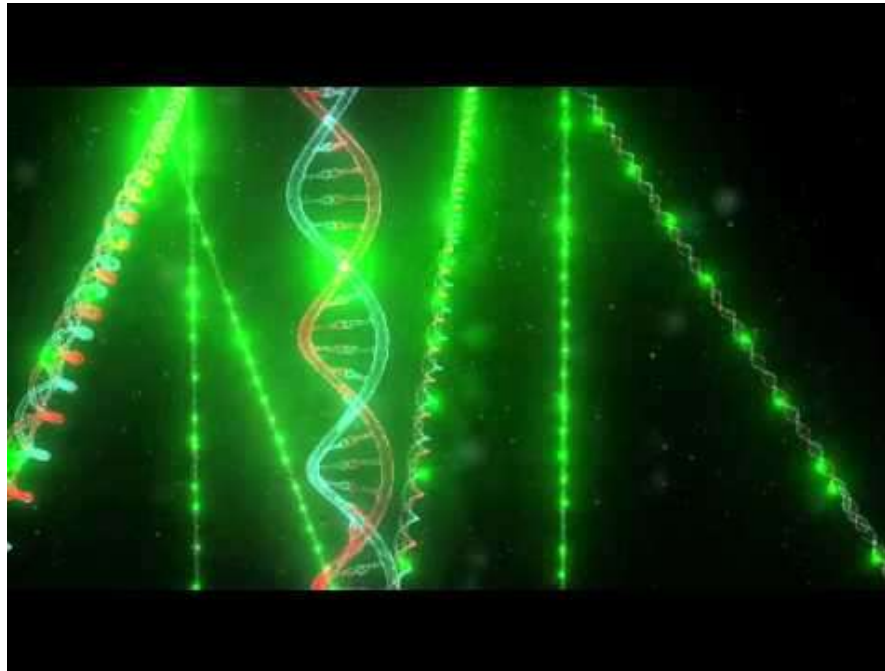




VIII Congresso Regional de Histotecnologia Sociedade Brasileira de Histotecnologia :

“Técnica de Hibridização *in situ* e suas aplicações na rotina diagnóstica”

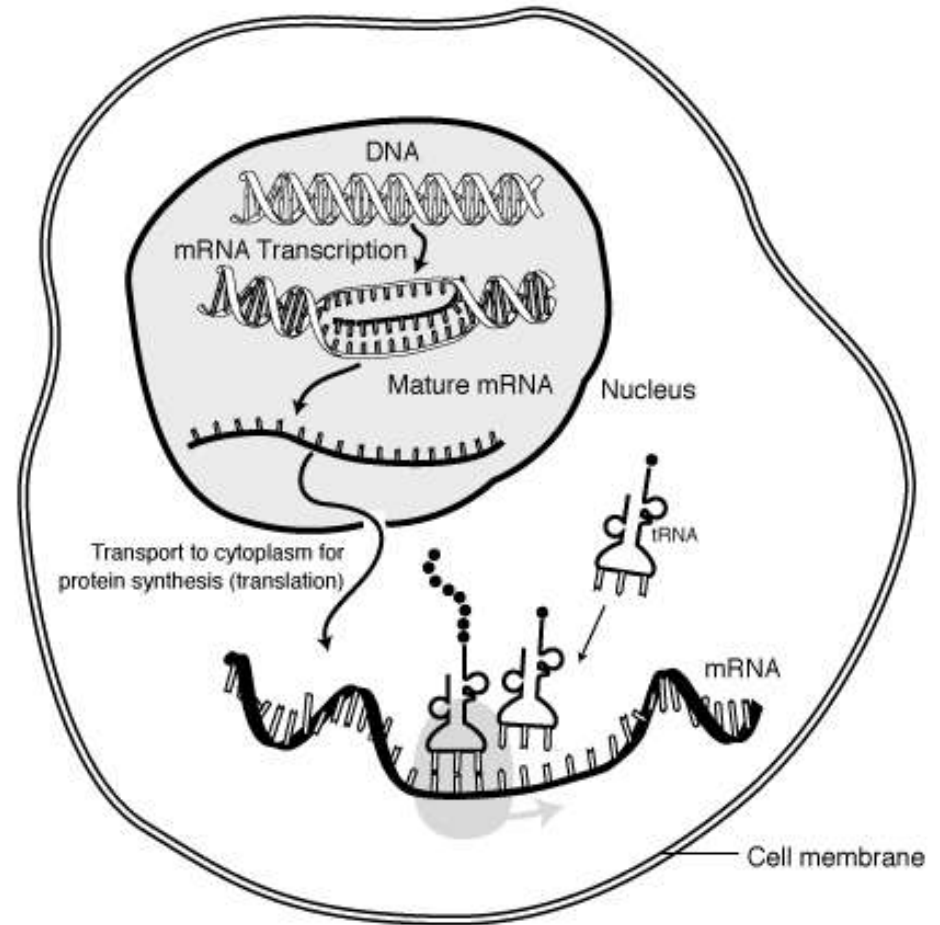
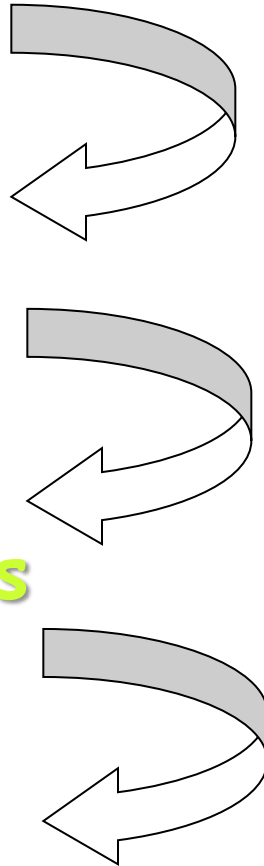


