervical<sup>6</sup>. Contudo, nos países em desenvolvimento, ainda não foram alcançadas as metas de redução do número de casos.

A Casa da Mulher é uma unidade de referência secundária em oncologia mamária e ginecológica, mantida pela Prefeitura Municipal de Belém. A instituição recebe mulheres das Unidades Básicas de Saúde e Família Saudável, e realiza exames, como o Papanicolaou, para detecção precoce do câncer. Caso a neoplasia seja confirmada, a paciente é encaminhada ao hospital de referência terciária para tratamento<sup>7</sup>.

O exame de Papanicolaou permite também detectar sinais de inflamações da vulva e da vagina, contribuindo no rastreamento e detecção de vulvovaginites<sup>8</sup>. Entre as principais causas de queixas de mulheres que procuram atendimento na área de ginecologia estão as inflamações e infecções vaginais. Com frequência, nos preventivos do câncer de colo do útero (PCCU), são encontrados agentes infecciosos como o vírus Papilomavírus Humano (HPV) e a bactéria *Gardnerella vaginalis*.

O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de todos os achados microbiológicos e citopatológicos nos exames realizados pelo laboratório da Casa da Mulher, em Belém do Pará, durante o período de um ano.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Procedeu-se a um levantamento retrospectivo analítico dos resultados de exames PCCU realizados na Casa da Mulher, de setembro de 2012 a agosto de 2013. A coleta dos dados foi feita nos livros de PCCU dos anos de 2012 e 2013. As informações foram resumidas e apresentadas de acordo com a faixa etária e quanto à realização prévia do PCCU.

A publicação Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Conduas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde<sup>9</sup> foi usada para classificar os resultados dos exames citopatológicos. Nesta análise, foram considerados negativos tanto os resultados classificados como normais quanto os inflamatórios. Na microbiologia foram analisadas as frequências de bactérias, leveduras e protozoários.

Os resultados que apresentaram alterações citológicas foram organizados em uma tabela na qual foram utilizadas siglas, a saber: LSIL = *low-grade squamous intra epithelial lesion* (lesão escamosa intraepitelial de baixo grau); HSIL = *high-grade squamous intra epithelial lesion* (lesão escamosa intraepitelial de alto grau); ASC-US = *atypical squamous cells of*

*undetermined significance* (atipia escamosa de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica); ASC-H = *atypical squamous cells cannot exclude HSIL* (atipia escamosa de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau); AGC-US = *atypical glandular cells of undetermined significance* (atipia glandular de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica); AGC-H = *atypical glandular cells cannot exclude high-grade glandular lesion* (atipia glandular de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau); CA = carcinoma.

O *software* BioEstat 5.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; Belém, Pará, Brasil) foi utilizado para as análises estatísticas: o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para analisar correlação entre a idade das pacientes e as alterações encontradas; o teste do qui-quadrado para comparar frequências de exames alterados desta amostra com dados da literatura pertinente.

A pesquisa teve o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP/ICS/UFPA) em 30 de junho de 2014 (Processo nº CAAE 32587514.2.0000.0018).

## RESULTADOS

No período de setembro de 2012 a agosto de 2013, foram realizados na Casa da Mulher 2.202 exames PCCU. A maior parte destes (52,36%) proveniente de mulheres na faixa dos 40 a 60 anos de idade. Por outro lado, 31,97% e 15,67% foram, respectivamente, de mulheres com menos de 40 e mais de 60 anos de idade (Tabela 1). Dessa amostra, apenas 20 mulheres nunca haviam realizado o PCCU. A faixa etária das pacientes apresentou apenas uma fraca correlação positiva ( $r_s = 0,1429$ ) com a frequência de achados microbiológicos e uma fraca correlação negativa ( $r_s = -0,2571$ ) com a frequência de alterações citopatológicas.

**Tabela 1-** Frequência dos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, no Estado do Pará, de setembro de 2012 a agosto de 2013, e frequência de mulheres que responderam nunca ter realizado o PCCU, por faixa etária.

Faixa etária	Exames realizados		Não fizeram PCCU anteriormente	
	N	%	n*	%
≤ 19 anos	34	1,54	06	30
20 a 29 anos	240	10,89	03	15
30 a 39 anos	430	19,54	01	5
40 a 49 anos	575	26,11	04	20
50 a 59 anos	578	26,25	04	20
≥ 60 ANOS	345	15,67	02	10
Total	2202	100	20	100

Nas análises microbiológicas foram identificadas três espécies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida sp.* (12,44%) e *Trichomonas vaginalis* (0,68%). A tabela 2 resume os resultados relativos à citopatologia, cuja prevalência de anormalidades foi de 5,72%. As atipias escamosas de significado indeterminado, identificadas em 2,588% dos exames, foram as alterações com maior incidência.

**Tabela 2-** Frequências das alterações citológicas encontradas nos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, de setembro de 2012 a agosto de 2013.

Faixa Etária	ASC-US	ASC-H	AGC-US	AGC-H	LSIL	HSIL	CA	Total
≤ 19 anos	-	-	-	-	2	-	-	2
20 a 29 anos	3	-	-	1	6	2	-	12
30 a 39 anos	10	1	-	-	7	13	1	32
40 a 49 anos	20	1	1	-	12	1	1	36
50 a 59 anos	12	-	-	-	9	3	-	24
≥ 60 anos	10	-	-	-	7	3	-	20
*n	55	2	1	1	43	22	2	126
% amostra	2,497	0,091	0,045	0,045	1,952	0,999	0,091	5,720

ASC-US = atipia escamosa de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica; ASC-H = atipia escamosa de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau; AGC-US = atipia glandular de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica; AGC-H = atipia glandular de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau; LSIL = lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL = lesão intraepitelial escamosa de alto grau; CA = carcinoma. \*n = número total de exames que apresentaram anormalidades citológicas, por tipo de atipia. Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

## DISCUSSÃO

Coelho et al<sup>10</sup> analisaram os resultados dos exames do Município de Floriano, Estado do Piauí, no ano de 2004. Quanto à microbiologia, evidenciaram a presença das bactérias *G. vaginalis* (21,67%) e *Leptothrix* sp. (3,37%), além de *Candida* sp. (16,70%) e *T. vaginalis* (22,38%). Em comparação aos resultados do presente estudo, não houve diferença significativa quanto às frequências de *G. vaginalis* e *Candida* sp. ( $p = 0,5847$ ), porém foi altamente significativa quanto à frequência de *T. vaginalis* ( $p = 0,0001$ ). Segundo os mesmos autores, a ausência ou a baixa frequência de *T. vaginalis* favorece a análise citológica, pois a infecção pelo protozoário poderia interferir no diagnóstico de atipias de significado indeterminado. As frequências de *G. vaginalis* e *Candida* sp. encontradas por Lessa et al<sup>11</sup>, em mulheres privadas de liberdade, no Estado do Ceará, também não diferiram de nossos resultados ( $p = 0,3631$ ).

A prevalência de anormalidades citopatológicas no presente estudo (5,72%) não difere significativamente ( $p = 0,7546$ ) das relatadas em diversas publicações recentes, como Nobre e Lopes Neto<sup>12</sup> no Amazonas (1% a 5%), Sousa et al<sup>13</sup> no Pará (4,05%), Coelho et al<sup>10</sup> no Piauí (5,32%) e Fonseca et al<sup>14</sup> em Roraima (7%). Embora nos prontuários de presidiárias reclusas no Ceará<sup>11</sup>, a porcentagem de anomalias citopatológicas tenha sido um pouco maior (9,8%), não chegou a ser estatisticamente diferente de nosso resultado.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer as atipias escamosas de significado indeterminado representam a variedade de atipia mais comumente descrita nos laudos citopatológicos do colo uterino, ficando entre 3,5% e 5% do total de exames realizados<sup>9</sup>. No presente levantamento, a frequência ficou abaixo daquela média nacional. Entretanto, Sousa et al<sup>13</sup> encontraram frequência ainda menor (1,45%) para essas atipias nos exames PCCU realizados no ano de 2008, no Laboratório Central do Estado do Pará (Lacen-PA), provenientes de 16 municípios paraenses.

Na Tabela 2 também são apresentadas as frequências de LSIL (1,952%), HSIL (0,999%) e carcinoma (0,091%). A proporção de lesões neoplásicas potencialmente malignas (HSIL e carcinoma) foi mais elevada em mulheres da faixa de 30 a 39 anos de idade, todas com exame prévio alterado – seja por atipia de significado indeterminado ou lesão intraepitelial.

Há ainda carência na literatura de análises que avaliem o coeficiente de correlação entre a faixa de idade das pacientes e a ocorrência de alterações citopatológicas. A partir dos resultados de Sousa et al<sup>13</sup>, efetuamos a estatística, encontrando uma correlação negativa moderada ( $r_s = -0,4286$ ). Em nosso levantamento também foi observada correlação negativa,



embora fraca ( $r_s = -0,2571$ ). Possivelmente, a diminuição da frequência de alterações com o aumento da idade nas amostras está relacionada tanto a uma vida sexual menos ativa, quanto à maior preocupação na busca de acompanhamento especializado por parte das pacientes de idades mais avançadas.

Em relação à cobertura, observou-se uma proporção de 99,09% de mulheres que relataram já ter realizado PCCU previamente. Entretanto, o que levou a maioria das pacientes da amostra à Casa da Mulher foi um exame alterado feito na Rede Básica de Saúde, de modo que a cobertura obtida não representa a real situação das mulheres em Belém.

Análises da relação do Índice de Desenvolvimento Humano com a realização de mamografia e do exame de Papanicolaou nas capitais brasileiras e Distrito Federal, em 2011, demonstraram que foram dez as capitais brasileiras que atingiram a meta de 80% para realização do Papanicolaou em algum momento da vida e apenas sete para os últimos três anos<sup>5</sup>. A capital paraense não apareceu entre as que atingiram a meta.

A promoção da saúde deve ser efetivada por meio de parcerias intersetoriais, participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida. Ainda assim, os profissionais de saúde devem conduzir a mulher no sentido de sensibilizá-la ao ato de realizar o exame preventivo, tornando uma preocupação presente no cotidiano e em suas práticas de saúde<sup>15</sup>.

## **CONCLUSÃO**

A falha na cobertura do exame PCCU em Belém vem sendo registrada na literatura e os resultados obtidos na Casa da Mulher de setembro de 2012 a agosto de 2013 identificaram anormalidades citopatológicas com prevalência semelhante às observadas em outras cidades que também não atingiram a metade da cobertura de 80% estabelecida pela OMS. A ampliação na cobertura do exame PCCU no sentido da promoção da saúde da mulher exige não apenas as atividades e decisões individuais, mas também o engajamento e interesse da sociedade civil e do Estado.

## **REFERÊNCIAS**

- 1 Koifman S, Koifman R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res* 2003 nov; 544(2-3): 305-11.

