



| | |
|-------------------|--|
| Evento | Salão UFRGS 2014: SIC - XXVI SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS |
| Ano | 2014 |
| Local | Porto Alegre |
| Título | Validação da técnica de imunocitoquímica para avaliação da expressão da proteína S100A4 em amostras cervicais. |
| Autor | DEBORA RENZ BARRETO VIANNA |
| Orientador | DIOGO ANDRE PILGER |

Introdução: O câncer de colo de útero é a terceira neoplasia mais frequente em mulheres e corresponde à quarta principal causa de morte da população feminina no Brasil, segundo o INCA. A chance de cura dessa doença é muito promissora em pacientes que têm o diagnóstico precoce e são submetidas ao tratamento adequado. A S100A4 é uma proteína da família S100 e o aumento na sua expressão está relacionado à progressão e à metástase de diversos tipos de câncer, entre eles o cervical. A expressão dessa proteína em células epiteliais do colo uterino pode ser grande aliada na identificação da evolução da lesão do tecido e, conseqüentemente, possibilita um diagnóstico precoce da doença. **Objetivo:** Validar a metodologia de imunocitoquímica para avaliar a expressão da proteína S100A4 diretamente de amostras de esfregaço cervical. **Metodologia:** As amostras de esfregaço cervical foram coletadas com escova *citobrush* e dispostas em duas lâminas – uma comum para avaliação citológica e outra silanizada para análise da expressão de S100A4, ambas fixadas com álcool. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da UFRGS sob nº 562.824. Para análise citológica, as amostras foram coradas através da metodologia de Papanicolaou e classificadas de acordo com o Sistema Bethesda 2001. Para análise imunocitoquímica da S100A4, após lavagens com água destilada e tampão fosfato salino (PBS), as lâminas silanizadas foram incubadas em tampão citrato e, em seguida, em peróxido de hidrogênio 5%. Seguiu-se com incubação com o reagente *Background Sniper* e, posteriormente, com o anticorpo primário *Polyclonal Rabbit Anti-Human S100A4*. As lâminas permaneceram incubadas *overnight* em câmara úmida, escura e refrigerada a 4°C com o anticorpo diluído em PBS. Então, foram realizadas sucessivas lavagens para incubação em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário biotilado e a enzima peroxidase, do *kit Starr Trek Universal HRP Detection – Biocare Medical*. Após, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com solução reveladora de *Betazoid Diaminobenzidin (DAB) Chromogen*. Em seguida, foram realizadas a hidratação das amostras com água destilada, a contra-coloração dos núcleos com Hematoxilina de Harris, amônia e concentrações crescentes de álcool, e a posterior clarificação com xilol. Por fim, as lâminas foram montadas com Bálsamo do Canadá e lamínulas. As lâminas foram, então, observadas em microscopia óptica e a intensidade da coloração amarelo-dourado nas células, resultante da marcação da proteína S100A4, foi avaliada. Os campos visualizados foram fotografados e classificados, de acordo com a quantidade de células coradas e a intensidade de sua marcação, como: ausência de coloração (-), marcação fraca (+), marcação moderada (++) e marcação intensa (+++). Como controle positivo, foram utilizadas células de linhagens imortalizadas de queratinócitos e câncer cervical, HaCaT e SiHa, respectivamente, as quais expressam a proteína S100A4 conforme já descrito na literatura. Como controle negativo da técnica, amostras e linhagens não foram incubadas com o anticorpo, somente com PBS. **Resultados Parciais:** Foi possível observar que a marcação imunocitoquímica da proteína S100A4 se apresentou de maneira heterogênea, com variação na intensidade de coloração nas células dos diferentes casos. As duas linhagens estudadas expressaram a proteína, sendo que na SiHa houve expressão nuclear e citoplasmática, essa última classificada como marcação de moderada (++) à intensa (+++) na maioria dos campos visualizados. No entanto, houve expressão citoplasmática de forma reduzida na HaCaT, sendo classificada como marcação moderada (++) . Dentre as amostras cervicais analisadas até o momento, as quais se enquadram como negativas para lesão intra-epitelial de acordo com o Sistema Bethesda, constatou-se que a expressão da S100A4 varia de acordo com o grau de maturação das células do epitélio escamoso estratificado, sendo mais expressa nas células epiteliais imaturas. Também foi observado que a expressão da referida proteína é mais intensa na presença de alterações celulares inflamatórias benignas. Os resultados obtidos, que corroboraram com as expectativas propostas, poderão ser utilizados como padrão de comparação para futuras análises com pacientes, através das quais será possível estabelecer se a S100A4 poderá atuar como biomarcadora da progressão tumoral.