

Estratégias de melhoria do rastreamento do câncer cervical e marcadores moleculares aplicáveis ao SUS

Júlia Biz Willig, Andréia Buffon

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

Introdução

O exame citológico cervical é atualmente a estratégia de rastreamento recomendada pelo Ministério da Saúde, entretanto apresenta limitações. O papiloma Vírus Humano (HPV) é o agente etiológico envolvido na grande maioria dos casos de lesões epiteliais pré-malignas e malignas do colo uterino, sendo o DNA do vírus detectado em 95 a 100% dos casos. O diagnóstico molecular do HPV tem como objetivo a detecção precoce da presença do vírus, antes mesmo do aparecimento de alterações celulares passíveis de visualização microscópica. A Infecção por *Chlamydia trachomatis*, pode aumentar a susceptibilidade ao HPV, fazendo com que microlesões facilitem a entrada de partículas virais. Além disso, vários processos celulares podem ser inferidos por meio da análise de características morfométricas nucleares, incluindo as alterações celulares observadas nas lesões precursoras do câncer de colo de útero.

Objetivo

Validação e análise da implementação da análise morfométrica nuclear (NMA) em complemento à citologia convencional e de um programa de triagem molecular para agentes infecciosos relacionados ao colo uterino como ferramentas diagnósticas aliadas ao exame preventivo do câncer de colo uterino aplicáveis ao SUS.

Metodologia

As amostras foram coletadas em UBS na cidade de Porto Alegre, durante consultas ginecológicas de rotina. As pacientes assinavam o termo de consentimento e então era realizada a coleta.

Análise Citológica

- Coletadas realizada com espátula de Ayre e escova endocervical;
- Disposição em lâminas para microscopia;
- Coloração de Papanicolaou;
- Classificação pelo Sistema Bethesda 2001;

Análise Morfométrica Nuclear

- Captação das imagens em microscópio óptico, aumento 400x;
- Análise digital das imagens através do software "Image Pro Plus";
- Cada área fotografada foi analisada através da demarcação e segmentação dos contornos dos núcleos;
- Seleção de 4 variáveis de interesse: *Área*, *Área/Box*, *Aspect*, *RadiusRatio e Roundness*;
- Geração do índice de irregularidade nuclear (NII);
- Resultados exportados para uma tabela de Excel, disponível de acordo com o desenvolvedor do NMA.

PCR Multiplex

- Coleta em meio líquido;
- Extração de RNA;
- Quantificação de RNA;
- Síntese de cDNA;
- Reação em cadeia da polimerase – Multiplex;
- Eletroforese em gel de agarose 1,5%;
- Leitura em fotodocumentador.