- 2 INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em 07 Dez 2015.
- 3 Rocha CAM. As pernas do caranguejo: *cancer crura*. 1ª. ed. Belém; 2013. 114 p.
- 4 World Health Organization (WHO). National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2th ed. Geneva: WHO, 2002.
- 5 Sadovsky ADI, Poton WL, Reis-Santos B, Barcelos, MRB, Silva, ICM. Índice de Desenvolvimento Humano e prevenção secundária de câncer de mama e colo do útero: um estudo ecológico. Cad Saúde Pública 2015 jul; 31(7): 1539-50.
- 6 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancerstatistics, 2016. CA Cancer J Clin 2016 jan-feb; 66:7-30.
- 7 Prefeitura de Belém. Rede de Serviços Intersetoriais do Município de Belém: pacto do acolhimento Belém pela vida [Internet]. Belém: Prefeitura de Belém; 2015 [citado 2016 jul 12]. Disponível em:  
[http://agenciabelem.com.br/arquivos/BEL%C3%89M%20PELA%20VIDA%20-%20GUIA%20INTERSETORIAL-%20Med%20a4%20\(em%20andamento\).pdf](http://agenciabelem.com.br/arquivos/BEL%C3%89M%20PELA%20VIDA%20-%20GUIA%20INTERSETORIAL-%20Med%20a4%20(em%20andamento).pdf).
- 8 Stuczynsky JV, Naud P, Matos JC. Vulvovaginites e cervicites. In: Pasqualotto AC, Schwarzbald AV, organizadores. Doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 342-4.
- 9 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA; 2006.
- 10.Coelho CMC,Verde, RMCL,Oliveira, EH, Soares.Perfil epidemiológico de exames citopatológicos realizados no LF de Floriano, Piauí.Rev Bras Farm 2014 mar; 95(1): 459–73.
- 11 Lessa PRA, Ribeiro SG, Lima DJM, Nicolau AIO, Damasceno AKC, Pinheiro AKB. Presença de lesões intraepiteliais de alto grau entre mulheres privadas de liberdade: estudo documental. Rev Latino-Am Enfermagem 2012 mar-abr; 20(2):354-6.
- 12 Nobre JCAA, Lopes Neto D. Avaliação de indicadores de rastreamento do câncer do colo do útero no Amazonas, Norte do Brasil, de 2001 a 2005. Rev Bras Cancerol 2009 jul-set; 55(2):213-20.

13 Sousa MS, Canto ASS, Tsutsumi MY, Maciel MC, Zeferino LC. Perfil dos exames citológicos do colo do útero realizados no Laboratório Central do Estado do Pará, Brasil. Rev Pan-Amaz Saúde 2011 jun; 2(2): 27-32.

14 Fonseca AJ, Murari RSW, Moraes IS, Rocha RF, Ferreira LCL. Acurácia dos exames citológicos cervicovaginais em Estado de elevada incidência de câncer de colo de útero. Rev Bras Ginecol Obstet 2014 ago; 36(8): 347-52.

15 Silva SED, Vasconcelos EV, Santana ME, Rodrigues ILA, Mar DF, Carvalho FL. That socalled papanicolaou: women's social representations about the screening test for cervical cancer. Rev Esc Enferm USP 2010 set; 44(3): 554-60.

### **III.2 ARTIGO 2.**

#### **Efeito do ácido caurenico sobre a genotoxicidade e progressão do ciclo celular em linhagens celulares de câncer cervical**

Silvia Rocha<sup>1,2</sup>, Plínio Cardoso<sup>3</sup>, Marcelo Bahia<sup>3</sup>, Claudia Pessoa<sup>4</sup>, Paulo Soares<sup>5</sup>, Rommel Burbano<sup>3</sup>, Carlos Rocha<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará; <sup>2</sup>Casa da Mulher (Centro de Atenção à Saúde da Mulher), Belém, Pará, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>5</sup>Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brasil.

<sup>6</sup>Departamento de Ensino - Recursos Naturais, Design e Infraestrutura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, Pará, Brasil.

#### **Resumo**

A incidência de câncer cervical mantém-se elevada em todo o mundo, com sua evolução passando por vários estágios de alterações intraepiteliais até a progressão para o câncer invasivo. Vários carcinógenos estão relacionados com o desenvolvimento das lesões precursoras deste tipo de câncer, destacando-se a infecção pelo Papilomavírus Humano. A utilização de produtos naturais na medicina popular, como o oleorresina de Copaíba, ainda se mantém com forte tradição, com aplicabilidade voltada para ação anti-inflamatória,

antiulcerogênica, antitumoral, antioxidante e outras. Neste estudo foi avaliada a atividade mutagênica do ácido caurenico (AC), extraído da copaíba, e o efeito desse composto no controle do ciclo celular em linhagens celulares de câncer cervical, utilizando-se linhagens HeLa (HPV18-positivo), CaSki (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo). Assim, os objetivos do estudo foram: a) avaliar o índice de danos no DNA, através do Ensaio Cometa, b) avaliar a mutagenicidade através do Teste do Micronúcleo, c) avaliar o efeito do tratamento com AC nas linhagens celulares, analisando a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular, d) analisar a inibição de expressão dos genes E6 e E7, diretamente relacionados ao controle do ciclo celular. O AC mostrou forte correlação positiva com os indicadores de genotoxicidade avaliados, em todas as linhagens celulares utilizadas. Em concentrações elevadas, inibiu a expressão dos oncogenes E6 e E7, que interferem na regulação do ciclo celular. E, mesmo sendo observados efeitos genotóxicos, os ensaios apontaram para possibilidade do uso do AC como matéria-prima de agentes terapêuticos para câncer cervical com presença de HPV, assim como em pesquisas futuras sobre as funções de E6 e E7.

## **Introdução**

A história natural do câncer do colo do útero começa com um epitélio normal que evolui através de vários estádios de displasia - neoplasia intraepitelial cervical de graus 1, 2 e 3 (NIC 1, NIC 2, NIC 3) - e, finalmente, para o câncer cervical invasivo (CCI). Há um longo intervalo de tempo para a progressão para CCI e consenso sobre o fato de que a regressão ocorre na NIC. A parte mais importante da terapia é detectar e erradicar lesões NIC 3 locais antes que a progressão para CCI e metástase possam ocorrer (Chang et al., 2013).

O câncer cervical representa mais de 500.000 novos casos de câncer e mais de 250.000 mortes por ano em todo o mundo (Ferlay et al., 2015). Estudos epidemiológicos de lesões do colo do útero sugeriram a participação de carcinógenos venéreos (sêmen, vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus, vírus herpes simples tipo II). O HPV apareceu como o principal suspeito quando encontrado em cerca de 90% dos cânceres cervicais e porque possui oncogenes (E6 e E7) com potencial de transformação (Arends, Buckley & Wells, 1998; Brenna & Syrjanen, 2003; Rivoire et al., 2006). Os HPV também foram detectados numa vasta gama de controles assintomáticos, indicando que são necessários outros eventos para o desenvolvimento de neoplasias, tais como a persistência viral e/ou a expressão alterada de genes virais, muitas vezes após a integração do genoma viral (Rivoire et al., 2006).

Embora a maioria das infecções por HPV sejam resolvidas dentro de alguns meses, outras persistem e expressam oncogenes virais que inativam as proteínas p53 e Rb, levando ao aumento da instabilidade genômica, acúmulo de mutações somáticas e, em alguns casos, integração de HPV no genoma do hospedeiro (Moody & Laimins, 2010). A associação com o risco de câncer e os subtipos histológicos variam substancialmente entre os tipos de HPV carcinogênicos, mas as razões para estas diferenças são mal compreendidas. Além disso, os subgrupos clinicamente relevantes de pacientes com câncer cervical ainda não foram identificados.

A doença começa em uma lesão pré-invasiva curável em até 100% dos casos, que normalmente progride lentamente por 10 a 20 anos até atingir a fase invasora, fase em que a cicatrização se torna mais difícil, senão impossível (Muller et al., 2008; INCA, 2016). Vacinas preventivas eficazes contra as formas mais oncogênicas de HPV estão disponíveis há vários anos, com a vacinação tendo o potencial de longo prazo para reduzir o número de casos de câncer cervical. No entanto, as vacinas atuarão como um meio de prevenção do câncer cervical apenas para os indivíduos que anteriormente tinham acesso a elas antes do início da vida sexual. Fora deste contexto, a luta contra o câncer cervical deve ser feita, ainda, através da detecção de lesões precursoras e seu devido tratamento e acompanhamento clínico (Nakagawa, Schirmer & Barbieri, 2010).

O uso de plantas medicinais é uma tradição mantida até o presente. Relatos sobre medicina popular na região amazônica brasileira têm sido documentados na literatura, especialmente no que se refere à resina oleosa extraída do tronco de *Copaifera* (copaíba) (Tappin et al., 2004; Comelli Jr. et al., 2010), com numerosas aplicações de relevante importância médica, incluindo ação anti-inflamatória, antiulcerogênica, antitumoral, antimelanoma, antilipoperoxidação e antioxidante (Ohsaki et al., 1994; Paiva et al., 2002, Gomes et al., 2007; Silva et al., 2009; dos Santos et al., 2011). Este produto natural tem grande representação social e econômica na região amazônica, já que representa cerca de 95% de toda a produção de resina oleosa no Brasil (Medeiros & Vieira, 2008). Além disso, os diterpenos, ácidos caurenóico e poliáltico presentes no óleo puro parecem apresentar propriedades cicatrizantes e anti-inflamatórias (Tappin et al., 2004; Comelli Jr. et al., 2010).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade mutagênica *in vitro* do ácido caurenóico extraído de *Copaifera langsdorffii* e o efeito desse composto sobre a transcrição de genes envolvidos no controle do ciclo celular em três linhagens celulares de câncer cervical.

## **Materiais e métodos**

### **Linhagens**

A linhagem HeLa, primeira linhagem celular imortalizada, foi criada há mais de meio século do tumor de uma paciente de câncer cervical chamada Henrietta Lacks. Embora Henrietta Lacks tenha morrido de seu câncer em 1951, HeLa continuou a proliferar em cultura, tornando-se uma das linhagens celulares humanas mais comumente usadas na pesquisa biomédica. Aproximadamente 60.000 publicações científicas citam o uso de células HeLa e grandes descobertas foram feitas usando esta linhagem celular, incluindo o desenvolvimento da vacina contra a pólio em 1952, a ligação entre o papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical e o papel da telomerase na manutenção dos cromossomos (*Landry et al., 2013*). As células HeLa são hipertriploides (71 a 75 cromossomos), com desvios numéricos específicos, 20 cromossomos clonalmente anormais (conhecidos como cromossomos de assinatura HeLa ou marcadores HeLa) e contêm múltiplas cópias de HPV tipo 18 (HPV18), integradas em locais específicos. Estas são características estáveis após vários anos de subcultura semanal (*Chen, 1988; Macville et al., 1999*).

CaSki é uma linhagem celular de carcinoma cervical humano hipertriploide (72 a 78 cromossomos). As células são polimórficas e crescem em três dimensões, com até 600 cópias de DNA do papilomavírus tipo 16 (HPV 16) integradas no seu genoma. C33A é uma linhagem de câncer do colo do útero HPV-negativo. Seu cariótipo é, na maioria das vezes, aproximadamente diploide (45 a 47 cromossomos), embora cerca de 15% das células assumam um padrão aproximadamente tetraploide (85 a 89 cromossomos). As células C33A são refráteis e formam colônias tridimensionais (*McCormack et al., 2013*).

### **Procedimentos experimentais gerais**

As linhagens celulares foram cultivadas sob condições padrão em sais de Eagle modificadas, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina e antibióticos, sendo 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (*Speit et al., 1994*). As células foram mantidas em frascos de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Suíça) a 37° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e foram colhidas por tratamento com tripsina 0,15% e EDTA 0,08% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). As células (3 x 10<sup>5</sup>) foram semeadas em 5 mL de meio completo e cultivadas durante 2 dias antes do tratamento com a substância em estudo.

