

Análise imunocitoquímica da expressão de S100A4 em amostras cervicais normais, inflamatórias e com lesões precursoras do câncer cervical

Débora Renz Barreto Vianna, Diogo André Pilger

Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS

INTRODUÇÃO

A identificação de lesões precursoras do câncer de colo uterino é essencial para o prognóstico da doença, favorecendo a cura das mulheres acometidas. A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), agente etiológico mais relacionado à carcinogênese cervical, resulta em alterações na expressão gênica. A proteína S100A4 é fisiologicamente expressa em diversos tipos celulares e o aumento de sua expressão tem sido associado à capacidade de progressão e metástase de variados tumores. A pesquisa de biomarcadores para identificação de lesões precursoras pode contribuir para a redução da alta morbimortalidade resultante do diagnóstico tardio.

OBJETIVO

Avaliar a variação da expressão de S100A4 em esfregaços cervico-vaginais normais, inflamatórios e com lesões intraepiteliais, relacionando essa proteína com a presença do HPV.

METODOLOGIA

As pacientes em consultas ginecológicas de rotina participantes da pesquisa responderam um questionário e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Então, as amostras de esfregaço cervico-vaginal foram coletadas com escova *citobrush* e submetidas a três diferentes técnicas:

Análise Citológica

- Disposição em lâminas comuns para microscopia;
- Fixação em álcool etílico;
- Coloração de Papanicolaou;
- Finalização com bálsamo do Canadá e lamínulas;
- Classificação pelo Sistema Bethesda 2001.

Análise Imunocitoquímica

- Disposição em lâminas silanizadas para microscopia;
- Fixação em álcool etílico;
- Incubação em tampão citrato, peróxido de hidrogênio e anticorpo primário anti-S100A4;
- Incubação com anticorpo secundário biotilado, enzima peroxidase e revelador de diaminobenzidina (DAB) do *kit Starr Trek Universal HRP Detection (Biocare Medical)*;
- Contra-coloração dos núcleos com hematoxilina de Harris, amônia e concentrações crescentes de álcool;
- Clarificação com xilol;
- Finalização com bálsamo do Canadá e lamínulas;
- Fotografia dos campos microscópicos e classificação da intensidade de marcação das células pelo sistema de cruzes.

Deteção de HPV de Alto e Baixo Risco

- Armazenamento em meios líquidos de coleta;
- Extração de DNA;
- Reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers MY09/MY11;
- Eletroforese em gel de agarose 1,5%;
- Leitura em fotodocumentador.

Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.

RESULTADOS

Observou-se que em amostras com citologia normal a expressão de S100A4 diminui conforme aumenta a maturação celular (Fig. 1, 2A e 2B), possivelmente devido à perda da capacidade proliferativa.

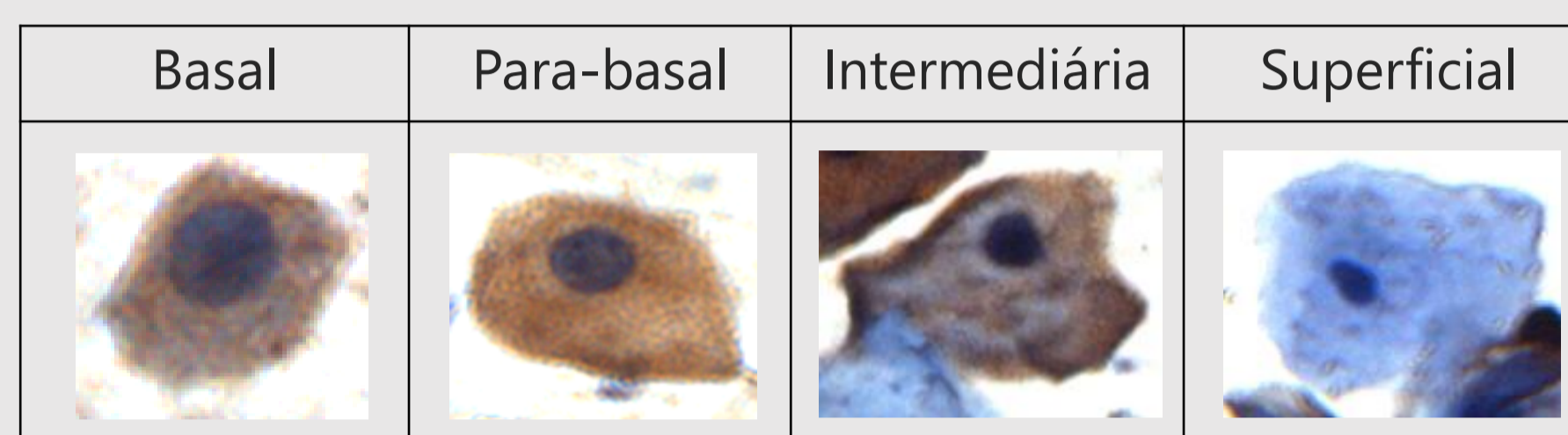


Figura 1. Padrão de marcação de S100A4 em amostras com citologia normal demonstrado através de fotografias em microscopia óptica de células com diferentes graus de maturação do epitélio da ectocérvice. Aumento de 1000x.