DNA

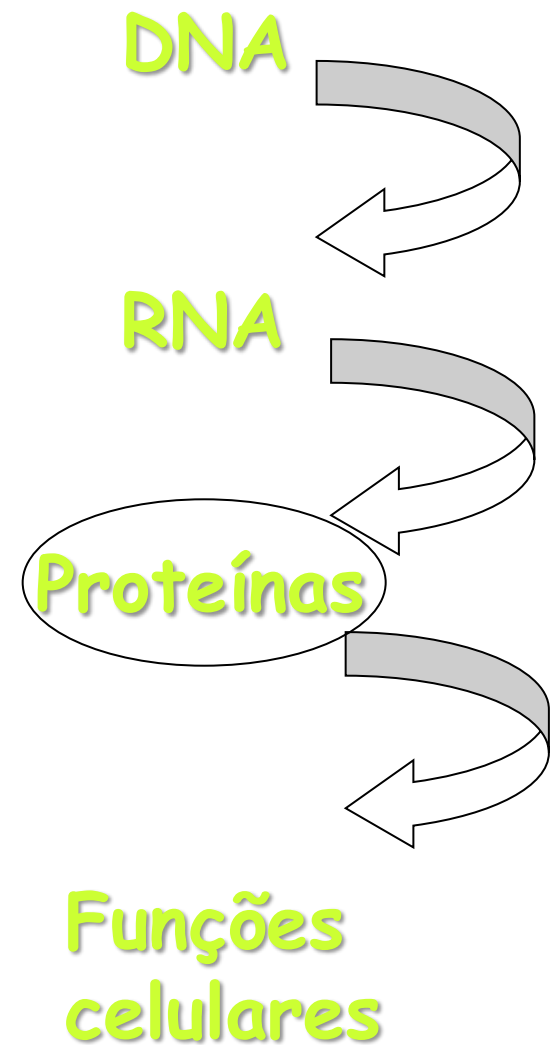
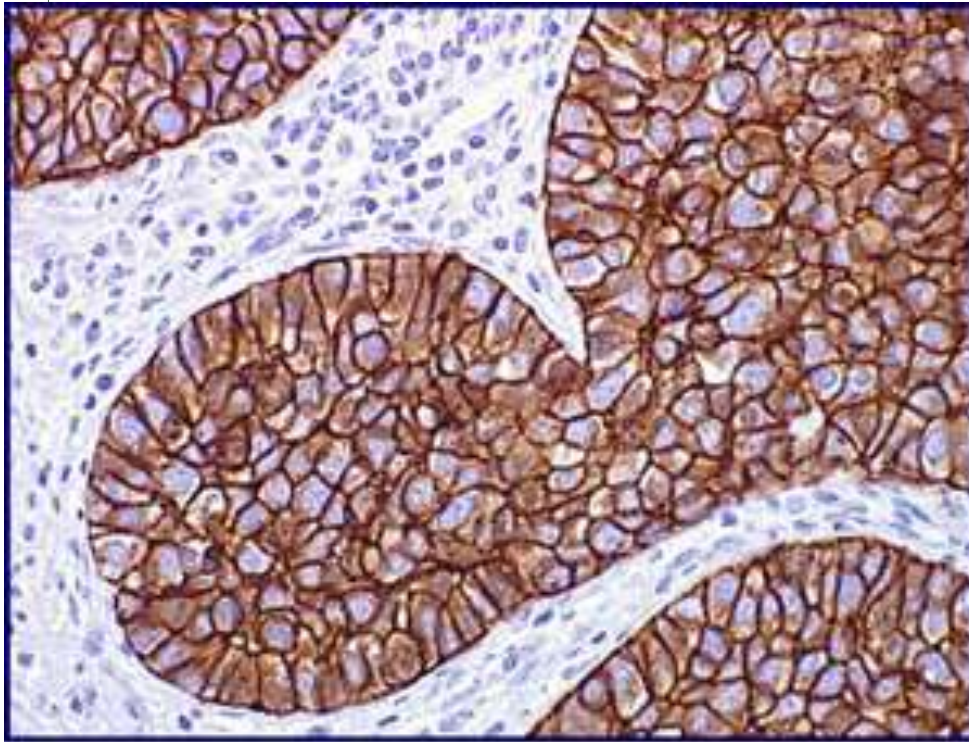
RNA

Proteínas

Funções
celulares



Expressão Protéica (imuno-histoquímica)