As células foram tratadas com diferentes concentrações de ácido caurenóico (2,5, 5, 10, 30 e 60 µg/mL) por 3 horas. Após este tratamento, as células foram lavadas com PBS arrefecido em gelo, tripsinizadas com 100 mL de tripsina (0,15%) e ressuspensas em meio completo. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante, abaixo de 0,1% (v/v). As culturas de células do controle negativo não foram expostas ao ácido caurenóico, enquanto o metanossulfonato de metila (MMS,  $4 \times 10^{-5}$  M) foi usado como um controle positivo. Todos os tratamentos celulares foram feitos em triplicata.

### **Agentes químicos**

O ácido caurenóico é obtido a partir do óleo de copaíba *C. langsdorffii* Desf. (Leguminaceae) que cresce abundantemente na região amazônica. Neste estudo, o ácido caurenóico (CAS 6730-83-2) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) e as concentrações usadas foram baseadas em publicações anteriores (Cavalcanti et al., 2006; Cardoso et al., 2017). O meio de Eagle modificado (MEM), soro fetal bovino, tripsina-EDTA, penicilina e estreptomicina foram adquiridos de Gibco® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O metanossulfonato de metila (MMS) e a citocalasina B (Cyt-B) foram obtidas da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

### **Ensaio cometa**

A versão alcalina do Ensaio Cometa foi realizada como descrito por Singh et al. (1988) com algumas modificações (Hartmann & Speit, 1997; Collins, 2004). Uma alíquota (450 µL) da suspensão celular de cada grupo experimental foi retirada e centrifugada a 1.000 rpm durante 5 min em uma microcentrífuga (Eppendorf). O sedimento resultante foi homogeneizado com 300 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,8%), espalhado em lâminas de microscópio previamente revestidas com uma agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e coberto com uma lamínula. Depois de 5 min a 4° C, removeu-se a cobertura e mergulhou-se as lâminas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; Tris a 10 mM; DMSO 10% e Triton-X 1%, pH: 10) durante uma semana. Após a lise, as lâminas foram colocadas numa câmara de eletroforese e cobertas com o tampão de eletroforese recém preparado (NaOH 300 mM; EDTA 1 mM, PH> 13). A eletroforese foi conduzida durante 25 min a 34 V e 300 mA. As lâminas foram então neutralizadas por submersão em água destilada (4° C) durante 5 min, fixadas com etanol absoluto durante 3 min, coradas com brometo de etídio (20 µg/mL) e observadas

utilizando um microscópio de fluorescência (Olympus BX41), com um aumento de 400x, para a análise de 100 células de cada amostra.

As células foram classificadas visualmente, de acordo com o comprimento da cauda, em cinco classes: classe 0: sem danos, sem cauda; Classe 1: com uma cauda menor do que o diâmetro da cabeça (nucleoide); Classe 2: com comprimento da cauda uma a duas vezes o diâmetro da cabeça; Classe 3: com uma cauda maior que o dobro do diâmetro da cabeça; Classe 4: dano significativo com comprimento de cauda maior que três vezes o diâmetro do nucleoide ou cometas sem cabeça. O índice de danos (DI) foi atribuído a cada cometa de acordo com sua classe, usando a fórmula:

$$DI = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4),$$

onde n = número de células em cada classe analisada. O DI variou de 0 (completamente intacto: 100 células  $\times$  0) a 400 (com dano máximo: 100 células  $\times$  4) (Silva et al., 2000; Collins et al., 2001).

### **Teste do micronúcleo**

Para avaliação da mutagenicidade, o teste do micronúcleo foi efetuado de acordo com Fenech (2000). Três horas após o tratamento, as culturas foram lavadas duas vezes e a citocalasina B foi adicionada a uma concentração final de 2  $\mu$ g/mL. As culturas foram colhidas 21 h após a adição de citocalasina B. As células foram separadas da garrafa por tripsinização, a suspensão celular foi centrifugada a 1000 rpm durante 5 min e as células submetidas a solução hipotônica (KCl 0,075 M). Depois, as linhagens foram lavadas uma vez com 5 mL de fixador frio metanol: ácido acético (5 : 1) (v/v) e novamente lavadas com 5 mL de uma solução fria de metanol : ácido acético (3: 1) (v/v). A suspensão celular foi gotejada sobre lâminas e corada por Giemsa a 5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato (pH 6,8) durante 5 min. Os micronúcleos foram avaliados em 2000 células binucleadas usando os critérios de acordo com Fenech (2000). A análise foi realizada utilizando um microscópio óptico (BIOVAL L2000A) a uma ampliação de 1000x.

### **Análise de transcrição de genes**

Analizamos a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular para avaliar o efeito do tratamento com ácido caurenóico nas linhagens HeLa, CaSki e C33A (Tabela 1). O mRNA total foi isolado de todas as amostras das linhagens celulares utilizando reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O RNA extraído foi purificado usando RNeasy Mini Kit (Qiagen,



Valencia, CA, EUA), de acordo com o protocolo recomendado. A concentração e a qualidade foram determinadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Kisker, Germany) e géis de agarose a 1%, respectivamente. As amostras foram armazenadas a -80° C até o uso.

**Tabela 1:** Resumo dos alvos e referências dos oito genes no estudo de transcrição.

Símbolo do gene	Nome	Função do gene	ensaio*
<i>MYC</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular / oncogene	<b><u>hs00153408_m1</u></b>
<i>CCND1</i>	cyclin D1	regulação positiva do ciclo mitótico / oncogene	<b><u>hs00765553_m1</u></b>
<i>BCL2</i>	b-cell cll/lymphoma 2	anti-apoptótica / oncogene	<b><u>hs00608023_m1</u></b>
<i>CASP3</i>	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	pro-apoptótica	<b><u>hs00234387_m1</u></b>
<i>ATM</i>	atm serine/threonine kinase	parada do ciclo celular em resposta a danos no DNA e para a estabilidade do genoma / supressor tumoral	<b><u>hs01112355_g1</u></b>
<i>CHK2</i>	checkpoint kinase 2	regulação de checkpoint do ciclo celular em resposta ao dano ao DNA e aos blocos de replicação / suposto supressor tumoral	<b><u>hs00200485_m1</u></b>
<i>TP53</i>	tumor protein p53	indução de parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo do DNA, ou alterações no metabolismo / supressor tumoral	<b><u>hs01034249_m1</u></b>
<i>P16</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)	supressão da atividade de G <sub>1</sub> /S-Cdk / supressor tumoral	<b><u>hs00923894_m1</u></b>

\* As sondas TaqMan foram adquiridas como produtos para ensaio de expressão gênica.

O RNA foi reversamente transcrito utilizando o kit cDNA de Alta Capacidade de acordo com o protocolo do fabricante (Life Technologies, Pittsburgh, PA, EUA). O DNA complementar foi então amplificado por PCR quantitativo da transcrição reversa em tempo real (RTqPCR), usando sondas TaqMan como produtos para ensaio de expressão gênica (Life Technologies, Pittsburgh, PA, USA; Table 1) e um instrumento 7500 Fast Real-Time PCR (Life Technologies, Pittsburgh, PA, EUA). O gene GAPDH foi selecionado como um controle interno da quantificação relativa de RNA e eficiência da transcrição reversa. Todos os RT-qPCRs foram realizados em triplicata tanto para os genes alvo quanto para o controle interno. A quantificação relativa da transcrição dos genes foi calculada de acordo com o software do fabricante (Life Technologies, Pittsburgh, PA, EUA).

### Análise da inibição de expressão dos genes E6 e E7

A expressão de mRNA de E6 e E7 foi determinada por RT-PCR conforme descrição prévia (Chang et al., 2007). Em resumo, o RNA total foi extraído com reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O DNA complementar foi sintetizado por incubação de amostras a 37° C durante 1 h em um tampão contendo Tris 50 mM, pH 8,4, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 300 ng de RNA, 0,2 µg de oligo-dT, DTT 10 mM, dNTP 0,5 mM, 10 unidades de inibidor de RNase e 50 unidades de transcriptase reversa. Para cada execução de PCR, preparou-se uma mistura principal com 1x tampão TaqMan, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dNTP 200 mM, 300 nM de cada iniciador, 1 unidade de AmpliTaq Gold DNA Polimerase e 3 ml de solução de DNA complementar em um total de 30 ml. As sequências de iniciadores para cada gene estão listadas na Tabela 2. As reações de PCR foram realizadas com iniciadores específicos e as seguintes configurações: 30 ciclos a 94° C durante 40 s, 56° C por 40 s e 72° C durante 1 min, utilizando um termociclador QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, fotografados a 254 nm e a densidade ótica de cada banda foi medida. Para quantificação, a densidade de cada gene foi calibrada para o vetor de controle após normalização para o nível de actina interna.

**Tabela 2.** Lista de primers utilizados para a análise de expressão dos genes HPV E6 e E7 por RT-PCR.

Genes	Sequências dos primers
HPV16E6	F: 5'-AATGTTTCAGGACCCTACGG-3' R: 5'-TCAGGACACAGTGGCTTTTG-3'
HPV16E7	F: 5'-TTTGCAACCAGAGACAACACTGA-3' R: 5'-GCCCATTAACAGGTCTTCCA-3'
HPV18E6	F: 5'-GCGACCCTACAAGCTACCTG-3' R: 5'-GTTGGAGTCGTTTCCTGTCGT-3'
HPV18E7	F: 5'-GCATGGACCTAAGGCAACAT-3' R: 5'-TGTTGCTTACTGCTGGGATG-3'
Actina	F: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' F: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'

### Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão e o teste de Shapiro-Wilk foi usado para avaliar a distribuição dos dados e determinar a sequência apropriada de testes para

as comparações estatísticas. Procedeu-se uma ANOVA seguida do teste de Tukey por comparações múltiplas para comparar os grupos estudados. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi empregado para verificar a possível correlação entre as concentrações do ácido caurenico e a genotoxicidade ou a transcrição gênica. Em todas as análises, o intervalo de confiança foi 95% e um  $p$ -valor menor que 0,05 foi considerado significativo.

### Resultados e discussão

O tratamento com metanossulfonato de metila promoveu efeitos genotóxicos significativos nas células das linhagens HeLa, CaSki e C33A, quando comparadas ao controle não tratado ( $p < 0,001$ ). Nas maiores concentrações (30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ), o ácido caurenico também induziu um aumento muito significativo ( $p < 0,001$ ) no índice de danos no DNA, frequência de danos e frequência de micronúcleos em células binucleadas, em relação aos valores do controle (Tabela 3). Em todas as linhagens a concentração de ácido caurenico apresentou forte correlação positiva com os três indicadores de genotoxicidade (Tabela 4 e Figura 1).