Resultados

Análise Citológica

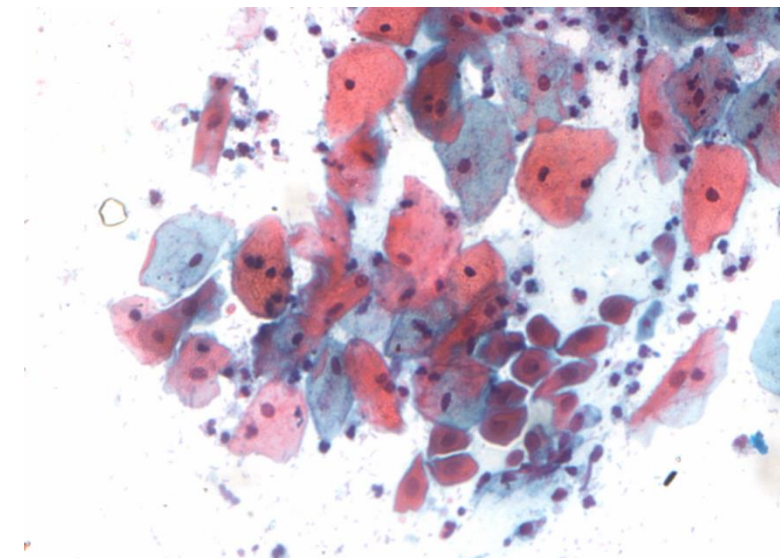


Figura 1. Amostra Dentro dos Limites da Normalidade

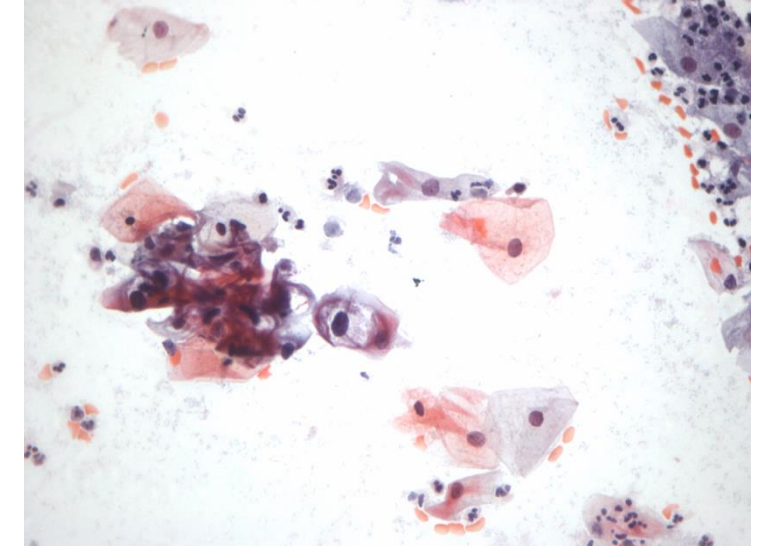


Figura 2. Amostra com morfologia alterada.

Análise Morfométrica Nuclear

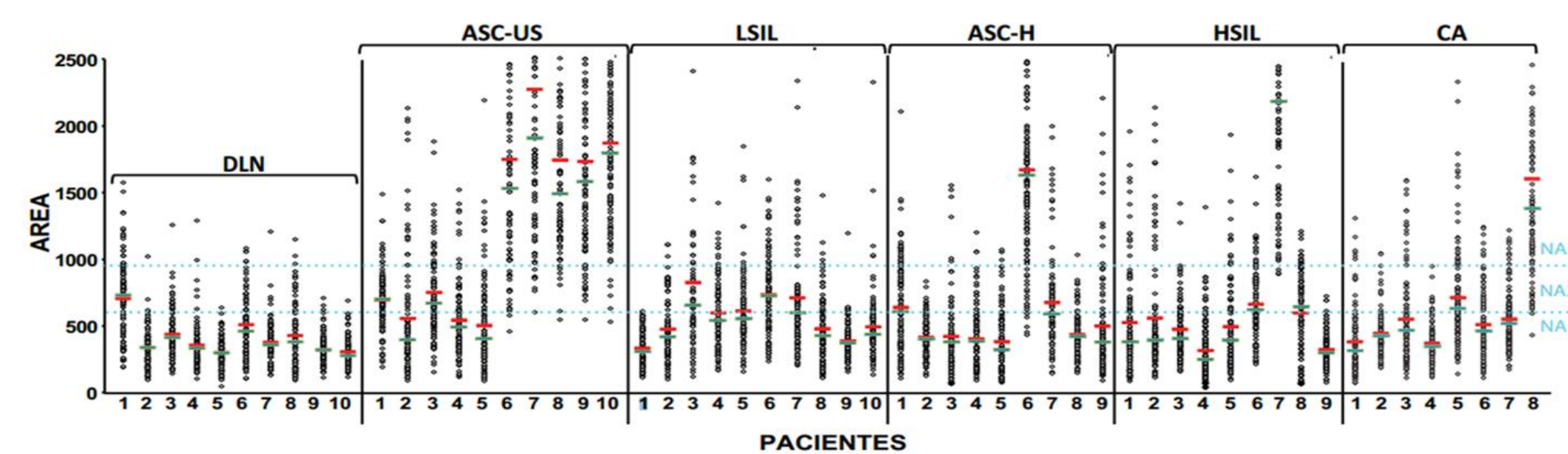


Figura 3. Área nuclear de pacientes de diferentes grupos analisados no programa Image Pro Plus