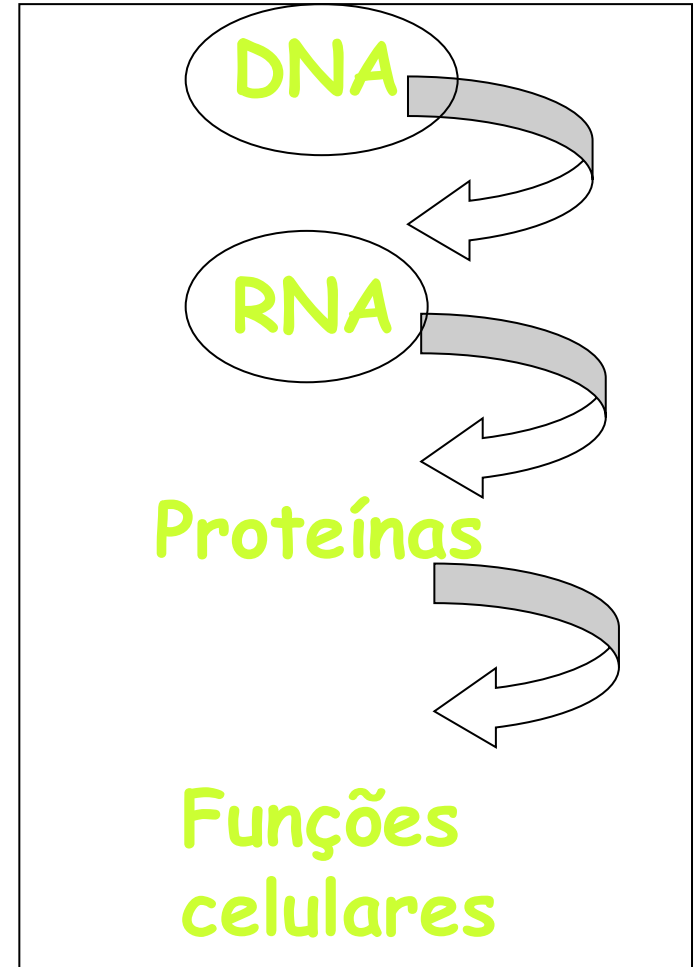


O que é a hibridização *in situ*?

- ✓ hibridização *in situ* é uma técnica baseada na detecção de pequenos segmentos de DNA ou RNA a partir de "sondas" específicas.
- ✓ As sondas são seqüências de nucleotídeos complementares desenvolvidas a partir de segmentos conhecidos do DNA ou RNA que se deseja identificar.

Hibridização *in situ*

- ✓ Métodos de detecção:
- ✓ Fluorescente (FISH)
- ✓ Cromogênica com enzimas (CISH)
- ✓ Com prata (SISH)

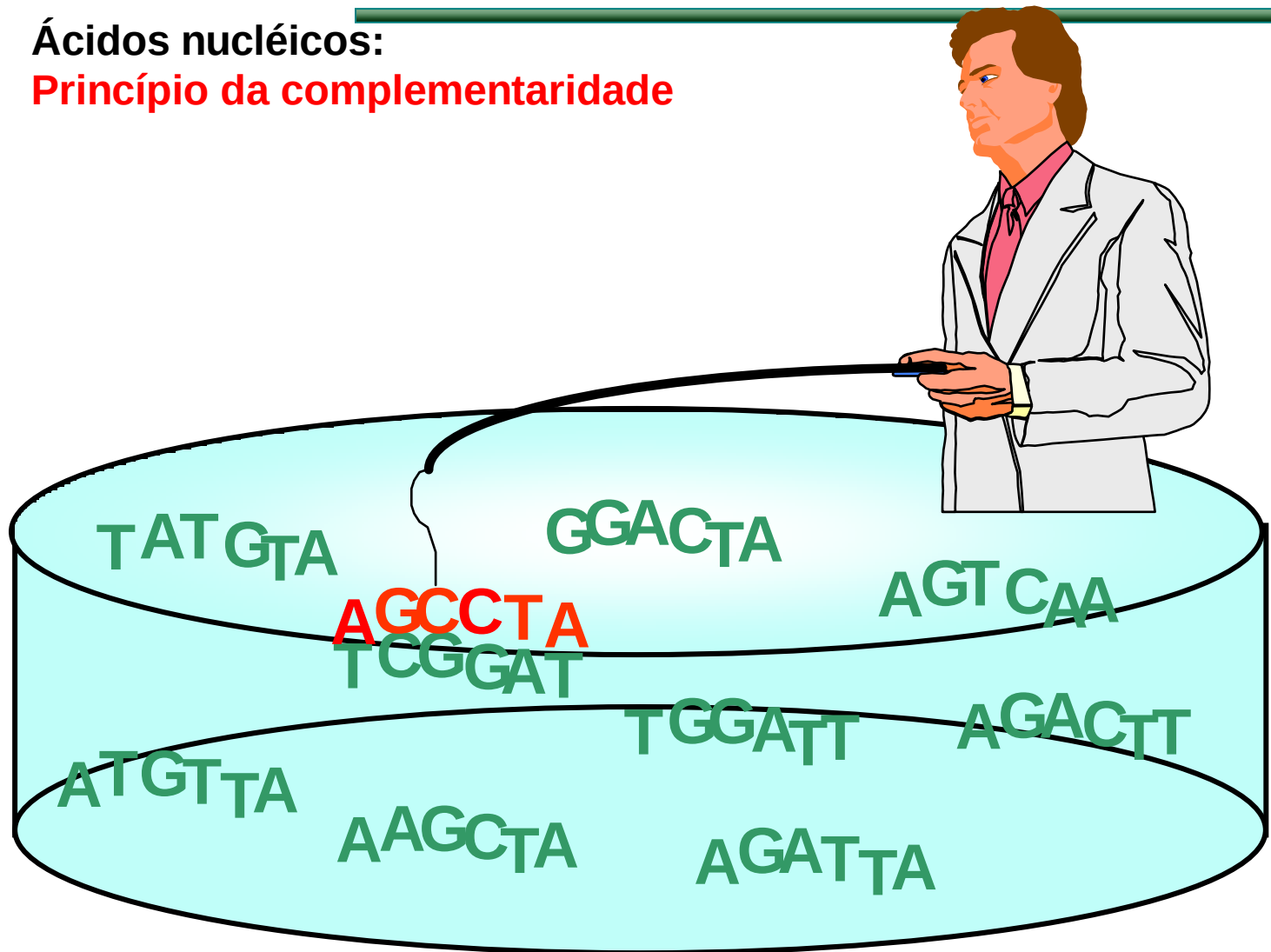


ISH - Sondas

Molécula que é marcada de alguma forma (radiação ou fluorocromo) e é usada para se ligar e detectar outra molécula