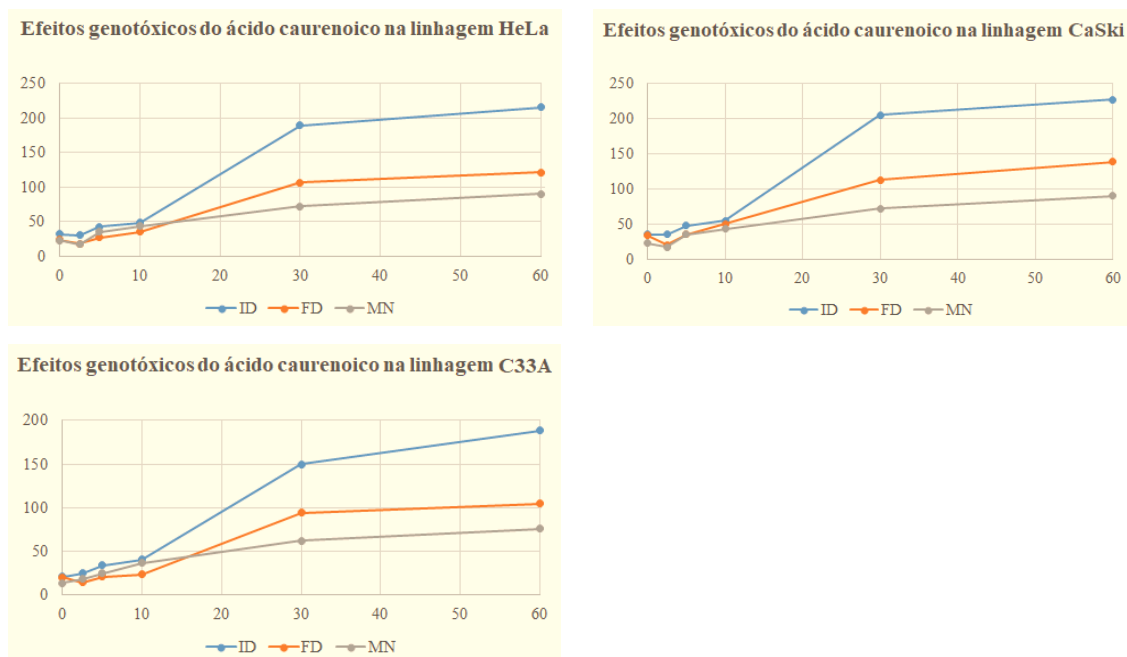
**Tabela 3.** Efeitos genotóxicos do ácido caurenico sobre células das linhagens HeLa, CaSki e C33A de câncer cervical.

Linhagens		Tratamentos com ácido caurenico ( $\mu\text{g/mL}$ )					
		0	2,5	5	10	30	60
HeLa	ID	32,0 $\pm$ 3,0 0	30,7 $\pm$ 2,0 8	42,7 $\pm$ 1,5 2	49,0 $\pm$ 2,64	189,6 $\pm$ 2,50	216,0 $\pm$ 2,51
	FD	23,7 $\pm$ 3,0 5	18,0 $\pm$ 1,0 0	27,7 $\pm$ 1,5 2	35,3 $\pm$ 1,52	106,7 $\pm$ 6,65	121,3 $\pm$ 2,51
	M N	23,0 $\pm$ 3,6 0	17,3 $\pm$ 3,2 1	35,3 $\pm$ 2,0 8	43,3 $\pm$ 3,21	72,3 $\pm$ 2,51	90,0 $\pm$ 2,00
CaSki	ID	35,3 $\pm$ 2,0 8	35,7 $\pm$ 3,2 1	47,7 $\pm$ 3,2 1	54,7 $\pm$ 2,51	205,3 $\pm$ 5,03	226,7 $\pm$ 6,50
	FD	33,7 $\pm$ 2,0 8	20,7 $\pm$ 2,0 8	35,3 $\pm$ 3,2 1	50,3 $\pm$ 4,16	112,7 $\pm$ 7,37	139,0 $\pm$ 5,56
	M N	23,0 $\pm$ 3,6 0	17,3 $\pm$ 3,2 1	35,3 $\pm$ 2,0 8	43,3 $\pm$ 3,21	72,3 $\pm$ 2,51	90,0 $\pm$ 2,00
C33A	ID	21,0 $\pm$ 2,0 0	24,7 $\pm$ 3,0 5	34,3 $\pm$ 4,5 0	40,7 $\pm$ 1,15	150,0 $\pm$ 5,00	188,0 $\pm$ 2,64
	FD	20,0 $\pm$ 2,6 4	14,3 $\pm$ 1,1 5	20,7 $\pm$ 1,5 2	23,7 $\pm$ 1,52	94,3 $\pm$ 5,03	104,7 $\pm$ 2,51
	M N	13,7 $\pm$ 0,5 7	18,3 $\pm$ 2,0 8	24,7 $\pm$ 1,5 2	36,3 $\pm$ 1,52	62,3 $\pm$ 1,52	75,7 $\pm$ 4,50

ID = Índice de danos; FD = Frequência de danos; MN = Frequência de micronúcleos.

**Tabela 4.** Correlação entre a concentração de ácido caurenico e os efeitos genotóxicos.

Linhagens	Coeficiente de Correlação de Pearson		
	Índice de danos	Frequência de danos	Frequência de micronúcleos
HeLa	r = 0.9450 p = 0.0044	r = 0.9463 p = 0.0042	r = 0.9561 p = 0.0028
CaSki	r = 0.9381 p = 0.0056	r = 0.9622 p = 0.0021	r = 0.9561 p = 0.0028
C33A	r = 0.9658 p = 0.0017	r = 0.9354 p = 0.0061	r = 0.9576 p = 0.0027

**Figura 1.** Efeitos genotóxicos do ácido caurenico nas linhagens HeLa, CaSki e C33A. ID = Índice de danos; FD = Frequência de danos; MN = Frequência de micronúcleos.

Até o presente, poucos estudos avaliaram a bioatividade do ácido caurenico, embora o efeito genotóxico e citotóxico de diterpenos já tenha sido previamente reportado. Utilizando o ensaio cometa, Kato et al. (2012) observaram que o ácido pimaradienoico, um diterpeno da classe dos pimaranos, induziu danos no DNA nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{g/mL}$  em células V79. Os mesmos autores também relataram danos no DNA em hepatócitos de ratos tratados com 80 mg/kg deste diterpeno.

O paclitaxel (Taxol®) é um diterpeno clinicamente eficaz, com atividade antineoplásica, que tem sido utilizado como fármaco para o tratamento de vários cânceres humanos (Bang et al., 2015). Este diterpeno suprime a dinâmica dos microtúbulos, o que resulta em inibição da

mitose. AL-Sharif (2012) demonstraram elevação na frequência de micronúcleos em células de medula óssea de ratos albinos após injeção intraperitoneal de paclitaxel.

Abrão et al. (2015) usaram a oleorresina de copaíba e 10 compostos dela isolados por fracionamento para testar a atividade citotóxica frente a várias linhagens: fibroblastos pulmonares normais de hamster chinês (V79), células tumorais de melanoma murino (B16F10), adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), glioblastomas humanos (MO59J, U343 e U251) e adenocarcinoma cervical humano (HeLa). A fração OC-2 (um diterpeno identificado como ácido copálico) foi a que apresentou atividade antiproliferativa mais pronunciada contra a linhagem HeLa, com  $IC_{50} = 44,03 \mu\text{g/mL}$ , significativamente menor que o obtido contra a linhagem celular normal V79 ( $IC_{50} = 107,30 \mu\text{g/mL}$ ) e após o tratamento de células HeLa com o quimioterápico VP16 ( $IC_{50} = 225,50 \mu\text{g/mL}$ ).

Recentemente, a genotoxicidade do próprio ácido caurenico foi demonstrada em linhagens de câncer gástrico, por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo (Cardoso et al., 2017). Comparando aos presentes resultados, nas células gástricas os efeitos genotóxicos foram observados mesmo sob baixas concentrações, porém nas células cervicais esses efeitos atingiram índices mais elevados.

Para um melhor entendimento do efeito do ácido caurenico em células de câncer cervical, foi avaliada a transcrição de genes envolvidos, entre outras funções, no controle da progressão do ciclo celular. Efetuou-se uma quantificação relativa de expressão gênica nas células de câncer cervical HeLa (HPV18-positivo) e CaSki (HPV16-positivo) em relação à linhagem C33A (HPV-negativo).

**Tabela 5.** Correlação entre a concentração de ácido caurenico e transcrição gênica. A estatística foi calculada a partir das médias de valores da quantificação relativa de expressão gênica nas células de câncer cervical HeLa e CaSki em relação à linhagem C33A.

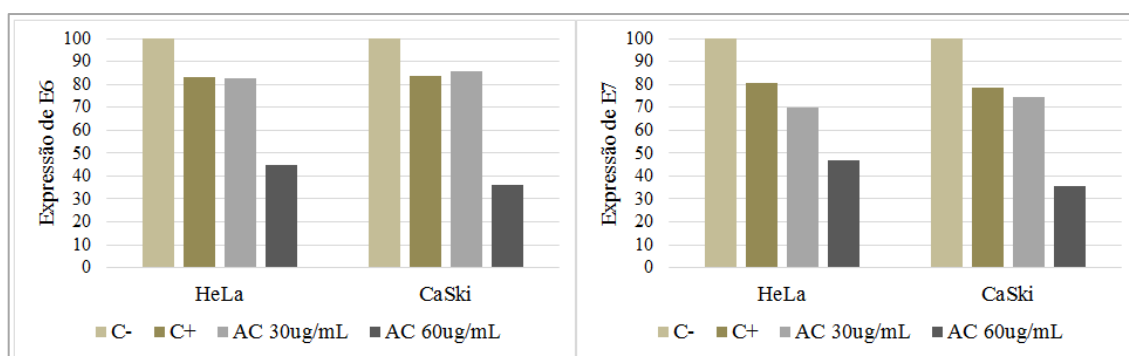
Linhagens	<i>MYC</i>	<i>CCND1</i>	<i>BCL-2</i>	<i>CASP3</i>	<i>ATM</i>	<i>CHK</i>	<i>TP53</i>	<i>P16</i>
HeLa	r = -	r = -	r = -	r = -	r =	r =	r =	r = -
	0.9609	0.7949	0.9584	0.6975	0.9353	0.9510	0.8942	0.9670
	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
	0.0023	0.0587	0.0026	0.1233	0.0061	0.0035	0.0162	0.0016
CaSki	r = -	r = -	r = -	r = -	r =	r =	r =	r = -
	0.9558	0.8226	0.9763	0.8117	0.9510	0.9502	0.9134	0.9640
	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =	p =
	0.0029	0.0444	0.0008	0.0498	0.0035	0.0037	0.0109	0.0019

Ao serem tratadas com ácido caurenico, as linhagens celulares HeLa e CaSki apresentaram menor transcrição dos genes *MYC*, *CCND1*, *BCL-2*, *CASP3* e *P16*. Por outro lado, essas linhagens apresentaram uma transcrição aumentada de *ATM*, *CHK* e *TP53*.

Cardoso et al. (2017) obtiveram resultados semelhantes em linhagens de câncer gástrico. De modo geral, as concentrações mais elevadas do ácido caurenico também induziram menor expressão dos genes *MYC*, *CCND1* e *BCL2*, reforçando que este composto tem ação na inibição de mitoses. Além disso, também observaram redução na transcrição de *CASP3* e aumento na transcrição de *ATM*, *CHK* e *TP53* nas células gástricas.