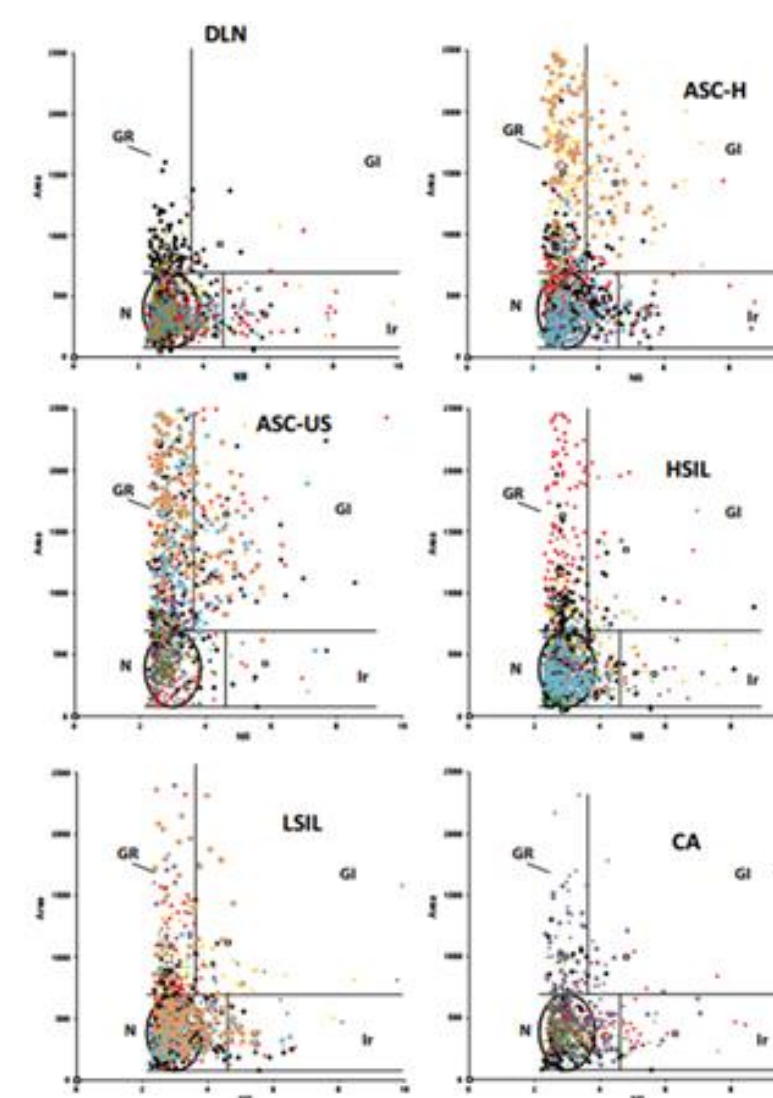


Figura 4. Análise Morfométrica Nuclear (NMA) de pacientes de diferentes tipos de lesões analisadas no programa Image Pro Plus.