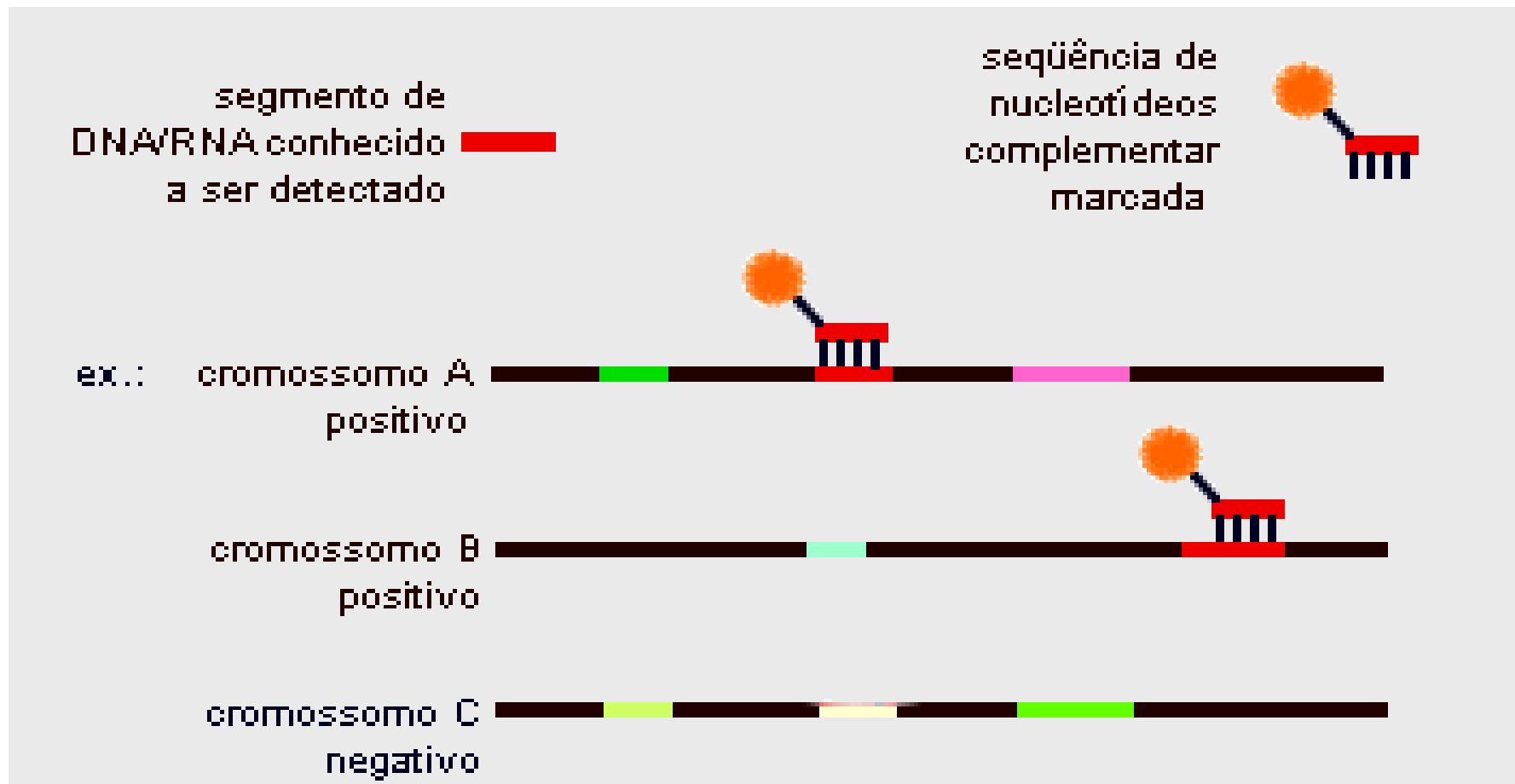
Ácidos nucleicos:
Princípio da complementaridade



FISH(Fluorescence in situ Hybridization)

- ✓ Utiliza sondas de DNA marcadas com fluorescência para detectar anomalias cromossômicas que estão além do poder de resolução da citogenética de rotina, como microdeleções e rearranjos cromossômicos complexos.

Esquema do mecanismo de ação das técnicas de hibridização



FISH - Etapas

✓ **Preparação das sondas:**

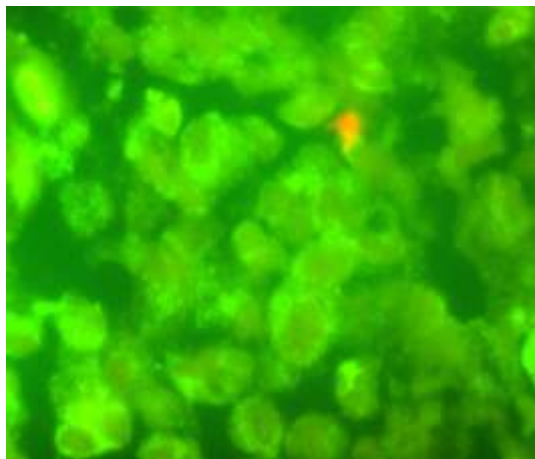
- Método direto: ligação com fluorocromo;
- Método indireto: moléculas sinalizadoras - biotina, digoxigenina - conjugam-se com outra molécula ligada ao fluorocromo (avidina ou anticorpos)