Nas células normais, *P16* funciona no controle do ciclo celular principalmente como um regulador negativo da via pRb / E2F e a expressão de *P16* é subjacente a um feedback negativo através de pRb. Nas células neoplásicas do colo do útero, a proteína E7 dos HPV de alto risco pode interferir no circuito regulatório por sua capacidade para inativar pRB e, portanto, levar à maior expressão da *P16* (Klaes et al., 2001). Os resultados ora obtidos sugerem que o tratamento com ácido caurenico levou à menor expressão do gene *P16* nas células HeLa e CaSki por ter restabelecido componentes importantes na regulação do ciclo celular.

O tratamento com ácido caurenico nas concentrações 2,5, 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$  não afetou significativamente a expressão dos oncogenes HPV E6 e E7. Nas maiores concentrações (30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ), entretanto, o ácido caurenico promoveu significativa inibição na expressão dos referidos genes (Figura 2), inclusive na maioria dos casos com efeito mais potente que o do MMS, o quimioterápico utilizado como controle positivo neste ensaio.



**Figura 2.** Efeito do ácido caurenico sobre a expressão dos oncogenes HPV E6 e E7 nas linhagens HeLa e CaSki de câncer cervical.

Bloquear a atividade das oncoproteínas E6 e E7 seria um importante alvo terapêutico nas células do câncer de colo uterino (Paul et al., 2014). Os mesmos autores relataram efeitos de um diterpenoide chamado ácido anisomólico sobre células da linhagem SiHa (HPV positivo) de câncer cervical. Este composto natural apresentou atividade anticancerígena caracterizada

pela capacidade de induzir parada do ciclo celular em G2/M através da redução de E6 e E7, conduzindo à restauração dos níveis de p53. Induz também à apoptose via ativação de caspase através da via mitocondrial.

Mais recentemente, estudos mecânicos moleculares de Zhang et al. (2017) revelaram que a N-acetil-deformilantimicina A (NADA) degradou os níveis das oncoproteínas E6 e E7 através da ativação do sistema de proteassoma dependente de ubiquitina, mediada por espécies reativas de oxigênio, em células HeLa, além de induzir à apoptose. Em nosso estudo foi possível demonstrar que o ácido caurenico (30 e 60  $\mu\text{g/mL}$ ), um diterpeno obtido da copaíba, promove redução da transcrição dos oncogenes E6 e E7, o que também implicaria na depleção dos níveis das oncoproteínas correspondentes em ambas linhagens HeLa e CaSki de câncer cervical.

Uma vez que a inativação de pRb através de HPV E7 resulta em expressão melhorada de *P16*, que pode representar um biomarcador específico e sensível para células com expressão ativa de oncogenes de HPV (Klaes et al., 2001), podemos inferir que a menor expressão de *P16* em função de um tratamento, como observada no presente estudo, representa um biomarcador para células em que oncogenes de HPV estão sendo impedidos de se expressar.

Embora tenham sido observados efeitos genotóxicos nas maiores concentrações de ácido caurenico, nossos ensaios também mostraram resultados muito favoráveis em relação à expressão gênica. Assim, o presente trabalho sugere maior atenção e novas abordagens, visto que o ácido caurenico pode servir como matéria-prima para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o câncer de colo do útero com presença de HPV, bem como para a pesquisa sobre as precisas funções de E6 e E7.

## Referências

- A. Hartmann, G. Speit, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183–188.
- A. Ohsaki, L.T. Yan, S. Ito, H. Edatsugi, Y. IwataD. Komoda, The isolation and in vivo potent antitumor activity of clerodane diterpenoid from the oleoresin of the Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4 (1994) 2889–2892.
- AL-Sharif, MMZ. Studies on the Genotoxic Effects of Anticancer Drug Paclitaxel (Taxol) in Mice. *World Applied Sciences Journal* 2012; 16 (7): 989-997.
- Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998; 51: 96-103.

Brenna SM, Syrjanen KJ. Regulation of cell cycles is of key importance in human papillomavirus (HPV)-associated cervical carcinogenesis. *São Paulo Med J* 2003; 121: 128-32.

Cavalcanti BC, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Burbano RR, Silveira ER, Cunha KM, Rao VSN, Moura DJ, Rosa RM, Henriques JAP, Pessoa C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil, *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 388–392.

Chang JTC, Chan SH, Lin CY, Lin TY, Wang HM, Liao CT et al. Differentially expressed genes in radioresistant nasopharyngeal cancer cells: gp96 and GDF15. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 2271–2279.

Chen T. R. *Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes.* *Cytogenet. Cell Genet.*, 48: 19-24, 1988.

Chi-Chang Chang, Sun-Long Cheng, Chi-Jie Lu, and Kuo-Hsiung Liao. (2013). Prediction of Recurrence in Patients with Cervical Cancer Using MARS and Classification. *International Journal of Machine Learning and Computing*, Vol. 3, No. 1: 75-78.

Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.

Collins AR, Dusinská M and Horská A: Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochim Pol* 48: 611-614, 2001.

Comelli Júnior, E., Skinovski, J., Sigwalt, M.F., Branco, A.B., Luz, S.R., Baulé, C. D.P. 2010. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaiba (*Copaifera langsdorfii*) oil. *Acta Bras. Cir.* 25:362-367.

Dos Santos, A.O., Costa, M.A., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., da Veiga-Junior, V.F., de Souza Lima, M.M., Nakamura, C.V. 2011. *Leishmania amazonensis*: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp. Parasitol.* 129:145-151.

F.H. Kato, N.I. Viana, C.B. Santini, C.G. de Souza, R.C. Veneziani, S.R. Ambrósio, Assessment of the in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells, *Mutat. Res.* 749 (2012) 87–92.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.



Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136 (5), E359–E386 (2015). doi: 10.1002/ijc.29210.

Gomes, N.M., Rezende, C.M., Fontes, S.P., Matheus, M.E., Fernandes, P.D. 2007. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.* 109:486-492.

INCA. Estimate 2016: Incidence of cancer in Brazil [eletronic]. Rio de Janeiro: Brazilian National Cancer Institute; 2016. Last accessed November 13, 2016. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>

Klaes, R.; Friedrich, T.; Spitkovsky, D.; Ridder, R.; Rudy, W.; Petry, U.; Dallenbach-Hellweg, G.; Schmidt, D.; Von Knebel Doeberitz, M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.*, v.92(2), p.276-84, 2001.

*Landry JJ, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stütz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM: The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. G3 (Bethesda) 2013; 3(8): 1213-1224.*

Macville, M. *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* 59, 141–150 (1999).

*McCormack A, Fan JL, Duesberg M, Bloomfield M, Fiala C, Duesberg P. Individual karyotypes at the origins of cervical carcinomas. Molecular Cytogenetics, vol. 6, (2013).*

Moody, CA, Laimins, LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat. Rev. Cancer*, 10 (2010), pp. 550–560. doi: 10.1038/nrc2886.

Muller DK, Dias-da-Costa JS, Lus AMH, Olinto MTA. Cobertura do exame citopatológico do colo do útero na cidade de São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2008; 24(11):2511-20.

N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.

Nakagawa, JTT, Schirmer, J, Barbieri, M. Human Papillomavirus (HPV) and uterine cervical cancer. *Rev. Bras. Enferm*, 2010. 63(2): 307-311. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672010000200021>.

Paiva, L.A.F., Gurgel, L.A., Silva, R.M., Tome, A.R., Gramosa, N.V., Silveira, E.R., Santos, F.A., Rao, V.S.N. 2002. Antiinflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. *Vascul. Pharmacol.* 39:303-307.

Paul, P. *et al.* Novel action modality of the diterpenoid anisomelic acid causes depletion of E6 and E7 viral oncoproteins in HPV transformed cervical carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 89, 171–184 (2014).

Rivoire WA, Corleta HVE, Brum EC, Capp E. *Biologia molecular do câncer cervical*. *Rev Bras Saúde Mater Infant* 2006; 6: 447-451.

Silva J, Freitas TRO, Marinho JR, Speit G and Erdtmann B: An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genet Mol Biol* 23: 241-247, 2000.

Silva, J.J.D., Guimaraes, S.B., da Silveira, E.R., de Vasconcelos, P.R.L., Lima, G.G., Torres, S.M., de Vasconcelos, R.C. 2009. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischemia-reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic. Plast. Surg.* 33:104-109.

Speit G, Habermeier B, Helbig R. Differences in the response to mutagens between two V79 sublines, *Mutat. Res.* 325 (1994) 105–111.

Tappin, M.R.R., Pereira, J.F.G., Lima, L.A., Siani, A.C., Mazzei, J.L., Ramos, M.F.S. 2004. Quantitative chemical analysis for the standardization of copaiba oil by high resolution gas chromatography. *Quimica Nova.* 27:236-240.

Y.I. Bang, S.A. Im, K.W. Lee, J.Y. Cho, E.-K. Song, K.H. Lee, et al., Randomized, double-blind phase II trial with prospective classification by ATM protein level to evaluate the efficacy and tolerability of olaparib plus paclitaxel in patients with recurrent or metastatic gastric cancer, *J. Clin. Oncol.* 20 (2015) 3858– 3865.

Zhang et al. (2017)... Marine *Streptomyces* sp. derived antimycin analogues suppress HeLa cells via depletion HPV E6/ E7 mediated by ROS-dependent ubiquitin–proteasome system.

#### IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora se perceba uma transição na distribuição epidemiológica de neoplasias no Brasil, algumas delas insistem em permanecer sob altas taxas. É o caso do câncer de colo de útero, que assume o primeiro lugar em incidência na Região Norte, se não forem considerados os tumores de pele não melanoma. O estudo retrospectivo sobre exames de Papanicolau realizados na Casa da Mulher em Belém, Estado do Pará, permite observar um quadro semelhante a outros estados da federação, particularmente aqueles com grandes falhas de cobertura. Aumentar a cobertura de PCCU na população feminina é um objetivo imperioso, requerendo atuação profissional, além de participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida.

Em relação ao ácido caurenóico, surgem resultados promissores. Na realidade, há muito que o uso do oleorresina de Copaíba se mantém com forte tradição na medicina popular da Amazônia, com várias aplicações, incluindo ação anti-inflamatória, antiulcerogênica e antitumoral. O ácido caurenóico é um dos diterpenos bioativos presentes no óleo de Copaíba e, na presente análise, com as linhagens celulares HeLa e CaSki, promoveu maior transcrição dos supressores tumorais ATM, CHK e TP53; levou também à menor transcrição dos oncogenes MYC, CCND1, BCL-2, CASP3, além de P16; foi ainda capaz de inibir a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV, que interferem na regulação do ciclo das células hospedeiras. Mesmo tendo observados efeitos genotóxicos, os ensaios atuais apontam para possibilidade de uso do ácido caurenóico como matéria-prima na obtenção de agentes terapêuticos contra câncer cervical com presença de HPV, assim como sua utilização em futuras pesquisas sobre as funções de E6 e E7

## V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMONTE, M. et al. Nuevos paradigmas y desafíos em la prevención y control del câncer de cuello uterino en América Latina. *Salud pública Méx.* México, v. 52, n. 6, p. 544-549, 2010.