Em amostras com citologia inflamatória, viu-se uma elevada expressão da proteína (Fig. 2C e 2D), o que pode ser explicado pela participação da S100A4 no processo inflamatório. Porém, em amostras de lesões intraepiteliais com positividade para HPV, houve uma redução na expressão da proteína (Fig. 2E e 2F), provavelmente devido à hipermetilação do DNA causada pela infecção pelo HPV, que resultaria no silenciamento dessa proteína.

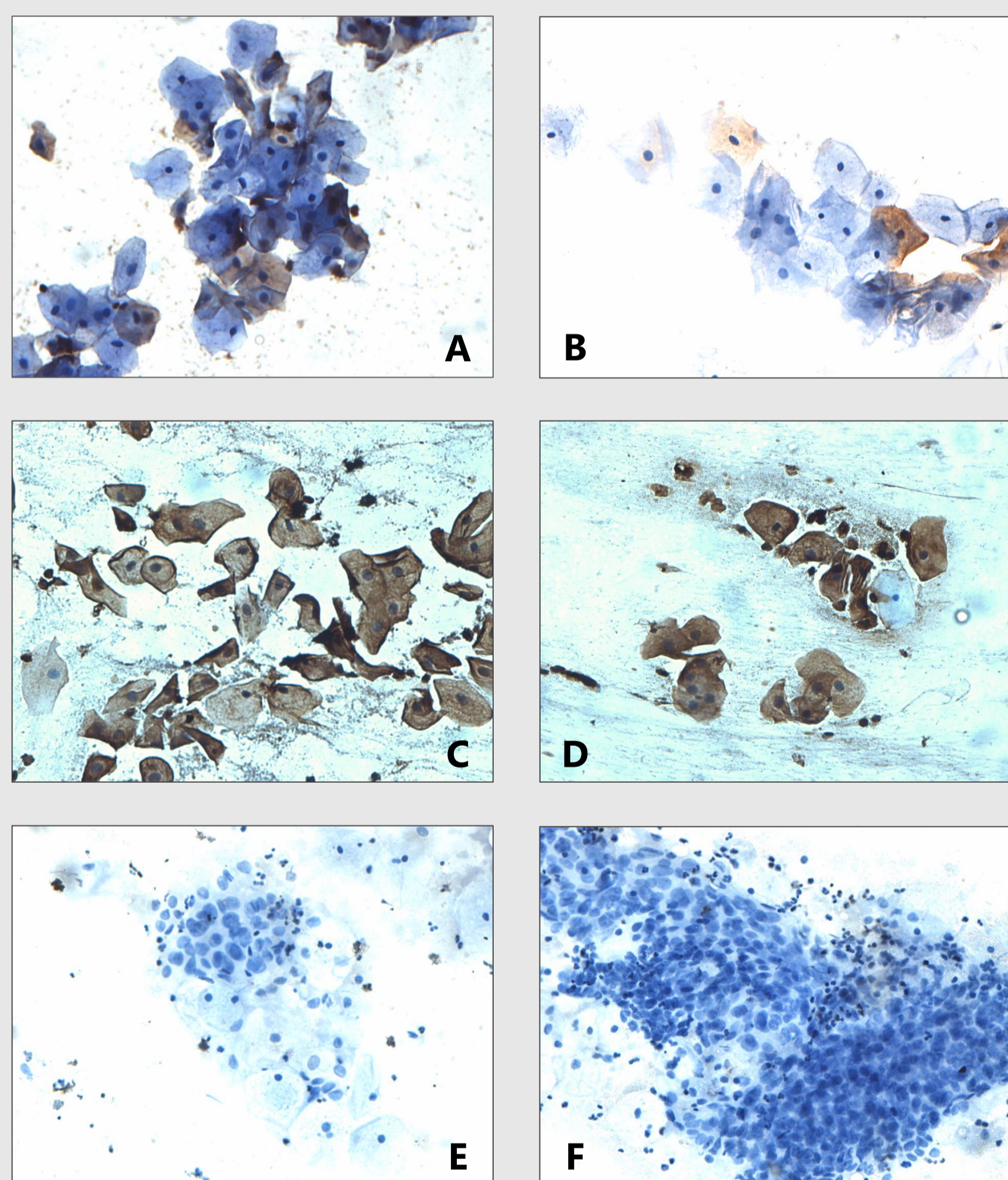


Figura 2. Padrões de expressão de S100A4 observados nos três tipos citológicos avaliados: Dentro dos Limites da Normalidade (A e B), Reativo Inflamatório (C e D) e Lesões de Baixo Grau (E) e de Alto Grau (F). Aumento de 400x.

CONCLUSÃO

A análise da expressão da proteína S100A4 poderia auxiliar no diagnóstico das lesões intraepiteliais precursoras do câncer de colo do útero, sendo utilizada como ferramenta complementar ao exame citológico preventivo, por atuar como um potencial biomarcador de exposição ao HPV e de lesão intraepitelial.