- ✓ Desparafinização em Xilol, álcool, água



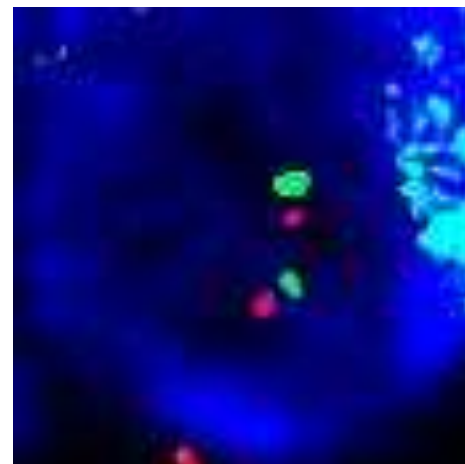
- ✓ Incubação em solução 0,2 N HCl – 20'
- ✓ Pré-tratamento por calor
- ✓ Digestão enzimática



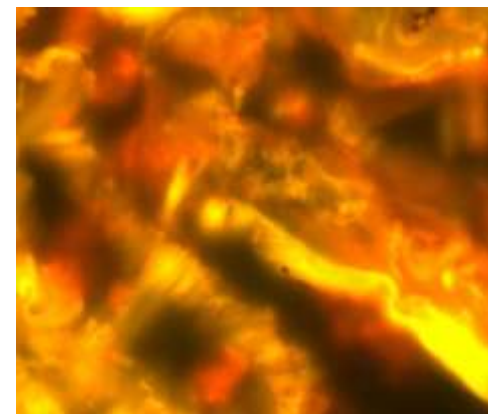


Sem sinal

Aumento ou
diminuição
tempo
digestão



Sem amplificação

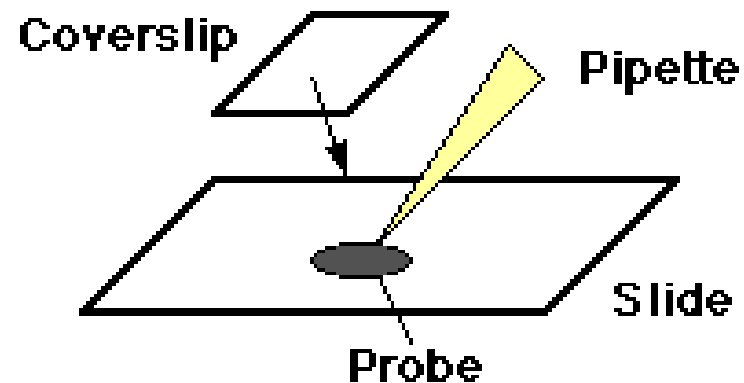


inconclusivo

- ✓ Lavagem em solução 2X SSC - 2'
- ✓ Desidratação em álcool 70%, 85%, 100%
- ✓ Secagem ao ar



- ✓ Aplicação de sonda (10 μ l de sonda),
lamínula(22x22), selante.



FISH - protocolo

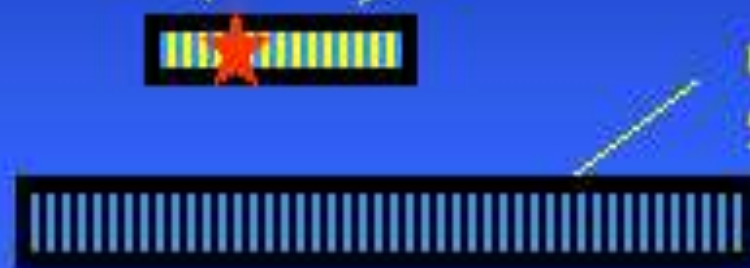
- ✓ As sondas então colocadas sobre as lâminas que são incubadas "overnight" em câmara úmida e escura.(Denaturação/Hibridização)



Sinal Fluorescente

Sonda

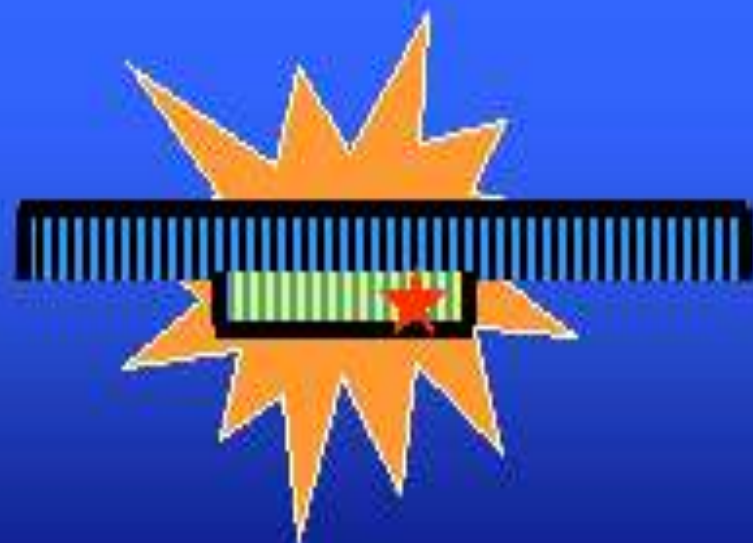
Cromossomo
Sequência alvo



Desnaturar



Hibridização



FISH - protocolo

- ✓ No dia seguinte, a lâmina é lavada para a remoção das sondas em excesso.
- ✓ Urea 1,5M/ 0,1 x SSC em banho-maria - 45°C- 30 '