AYRES, A.R.G.; SILVA, G.A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. *Rev Saúde Pública.* v. 44, n. 5, p. 963-974, 2010.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BORGES, S.C.V.; MELO, V.H; MORTOZA, J.R.G.; ABRANCHES, A.; LIRA, N.; TRIGUEIRO, M.C. Taxa de detecção do papilomavírus humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v. 26, n. 2, p. 105-110, 2004.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.V. Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int.J.Cancer*, Genève, v. 52, n.5, p. 750-8, Nov. 1992.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical câncer, *J Clin Pathol*, 55(4):244-265,2002.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. **Conhecendo o Viva Mulher; Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama.** Rio de Janeiro. INCA, 2001b.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer**  
BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe técnico Campanha Nacional de Multivacinação para Atualização da Caderneta de Vacinação da Criança e do Adolescente.** Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe técnico da vacina papilomavírus 6, 11, 16 e 18 (recombinante).** Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Informe técnico sobre a vacina Papilomavírus Humano (HPV) na atenção básica.** Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota informativa nº 62-SEI/2017-CGPNI/DEVIT/SVS/MS.** Brasília, 2017.

BURD E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* v. 16, n.1, p. 1-17, 2003.

COMELLI JR., E.; SKINOVSKI, J.; SIGWALT, M.F.; BRANCO, A.B.; LUZ, S.R.; BAULÉ, C.D.P. Rupture point analysis of intestinal anastomotic healing in rats under the action of pure Copaíba (*Copaifera langsdorfii*) oil. *Acta Bras. Cir.* v. 25, p. 362-367, 2010.

COURSAGET, P. Serology for human papillomavirus. *Salud Publica Mex.* v. 45, p. 361-366, 2003.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, v. 9, p. 1-15, 2000.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.*, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRUM, C.P. Aparelho Genital Feminino. In: ROBBINS - *Patologia Estrutural e Funcional*, 5<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, p. 943-944, 1996.

DE VILLIERS, E.M.; FAUQUET C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17-27.

DEL NUNZIO, M. J. Óleo de Copaíba e seu emprego cosmético. *Aerosol Cosmet.*, v. 77, p. 7-9, 1995.

DERCHAIN, S. F. M. et al. Association of oncogenic human papillomavirus HPV-DNA with high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN 2 or 3): the role of cigarette smoking. *Sex. Transm. Infect.*, London, v. 75, n. 6, p. 406-8, Dec. 1999.

DOS SANTOS, A.O.; COSTA, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; DA VEIGA-JUNIOR, V.F.; DE SOUZA LIMA, M.M.; NAKAMURA, C.V. Leishmania amazonensis: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp. Parasitol.* v.129, p. 145-151, 2011.

FARNSWORTH, N.R. Medicinal plants in therapy. *Bull. WHO*, v.63, p. 965-981, 1985.

FONSECA, C.A.; PEREIRA, D.G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. *Rev. Pharm. Bras.*, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2004.

FRANCO, E.L. Chapter 13: Primary screening of cervical câncer with human papillomavirus tests. *J Natl Cancer Inst Monogr*, (31):89-96, 2003.

GARCIA-ESPINOSA, B.; NIETO-BONA, M.P.; RUEDA, S.; SILVA-SÁNCHEZ, L.F.; PIERNAS-MORALES, M.C.; CARRO-CAMPOS, P. Genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagn Pathol*. 2009;4(3):1-8.

- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. *J. Ethnopharmacol.* v. 109, p. 486-492, 2007.
- INCA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: Inca, 2011.118 p.
- Inca.gov.br/estimativa-2016-v11.pdf. Estimativa/2016. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, INCA, 2015
- INCA. **Nomenclatura brasileira para laudos citopatológicos cervicais**. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012.
- INCA. Coordenação de Prevenção e Vigilância, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>. Acesso em 07 Dez 2015.
- LEITE, A.M.C.; LLERAS, E. Áreas prioritárias na Amazônia para conservação dos recursos genéticos de espécies florestais nativas: fase preliminar. *Acta Botanica Brasilica*, v. 7, n. 1, p. 61-94, 1993.
- MARTINS, A.P.V. Visões do feminino: a medicina da mulher nos séculos XIX e XX. Rio de Janeiro: FIOCRUZ; 2004. [Coleção História e Saúde].
- MEDEIROS, R.D.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil, *For. Ecol. Manage.* 256 (2008) 282–288.
- MEDEIROS, V.C.D.; MEDEIROS, R.C.; MORAES, L.M.; MENEZES, J.B.F.; RAMOS, E.S.N.; SATURNINO, A.C.R. Câncer de colo de útero: análise epidemiológica e citopatológica no estado do Rio Grande do Norte. *Rev Bras Anal Clín.* 2005;37(4):227-31.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Viva Mulher. Câncer do Colo Uterino: informações técnico-gerenciais e ações desenvolvidas. Rio de Janeiro: INCA, 2002.
- MITCHELL, H.; DRAKE, M.; MEDLEY, G. Evolução prospectiva do risco de câncer cervical após evidência citológica de infecção pelo vírus do papiloma humano. *Lancet* 1986; 1: 573-5.
- MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos no Brasil. *Arq. Bras. Fitomed. Cient.* v. 1, p. 30-38, 2003.

MUKHERJEE, S. O Imperador de Todos os Males (Uma Biografia do Câncer), 1º ed., São Paulo: Companhia das letras, p. 340-360, 2012.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Re: cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 93, n. 17, p. 1349-50, Sept, 2001.

MURTA, E.F.C. et al. Câncer do colo uterino: Correlação com o início da atividade sexual e paridade. **Rev. Bras. de Ginecol. Obst.** v.21. n. 9, 1999.

MURTA, E. F. C. et al. Influência da idade materna, do período gestacional e do número de gestações na infecção pelo papilomavírus humano. **Rev. bras. ginecol. obstet.**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 33-5, 1998.

NOMELINI, R. S. et al. Utilization of human papillomavirus testing for cervical cancer prevention in a university hospital. **Cad. saúde pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 6, p. 309-18, jun. 2007.

OHSAKI, A.; YAN, L.T.; SHIGERU, I.; EDATSUGI, H.; IWATA, D.; KOMODA, Y. The isolation and *in vivo* potente antitumoractivityof clerodone diterpenoid from the oleoresin of Brazilian medicinal plant, *Copaifera langsdorffii* Desfon. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 4, p. 2889-2892, 1994.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL; L.A., SILVA, R.M.; TOME, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Antiinflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul. Pharmacol.** v. 39, p. 303-307, 2002.

PASSOS, M. R. L. et al. Papilomavírose humana em genital: parte I. **DST J. bras. doenças sex. transm.**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 108-24, 2008.

PEREYRA, E. A. G.; PARELLADA, C. I. Entendendo melhor a infecção pelo Papilomavírus Humano. São Paulo: Artmed, 2003.

PFISTER, H.; TER SCHEGGET, J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. **Clin Dermatol.** v. 15, p. 335-347, 1997.

- PINTO, A.P.; TULIO, S.; CRUZ, O.R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras*. v. 48, n.1, p.73-8, 2002.
- PIO CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, v. 2, 370-375.
- RAMA, C.H.; ROTELI-MARTINS, C.M.; DERCHAIN, S.F.M.; OLIVEIRA, E.Z.; ALDRIGHI, J.M.; MARIANI NETO, C. Detecção sorológica de anti-hpv 16 e 18 e sua associação com os achados do Papanicolau em adolescentes e mulheres jovens. *Rev Assoc Med Bras*. v. 52, n. 1, p. 43-47, 2006.
- ROCHA, C.A.M. As pernas do caranguejo: *cancer crura*. 1ª. ed. Belém; 2013. 114 p.
- SANKARANARAYANAN, R.; FERLAY, J. Worldwide burden of gynaecological cancer: the size of the problem. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* v. 20, p. 207-225, 2006.
- SARDANA, S. et al. Epidemiologic analysis of Trichomonas vaginalis infection in inflammatory smears. *Acta Cytol.*, Chicago, v. 38, n. 5, p. 693-7, Sep./Oct.1994.
- SCHEURER, M.E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:72746.
- SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P.E. Human Papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med*. v. 127, n. 8, p. 930-934, 2003.
- SESMA. Secretaria Municipal de Saúde. Belém, Pará, 2012. Disponível em <<http://www.belem.pa.gov.br/app/c2ms/v/?id=12&conteudo=2731>>. Acesso em 17 Set 2012.
- SILVA, M.J.PM.A.; GONÇALVES, A.K.S.; GIRALDO, P.C.; PONTES, A.C.; DANTAS, G.L.; SILVA, R.J.O.; SILVA, L.G.P. A eficácia da vacina profilática contra o HPV nas lesões HPV induzidas. *FEMINA*, v. 37, n. 10, 2009.
- SOUSA, M.S.; CANTO, A.S.S.; TSUTSUMI, M.Y.; MACIEL, M.C.; ZEFERINO, L.C. Perfil dos exames citológicos do colo do útero realizados no Laboratório Central do Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde*. v. 2, n.2, p. 27-32, 2011.
- TAPPIN, M.R.R.; PEREIRA, J.F.G.; LIMA, L.A.; SIANI, A.C.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.F.S. Análise química quantitativa para padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. *Quim. Nova*. v. 27, n. 2, p. 236-240, 2004.
- THOMISON, J.; THOMAS, L.K.; SHROYER, K.R. Humanpapillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Hum Pathol*, v. 39, n,2, p. 154-66, 2008.



TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz. J. Pharmac. Sci.*, v. 42, p. 289-306, 2006.

VALDIVIA, I.M.; AGUAYO, F.; PRUYAS, M.; SNIJDERS, P.J.F.; CORVALAN, A.; FERRECCIO, C. Genotipos de virus papiloma humano (VPH) en pacientes con cáncer cervico-uterino en un hospital público y una clínica privada de Santiago, Chile. *Rev Chil Infect.* v. 27, n. 1, p. 11-16, 2010.

WEINBERG, R. A. A Biologia do Câncer. Tradução de Bruna Selbach. Porto Alegre,RS: Artmed, 2008. 864 p.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **Cytological screening in the control of cervical cancer: technical guidelines**. Genebra, 1988.

WHO – WORLD HEALT ORGANIZATION. Programes and projects. Cancer. Screening and early detection of cancer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/cervical-cancer/en/index.html> Acesso em: 26 de mai. de 2017.

ZEFERINO, L.C.; DERCHAIN, S.F. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* v.20, n. 3, p. 339-354, 2006.

## **VI. ANEXOS**

**Tabela 1.** Distribuição dos exames citopatológicos, por faixa etária, a partir de informações registradas nos livros de controle de PCCU (2012 e 2013) da Casa da Mulher.