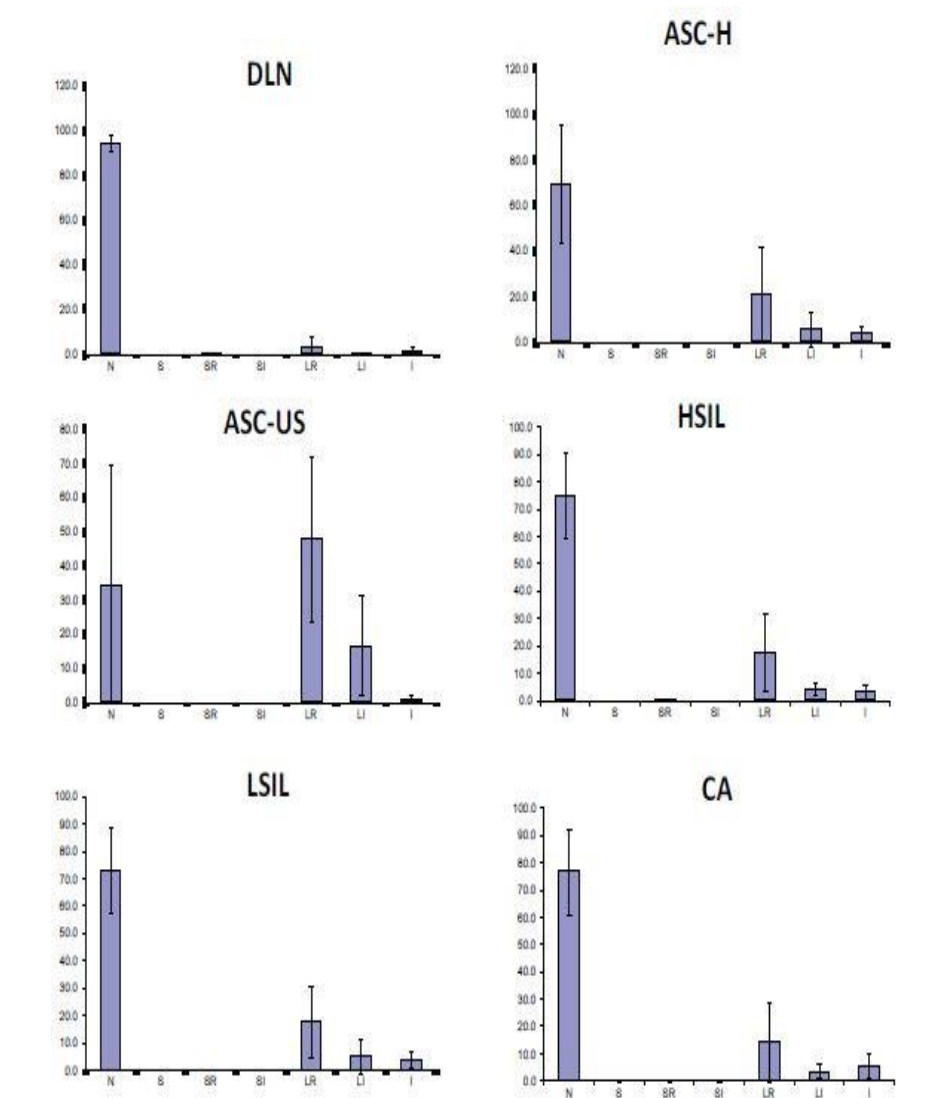


Figura 5. Porcentagem de núcleos irregulares em cada população, avaliados por Análise Morfométrica Nuclear (NMA) em pacientes com diferentes tipos de lesões analisados.

PCR Multiplex

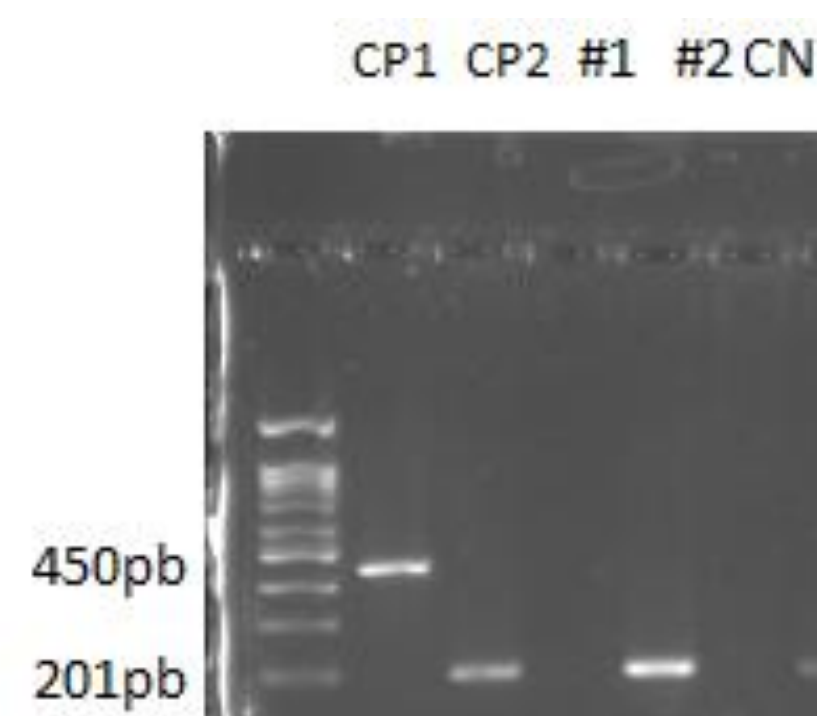


Figura 6. PCR Multiplex para HPV e *Chlamydia trachomatis*(CT) (Eletroforese em gel de agarose 1,5%). CP1: Controle Positivo – HPV; CP2: Controle Positivo – CT; #1 amostras negativa; #2 amostra positiva CT; CN: Controle negativo.

Conclusão

Os dados iniciais obtidos corroboram com as expectativas propostas. Quando aplicados os resultados de citologia convencional apresentando atipias de significado indeterminado, na análise por NMA, pode se observar um aumento na área nuclear como também do NII em relação à amostras normais. Em relação ao PCR multiplex, 92 amostras foram testadas e 13 destas foram positivas para HPV e 2 foram positivas para *Chlamydia trachomatis*. Portanto, necessitamos ampliar o número amostral, principalmente de amostras com lesões, para podermos avaliar melhor esta relação em amostras positivas para presença do HPV e sua relação com as demais análises.

Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, segundo protocolo n°: 708.354.