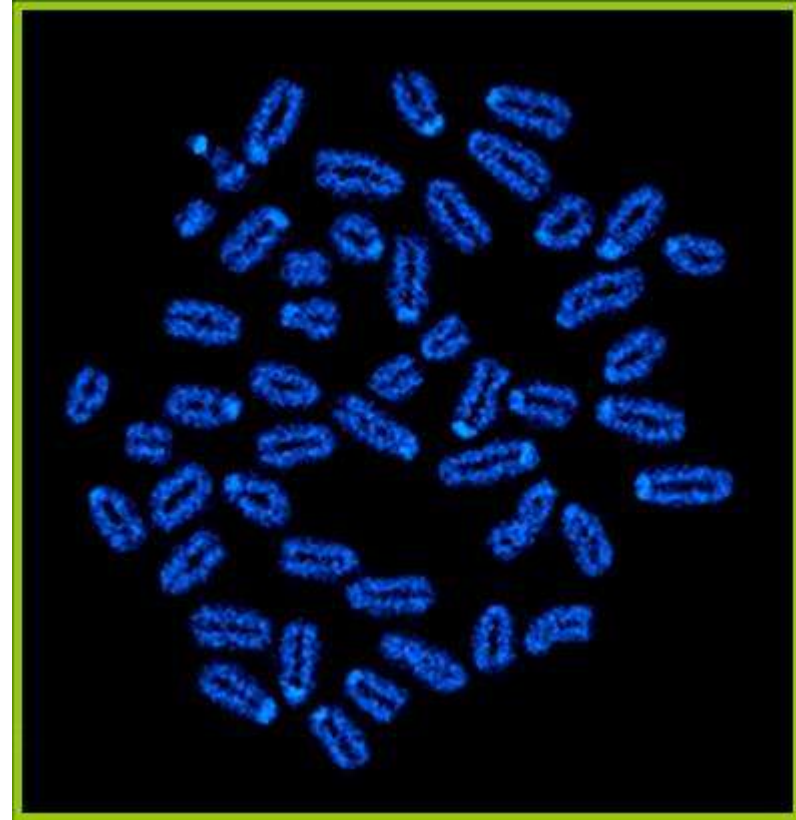


- ✓ Lavagem em solução 2X SSC - 2'
- ✓ Desidratação em álcool 70%, 85%, 100%
- ✓ Secagem ao ar



Contra coloração (counterstainig)
Adição de soluções que irão colorir o
resto do material cromossômico.

Mais usadas: DAPI (azul), propidium
iodide (vermelho)



Microscópio

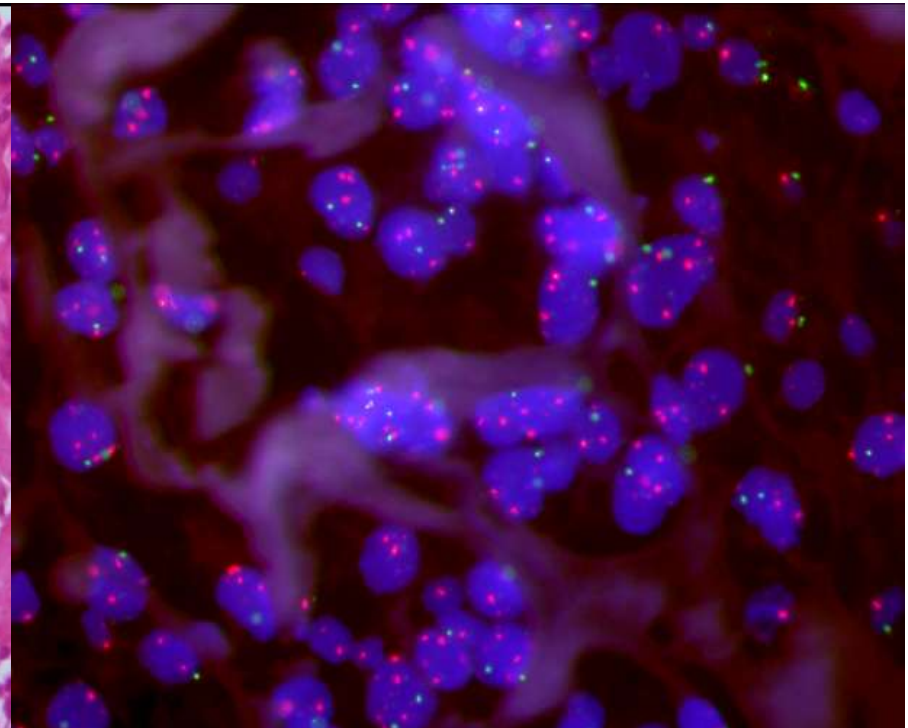
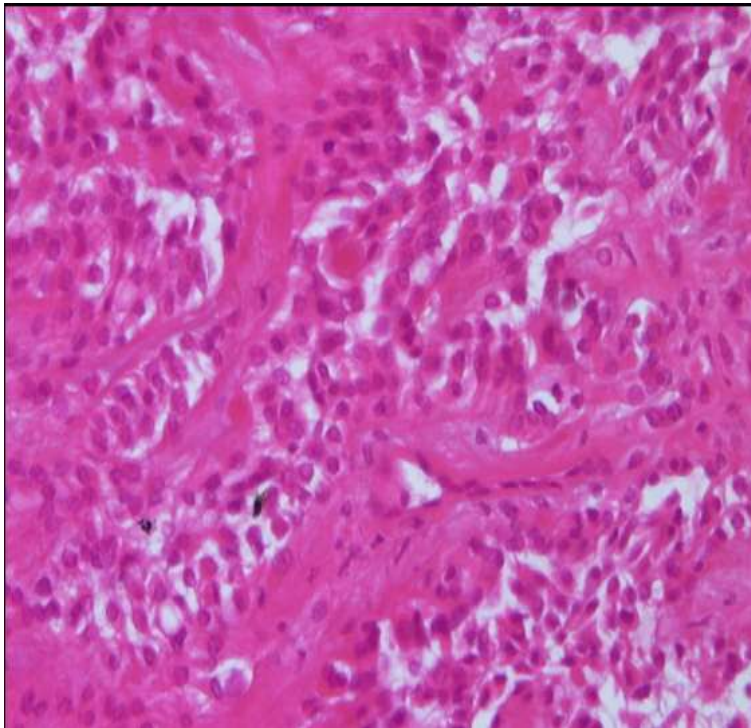