FAIXA ETÁRIA	2012				2013								TOTAL
	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	
<b>≤ 19 ANOS</b>	04	01	05	01	02	01	05	04	06	01	02	02	<b>34</b>
<b>20 A 29 ANOS</b>	27	19	21	09	30	15	35	20	18	14	07	25	<b>240</b>
<b>30 A 39 ANOS</b>	27	52	34	23	34	25	49	48	31	35	36	36	<b>430</b>
<b>40 A 49 ANOS</b>	47	60	52	39	48	35	64	76	54	33	27	40	<b>575</b>
<b>50 A 59 ANOS</b>	49	39	44	34	63	43	60	52	42	42	50	60	<b>578</b>
<b>≥ 60 ANOS</b>	25	24	40	29	33	21	24	27	26	26	28	42	<b>345</b>
<b>TOTAL</b>	179	195	196	135	210	140	237	227	177	151	150	205	<b>2202</b>

## Perfil dos exames citopatológicos do colo do útero realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, Brasil

Profiles of cervical screening tests performed in Casa da Mulher, Pará State, Brazil

Perfil de los exámenes citopatológicos de cuello de útero realizados en la Casa da Mulher, Estado de Pará, Brasil

Sílvia Maria Machado da Rocha  
Curso de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil  
Centro de Atenção à Saúde da Mulher, Secretaria Municipal de Saúde de Belém, Belém, Pará, Brasil

Carlos Alberto Machado da Rocha  
Departamento de Ensino, Recursos Naturais, Design e Infraestrutura, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, Pará, Brasil

Marcelo de Oliveira Bahia  
Laboratório de Citogenética Humana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

### RESUMO

O câncer cervical costuma apresentar progressão lenta e silenciosa, mantendo-se entre os mais incidentes no Brasil. Seu rastreamento é realizado pelo exame de Papanicolaou, o qual, além da detecção precoce do câncer, permite a pesquisa de agentes infecciosos. Procedeu-se um estudo retrospectivo analítico sobre os resultados do exame de Papanicolaou realizado na Casa da Mulher em Belém, Estado do Pará, Brasil, de setembro de 2012 a agosto de 2013, com dados dos livros de preventivos do câncer de colo do útero (PCCU). No período, foram realizados 2.202 exames PCCU na Casa da Mulher, a maior parte destes (52,36%) proveniente de mulheres na faixa dos 40 a 60 anos de idade. A faixa etária na amostra apresentou fraca correlação positiva ( $r_s = 0,1429$ ) com a frequência de achados microbiológicos e fraca correlação negativa ( $r_s = -0,2571$ ) com a frequência de alterações citopatológicas. Os achados microbiológicos foram identificados em três espécies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida* sp. (12,44%) e *Trichomonas vaginalis* (0,68%). A prevalência de anormalidades citológicas nos exames foi de 5,72%, não diferindo significativamente ( $p = 0,7546$ ) das relatadas em outras publicações. As atipias celulares de significado indeterminado corresponderam a 2,679%, ficando abaixo da faixa estimada pelo Instituto Nacional de Câncer. A proporção total das lesões neoplásicas potencialmente malignas (lesão escamosa intraepitelial de alto grau e carcinoma) foi de 1,09%, com maior frequência na faixa etária de 30 a 39 anos. O aumento da cobertura de PCCU na população feminina precisa ser alcançado e a promoção da saúde deve ser efetivada por meio de parcerias intersetoriais, participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida.

**Palavras-chave:** Saúde Pública; Prevenção Secundária; Teste de Papanicolaou; Neoplasias do Colo Uterino.

### INTRODUÇÃO

Nas décadas mais recentes presenciamos uma transição na distribuição epidemiológica de neoplasias no Brasil. Ao mesmo tempo em que aumenta a incidência de alguns tipos de câncer geralmente associados ao elevado status socioeconômico (câncer de mama, próstata, cólon e reto), verifica-se a persistência de altas taxas de neoplasias normalmente associadas com a pobreza (câncer de colo uterino, pênis, estômago e cavidade oral)<sup>1</sup>.

A estimativa para 2016/2017 no Brasil aponta para aproximadamente 576.000 casos novos de câncer. O câncer de pele do tipo não melanoma (175.760 casos novos) será o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata (61.200), mama feminina (57.960), cólon e reto (34.280), pulmão (28.220), estômago (20.520) e colo do útero (16.340). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer cervical é o mais incidente na Região Norte do Brasil (23,97/100.000 habitantes)<sup>2</sup>.

A prevenção secundária do câncer relaciona-se à detecção de lesões pré-malignas ou malignas iniciais na ocasião em que o tratamento é potencialmente curativo. O teste de Papanicolaou representa a principal estratégia em programas de rastreamento para o controle do câncer cervical<sup>2</sup>. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma cobertura da população-alvo de no mínimo 80% e a garantia

### Correspondência / Correspondence / Correspondencia:

Sílvia Maria Machado da Rocha  
Centro de Atenção à Saúde da Mulher (Casa da Mulher)  
Tv. Bom Jardim, 370. Bairro: Cidade Velha  
CEP: 66023-140 Belém-Pará-Brasil  
Tel.: +55 (91) 3242-0642  
E-mail: silviamarochada2@gmail.com

de diagnóstico e tratamento adequados dos casos alterados possibilitam reduzir em 60% a 90% a incidência de câncer uterino invasivo<sup>4</sup>. Entretanto, a maioria das capitais brasileiras não consegue atingir essa meta<sup>5</sup>.

Nos países desenvolvidos, a taxa de mortalidade por câncer uterino diminuiu mais de 80% entre 1930 e 2012, principalmente devido à assimilação generalizada do teste de Papanicolaou para a prevenção e detecção precoce do câncer cervical<sup>6</sup>. Contudo, nos países em desenvolvimento, ainda não foram alcançadas as metas de redução do número de casos.

A Casa da Mulher é uma unidade de referência secundária em oncologia mamária e ginecológica, mantida pela Prefeitura Municipal de Belém, Estado do Pará. A instituição recebe mulheres das Unidades Básicas de Saúde e Família Saudável, e realiza exames, como o Papanicolaou, para detecção precoce do câncer. Caso a neoplasia seja confirmada, a paciente é encaminhada ao hospital de referência terciária para tratamento<sup>7</sup>.

O exame de Papanicolaou permite também detectar sinais de inflamações da vulva e da vagina, contribuindo no rastreamento e detecção de vulvovaginites<sup>8</sup>. Entre as principais causas de queixas de mulheres que procuram atendimento na área de ginecologia estão as inflamações e infecções vaginais. Com frequência, nos preventivos do câncer de colo do útero (PCCU), são encontrados agentes infecciosos como o vírus Papilomavírus Humano (HPV) e a bactéria *Gardnerella vaginalis*.

O presente estudo teve como objetivo identificar o perfil de todos os achados microbiológicos e citopatológicos nos exames realizados pelo laboratório da Casa da Mulher, em Belém, durante o período de um ano.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Procedeu-se a um levantamento retrospectivo analítico dos resultados de exames PCCU realizados na Casa da Mulher, de setembro de 2012 a agosto de 2013. A coleta dos dados foi feita nos livros de PCCU dos anos de 2012 e 2013. As informações foram resumidas e apresentadas de acordo com a faixa etária e quanto à realização prévia do PCCU.

A publicação Nomenclatura Brasileira para Laudos Cervicais e Condutas Preconizadas: Recomendações para Profissionais de Saúde<sup>9</sup> foi usada para classificar os resultados dos exames citopatológicos. Nesta análise, foram considerados negativos tanto os resultados classificados como normais quanto os inflamatórios. Na microbiologia foram analisadas as frequências de bactérias, leveduras e protozoários.

Os resultados que apresentaram alterações citológicas foram organizados em uma tabela na qual foram utilizadas siglas, a saber: LSIL = *low-grade squamous intra epithelial lesion* (lesão escamosa intraepitelial de baixo grau); HSIL = *high-grade squamous intra epithelial lesion* (lesão escamosa intraepitelial de alto grau); ASC-US = *atypical*

*squamous cells of undetermined significance* (atípia escamosa de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica); ASC-H = *atypical squamous cells cannot exclude HSIL* (atípia escamosa de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau); AGC-US = *atypical glandular cells of undetermined significance* (atípia glandular de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica); AGC-H = *atypical glandular cells cannot exclude high-grade glandular lesion* (atípia glandular de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau); CA = carcinoma.

O software BioEstat v5.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; Belém, Pará, Brasil) foi utilizado para as análises estatísticas: o coeficiente de correlação de Spearman ( $r_s$ ) para analisar correlação entre a idade das pacientes e as alterações encontradas; o teste do qui-quadrado para comparar frequências de exames alterados desta amostra com dados da literatura pertinente.

A pesquisa teve o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP/ICS/UFPa) em 30 de junho de 2014 (CAAE 32587514.2.0000.0018).

## RESULTADOS

No período de setembro de 2012 a agosto de 2013, foram realizados 2.202 exames PCCU na Casa da Mulher, a maior parte desses (52,36%) proveniente de mulheres na faixa dos 40 a 60 anos de idade. Por outro lado, 31,97% e 15,67% foram, respectivamente, de mulheres com menos de 40 e mais de 60 anos de idade (Tabela 1). Dessa amostra, apenas 20 mulheres nunca haviam realizado o PCCU. A faixa etária das pacientes apresentou apenas uma fraca correlação positiva ( $r_s = 0,1429$ ) com a frequência de achados microbiológicos e uma fraca correlação negativa ( $r_s = -0,2571$ ) com a frequência de alterações citopatológicas.

**Tabela 1** – Frequência dos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, Brasil, de setembro de 2012 a agosto de 2013, e frequência de mulheres que responderam nunca ter realizado o PCCU, por faixa etária

Faixa etária (anos)	Exames realizados		Não fizeram PCCU anteriormente	
	N	%	N	%
≤ 19	34	1,54	6	30
20–29	240	10,89	3	15
30–39	430	19,54	1	5
40–49	575	26,11	4	20
50–59	578	26,25	4	20
≥ 60	345	15,67	2	10
Total	2.202	100,00	20	100

**Tabela 2** – Frequências das alterações citológicas encontradas nos exames PCCU realizados na Casa da Mulher, Estado do Pará, Brasil, de setembro de 2012 a agosto de 2013

Faixa etária (anos)	ASC-US	ASC-H	AGC-US	AGC-H	LSIL	HSIL	CA	Total
≤ 19	–	–	–	–	2	–	–	2
20–29	3	–	–	1	6	2	–	12
30–39	10	1	–	–	7	13	1	32
40–49	20	1	1	–	12	1	1	36
50–59	12	–	–	–	9	3	–	24
≥ 60	10	–	–	–	7	3	–	20
N	55	2	1	1	43	22	2	126
% na amostra	2,497	0,091	0,045	0,045	1,952	0,999	0,091	5,720

ASC-US: atipia escamosa de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica; ASC-H: atipia escamosa de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau; AGC-US: atipia glandular de significado indeterminado, possivelmente não neoplásica; AGC-H: atipia glandular de significado indeterminado, não afastando lesão de alto grau; LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau; HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau; CA: carcinoma; N: número total de exames que apresentaram anormalidades citológicas, por tipo de atipia. Sinal convencional utilizado: – Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento.

Nas análises microbiológicas foram identificadas três espécies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida* sp. (12,44%) e *Trichomonas vaginalis* (0,68%). A tabela 2 resume os resultados relativos à citopatologia, cuja prevalência de anormalidades foi de 5,72%. As ASC, identificadas em 2,588% dos exames, foram as alterações com maior incidência.

## DISCUSSÃO

Coelho et al<sup>10</sup> analisaram os resultados dos exames do Município de Floriano, Estado do Piauí, no ano de 2004, e, quanto à microbiologia, evidenciaram a presença das bactérias *G. vaginalis* (21,67%) e *Leptothrix* sp. (3,37%), além de *Candida* sp. (16,70%) e *T. vaginalis* (22,38%). Em comparação aos resultados do presente estudo, não houve diferença significativa quanto às frequências de *G. vaginalis* e *Candida* sp. ( $p = 0,5847$ ), porém foi altamente significativa quanto à frequência de *T. vaginalis* ( $p = 0,0001$ ). Segundo os mesmos autores, a ausência ou a baixa frequência de *T. vaginalis* favorece a análise citológica, pois a infecção pelo protozoário poderia interferir no diagnóstico de atipias de significado indeterminado. As frequências de *G. vaginalis* e *Candida* sp. encontradas por Lessa et al<sup>11</sup>, em mulheres privadas de liberdade, no Estado do Ceará, também não diferiram dos resultados desse estudo ( $p = 0,3631$ ).

