

Lemes, Cássia¹; Germano, Andressa¹; Taccani, Alessandro¹ Lucon, Danielle

¹Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento - Grupo Erviegas - Brasil - Indaiatuba/SP

Introdução

As aplicações da técnica FISH são inúmeras, sendo considerada uma ferramenta de diagnóstico e subclassificação das neoplasias¹. O protocolo padrão da FISH realizado em tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) começa com a seleção da população representativa de células de interesse pelo patologista que marca a seção em corte histológico (CH) corado com hematoxilina e eosina². O gene MYC é um proto-oncogene cuja função é a regulação do ciclo celular: proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose e a regulação da estrutura da cromatina, sendo importante na formação, manutenção e progressão de vários tipos de câncer³. As dificuldades em otimizar protocolos FISH incluem os fatores pré-analíticos, analíticos e expertise técnica.

Objetivo

Padronizar sistematicamente o protocolo da sonda MYC em tecido FFPE.

Metodologia

As biópsias de tecido cerebral foram fixadas em formalina tamponada a 10% e os cortes histológicos de 3µm, dispostos em lâminas sinalizadas. O Kit pré-tratamento, sonda MYC breakapart e DAPI foram utilizados segundo o fabricante Master Diagnóstica/Grupo Erviegas (Brasil).

Resultados e Discussão

No teste 1, não houve marcação com a digestão enzimática no tempo menor de 20min. Nos testes 2, 4 e 5 foi observado background, sinais fracos e os núcleos foram digeridos por maior tempo de pepsina (25min). O teste 6 apresentou ser o melhor teste com sinais nítidos e sem background (figura. 1). As dificuldades da técnica FISH em FFPE incluem: tempo de fixação, processamento do tecido, qualidade da sonda, acessibilidade e preservação do DNA⁴. CH espessos causam sobreposição celular. A FISH com amostras FFPE pode ser especialmente desafiador, principalmente porque a fixação e a parafina afetam o DNA alvo e é necessária uma otimização adicional das etapas de pré-tratamento e hibridização utilizando kit de pré-tratamento adequado e validado. Os reagentes de pré-tratamento aumentam a eficiência da hibridização da sonda e reduz a autofluorescência de fundo. A digestão enzimática e a lavagem pós hibridização é crucial para o sucesso da FISH, pois interferem diretamente na visibilidade dos sinais⁵. Apesar de observar um sinal fraco nos testes 2, 4 e 5, a literatura^{4,5} recomenda que os resultados da

FISH não devem ser analisados se houver fluorescência de fundo que pode mascarar o sinal em mais de 10% das células e sinais fracos e não uniformes em mais de 25% das células⁵. Diversas modificações nessas etapas críticas foram realizadas para otimizar e garantir a visualização de sinais brilhantes, morfologia nuclear preservada e sem background, que resultou na otimização da sonda MYC breakapart juntamente com o Kit de pré-tratamento e DAPI. As lâminas foram analisadas por 2 profissionais experientes. Os nossos achados não demonstraram o rearranjo MYC, o que não interfere na otimização do protocolo.

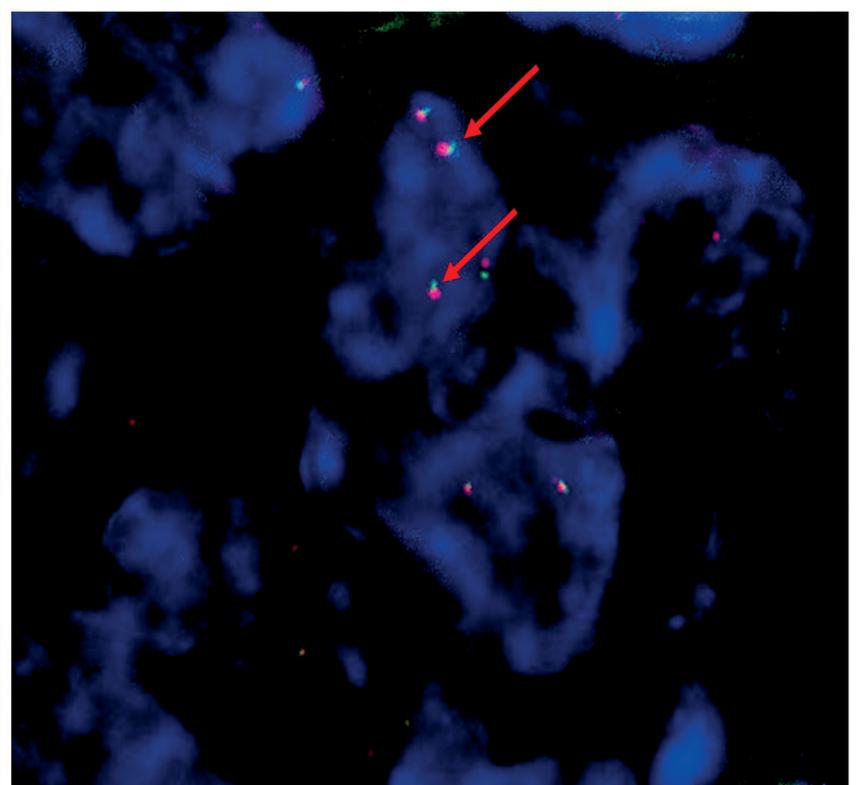


Figura 1. Teste 6: Corte histológico de tecido cerebral. Observa-se a marcação da sonda MYC Breakapart (sinais verdes e laranja). As setas indicam os sinais brilhantes, morfologia nuclear preservada e sem background. Não há o rearranjo Myc.

Conclusão

A sonda MYC, o kit pré-tratamento e o DAPI (Master Diagnóstica/Grupo Erviegas, Brasil) foram padronizados por FISH em tecido FFPE, apresentando melhor sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.

Referências Bibliográficas

- Schick M, Habringer S, Nilsson JA, Keller U. Pathogenesis and therapeutic targeting of aberrant MYC expression in haematological cancers. *Br J Haematol.* 2017 Dec;179(5):724-738
- Chrzanowska NM, Kowalewski J, Lewandowska MA. Use of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) in Diagnosis and Tailored Therapies in Solid Tumors. *Molecules.* 2020 Apr 17;25(8):1864
- Duffy MJ, O'Grady S, Tang M, Crown J. MYC as a target for cancer treatment. *Cancer Treat Rev.* 2021 Mar;94:102154
- Petersen BL, Sørensen MC, Pedersen S, Rasmussen M. Fluorescence in situ hybridization on formalin-fixed and paraffin-embedded tissue: optimizing the method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2004 Sep;12(3):259-65.
- Bogdanovska-Todorovska M, Petrushevska G, Janevska V, Spasevska L, Kostadinova-Kunovska S. Standardization and optimization of fluorescence in situ hybridization (FISH) for HER-2 assessment in breast cancer: A single center experience. *Bosn J Basic Med Sci.* 2018 May 20;18(2):132-140