FISH - vantagens

- ✓ Técnica rápida
- ✓ Alta eficácia de hibridização e detecção
- ✓ Sensibilidade e especificidade elevadas
- ✓ Permite correlação direta dos aspectos citogenéticos e morfológicos, possibilitando a diferenciação entre condições malignas e benignas em casos duvidosos

Fluorescence in situ hybridization (FISH) - vantagens

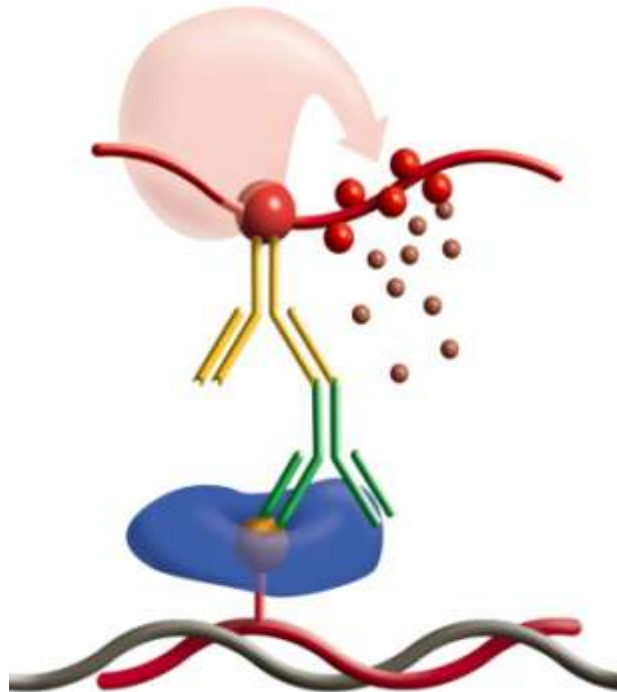
- ✓ Preservação da morfologia em material fixado em formalina e processado em parafina



FISH - Limitações

- ✓ Restrita às anormalidades que possuem sondas disponíveis
- ✓ Apenas uma ou poucas anormalidades podem ser acessadas simultaneamente
- ✓ Os dados citogenéticos podem ser obtidos apenas para cromossomas- alvo; portanto não é um método de "screening";
- ✓ Altamente sensível para ganhos, mas menos sensível para detecção de perda cromossômica ou deleção;
- ✓ Requer microscopia de fluorescência e um sistema de análise de imagem

Chromogenic *in situ* Hybridization (CISH)



Chromogenic *in situ* Hybridization (CISH)

CISH

Sondas: Polinucleotides produzidos pela clonagem e isolamento de DNA

Alvo: DNA

Detecção: Detecção indireta

Hapteno: Digoxigenin ou Biotina

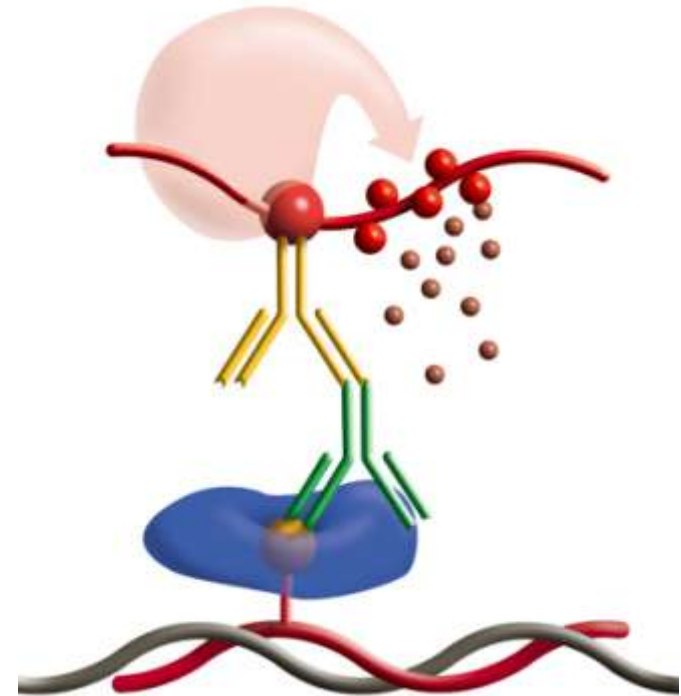
Anticorpos: (não marcado)

Camundongo -anti-Dig

Cabra-anti-camundongo-

HRP-Polymer

Substrato: DAB



Descrição do Método (CISH)