A prevalência de anormalidades citopatológicas no presente estudo (5,72%) não difere significativamente ( $p = 0,7546$ ) das relatadas em diversas publicações recentes, como Nobre e Lopes Neto<sup>12</sup> no Amazonas (1% a 5%), Sousa et al<sup>13</sup> no Pará (4,05%), Coelho et al<sup>10</sup> no Piauí (5,32%) e Fonseca et al<sup>14</sup> em Roraima (7%). Embora a porcentagem de anomalias citopatológicas nos prontuários de presidiárias reclusas no Ceará<sup>11</sup> tenha sido um pouco maior (9,8%), não chegou a ser estatisticamente diferente dos resultados do presente estudo.

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, as atipias escamosas de significado indeterminado representam

a variedade de atipia mais comumente descrita nos laudos citopatológicos do colo uterino, ficando entre 3,5% e 5% do total de exames realizados<sup>9</sup>. No presente levantamento, a frequência ficou abaixo da média nacional. Entretanto, Sousa et al<sup>13</sup> encontraram frequência ainda menor (1,45%) para essas atipias nos exames PCCU provenientes de 16 municípios paraenses realizados no ano de 2008 e analisados no Laboratório Central do Estado do Pará (Lacen-PA).

Na tabela 2 também são apresentadas as frequências de LSIL (1,952%), HSIL (0,999%) e carcinoma (0,091%). A proporção de lesões neoplásicas potencialmente malignas (HSIL e carcinoma) foi mais elevada em mulheres da faixa de 30 a 39 anos de idade, todas com exame prévio alterado – seja por atipia de significado indeterminado ou lesão intraepitelial.

Há ainda carência na literatura de análises que avaliem o coeficiente de correlação entre a faixa de idade das pacientes e a ocorrência de alterações citopatológicas. A partir dos resultados de Sousa et al<sup>13</sup>, foi efetuada a estatística, encontrando uma correlação negativa moderada ( $r_s = -0,4286$ ). No levantamento também observou-se correlação negativa, embora fraca ( $r_s = -0,2571$ ). Possivelmente, a diminuição da frequência de alterações com o aumento da idade nas amostras está relacionada tanto a uma vida sexual menos ativa, quanto à maior preocupação na busca de acompanhamento especializado por parte das pacientes de idades mais avançadas.

Em relação à cobertura, observou-se uma proporção de 99,09% de mulheres que relataram já ter realizado PCCU previamente. Entretanto, o que levou a maioria das pacientes da amostra à Casa da Mulher foi um exame alterado feito na Rede Básica de Saúde, de modo que a cobertura obtida não representa a real situação das mulheres em Belém.

Análises da relação do Índice de Desenvolvimento Humano com a realização de mamografia e do exame de Papanicolaou nas capitais brasileiras e Distrito Federal, em 2011, demonstraram que foram dez as capitais brasileiras que atingiram a meta de 80% para realização do Papanicolaou em algum momento da vida e apenas sete para os últimos três anos<sup>9</sup>. A capital paraense não apareceu entre as que atingiram a meta.

A promoção da saúde deve ser efetivada por meio de parcerias intersetoriais, participação popular e responsabilização coletiva pela qualidade de vida. Ainda assim, os profissionais de saúde devem conduzir a mulher no sentido de sensibilizá-la ao ato de realizar o exame preventivo, tomando uma

preocupação presente no cotidiano e em suas práticas de saúde<sup>12</sup>.

## CONCLUSÃO

A falha na cobertura do exame PCCU em Belém vem sendo registrada na literatura e os resultados obtidos na Casa da Mulher, de setembro de 2012 a agosto de 2013, identificaram anormalidades citopatológicas com prevalência semelhante às observadas em outras cidades que também não atingiram a metade da cobertura de 80% estabelecida pela OMS. A ampliação na cobertura do exame PCCU, no sentido da promoção da saúde da mulher, exige não apenas as atividades e decisões individuais, mas também o engajamento e interesse da sociedade civil e do Estado.



## Profiles of cervical screening tests performed in Casa da Mulher, Pará State, Brazil

### ABSTRACT

Cervical cancer usually has silent and slow progression, remaining to be among the most incident cancers in Brazil. Its screening is performed by Pap test which besides detects cancer previously, allows the research of infection agents. A retrospective analytical study about the results of Pap test was conducted in Casa da Mulher, Pará State, Brazil from September 2012 to August 2013 with data from books of prevention of cervical cancer (PCC). During that period, 2,202 PCC tests were carried out at Casa da Mulher, most of them (52.36%) from women aged of 40 to 60 years old. The age group in the sample showed a weak positive correlation ( $r = 0.1429$ ) with the frequency of microbiological findings and weak negative correlation ( $r = -0.2571$ ) with the frequency of cytological changes. Microbiological findings were identified in three species: *Gardnerella vaginalis* (23.48%), *Candida* sp. (12.44%) and *Trichomonas vaginalis* (0.68%). The prevalence of cytological abnormalities in tests was 5.72% and did not differ significantly ( $p = 0.7546$ ) from the reported ones in other publications. Atypia cells of undetermined significance corresponded to 2.679%, below the range estimated by Brazilian National Cancer Institute. The total proportion of potentially malignant neoplastic lesions (high-grade squamous intra epithelial lesion and carcinoma) was 1.09%, and it is most frequently between the ages of 30 to 39 years old. The increase in PCC examinations in the female population needs to be achieved and health promotion should be done by intersectoral partnerships, community participation and collective responsibility for the quality of life.

**Keywords:** Public Health; Secondary Prevention; Papanicolaou Test; Uterine Cervical Neoplasms.

## Perfil de los exámenes citopatológicos de cuello de útero realizados en la Casa da Mulher, Estado de Pará, Brasil

### RESUMEN

El cáncer cervical suele presentar una progresión lenta y silenciosa, y se mantiene entre los más incidentes en Brasil. Se rastrea con el examen de Papanicolaou, el cual, además de la detección precoz del cáncer, permite el estudio de agentes infecciosos. Se procedió a un estudio retrospectivo analítico sobre los resultados del examen de Papanicolaou realizado en la Casa da Mulher en Belém, Estado de Pará, Brasil, de setiembre de 2012 a agosto de 2013, con datos de los libros de preventivos de cáncer de cuello de útero (PCCU). En el período, se realizaron 2.202 exámenes PCCU en la Casa da Mulher, la mayor parte (52,36%) proveniente de mujeres entre los 40 y los 60 años de edad. El grupo etario de la muestra presentó una pequeña correlación positiva ( $r_s = 0,1429$ ) con la frecuencia de hallazgos microbiológicos y una también pequeña correlación negativa ( $r_s = -0,2571$ ) con la frecuencia de alteraciones citopatológicas. Los hallazgos microbiológicos fueron identificados en tres especies: *Gardnerella vaginalis* (23,48%), *Candida* sp. (12,44%) y *Trichomonas vaginalis* (0,68%). La prevalencia de anormalidades citológicas en los exámenes fue de 5,72%, no difiriendo significativamente ( $p = 0,7546$ ) de las relatadas en otras publicaciones. Las atipias celulares de significado indeterminado correspondieron a 2,679%, por debajo de la franja estimada por el Instituto Nacional del Cáncer. La proporción total de las lesiones neoplásicas potencialmente malignas (lesión escamosa intraepitelial de alto grado y carcinoma) fue de 1,09%, con mayor frecuencia en el grupo etario de 30 a 39 años. Es necesario que se aumente la cobertura del PCCU en la población femenina y que la promoción de la salud sea efectiva a través de colaboraciones intersectoriales, participación popular y responsabilidad colectiva por la calidad de vida.

**Palabras clave:** Salud Pública; Prevención Secundaria; Prueba de Papanicolaou; Neoplasias del Cuello Uterino.



## REFERÊNCIAS

- 1 Koifman S, Koifman R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res.* 2003 Nov;544(2-3):305-11.
- 2 Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [citado 2015 dez 7]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>.
- 3 Rocha CAM. As pernas do caranguejo: cancer crura. Belém: [editora desconhecida]; 2013. 114 p.
- 4 World Health Organization. National cancer control programmes: policies and managerial guidelines. 2th ed. Geneva: WHO; 2002.
- 5 Sadovalsky ADI, Paton WL, Reis-Santos B, Barcelos MRB, Silva ICM. Índice de Desenvolvimento Humano e prevenção secundária de câncer de mama e colo do útero: um estudo ecológico. *Cad Saude Publica.* 2015 jul;31(7):1539-50.
- 6 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30.
- 7 Prefeitura de Belém. Rede de Serviços Intersetoriais do Município de Belém: pacto do acolhimento Belém pela vida [Internet]. Belém: Prefeitura de Belém; 2015 [citado 2016 jul 12]. Disponível em: [http://agenciabelem.com.br/arquivos/BEL%C3%89M%20PELA%20VIDA%20-%20GUIA%20INTERSETORIAL-%20Med%20a4%20\(em%20andamento\).pdf](http://agenciabelem.com.br/arquivos/BEL%C3%89M%20PELA%20VIDA%20-%20GUIA%20INTERSETORIAL-%20Med%20a4%20(em%20andamento).pdf).
- 8 Stuczynsky JV, Naud P, Matos JC. Vulvovaginites e cervicitis. In: Pasqualotto AC, Schwarzbald AV, organizadores. Doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2006. p. 342-4.
- 9 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA; 2006.
- 10 Coelho CMC, Verde RMCL, Oliveira EH, Soares LF. Perfil epidemiológico de exames citopatológicos realizados no LF de Floriano, Piauí. *Rev Bras Farm.* 2014 mar;95(1):459-73.
- 11 Lessa PRA, Ribeiro SG, Lima DJM, Nicolau AIO, Damasceno AKC, Pinheiro AKB. Presença de lesões intraepiteliais de alto grau entre mulheres privadas de liberdade: estudo documental. *Rev Latino-Am Enferm.* 2012 mar-abr;20(2):354-6.
- 12 Nobre JCAA, Lopes Neto D. Avaliação de indicadores de rastreamento do câncer do colo do útero no Amazonas, Norte do Brasil, de 2001 a 2005. *Rev Bras Cancerol.* 2009 jul-set;55(2):213-20.
- 13 Sousa MS, Canto ASS, Tsutsumi MY, Maciel MC, Zeferino LC. Perfil dos exames citológicos do colo do útero realizados no Laboratório Central do Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2011 jun;2(2):27-32.
- 14 Fonseca AJ, Murari RSW, Moraes IS, Rocha RF, Ferreira LCL. Acurácia dos exames citológicos cervicovaginais em estado de elevada incidência de câncer de colo de útero. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014 ago;36(8):347-52.
- 15 Silva SED, Vasconcelos EV, Santana ME, Rodrigues ILA, Mar DF, Carvalho FL. Esse tal Nicolau: representações sociais de mulheres sobre o exame preventivo do câncer cérvico-uterino. *Rev Esc Enferm USP.* 2010 set;44(3):554-60.

Recebido em / Received / Recibido en: 24/12/2015  
 Aceito em / Accepted / Aceptado en: 5/7/2016