Pretratamento por calor



Proteólise



Aplicação da Sonda



Denaturação
e Hibridização



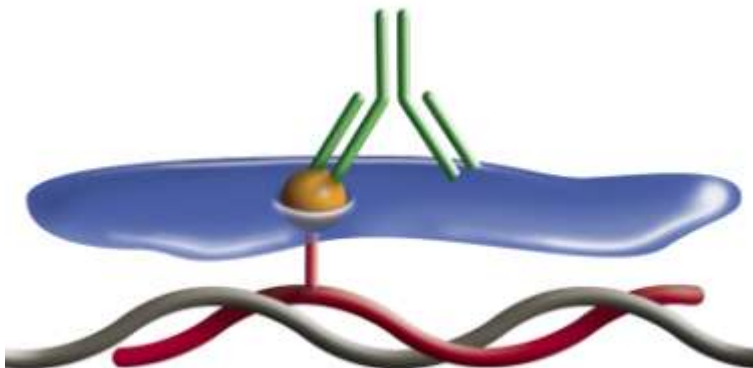
Lavagem

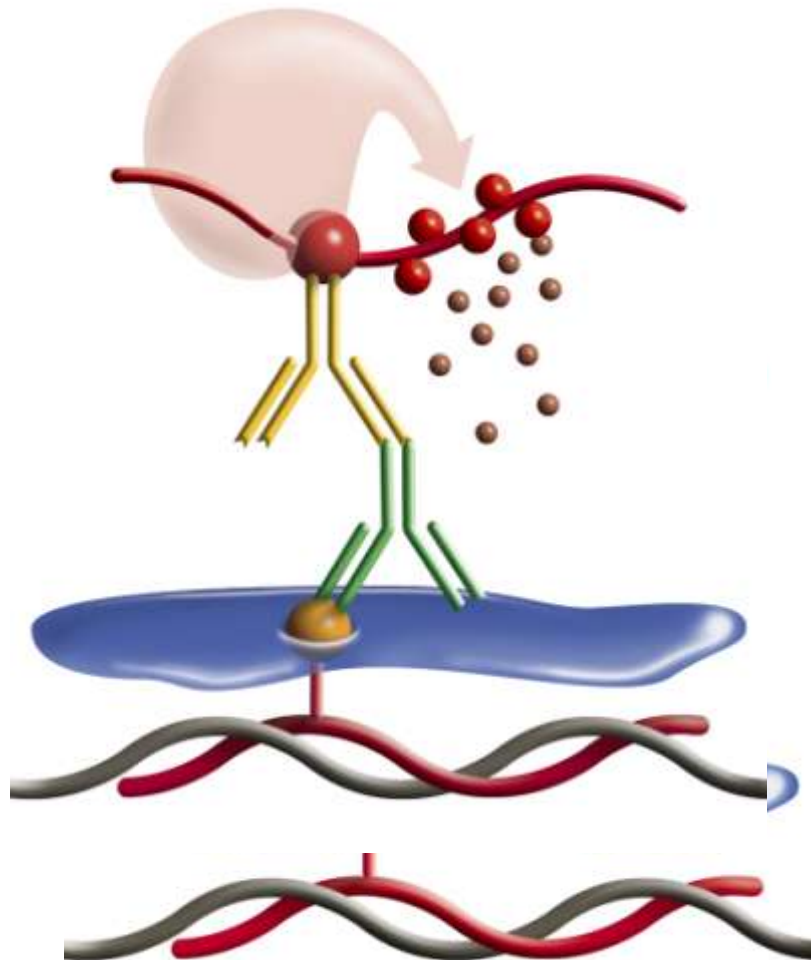


Aplicação do Bloqueio



Aplicação do 1º Anticorpo





lavagem



Aplicação do 2º Anticorpo



Lavagem



Coloração,
contracoloração,
montar



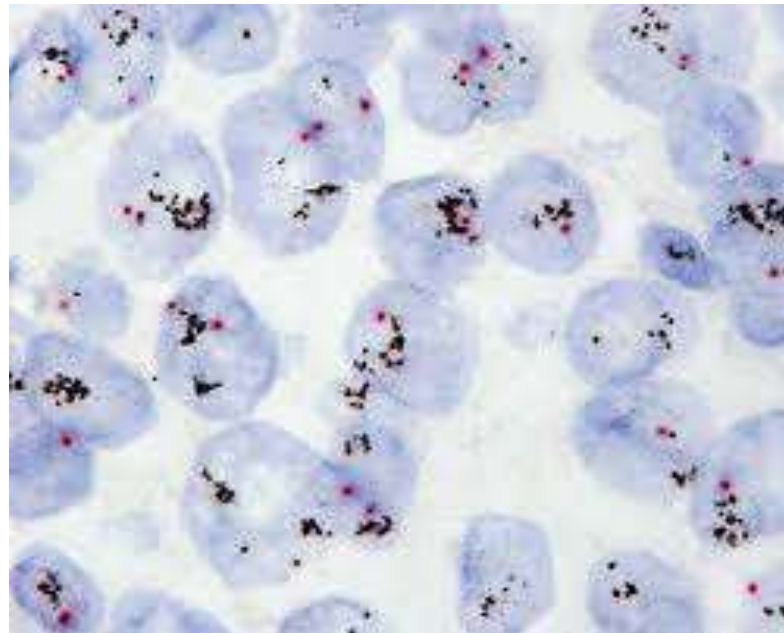
CISH - vantagens

- ✓ Análise por microscopia óptica
- ✓ Fácil detecção de células normais e tumorais
- ✓ Morfologia preservada
- ✓ Reação estável podendo ser armazenados por longos períodos
- ✓ Pode ser usado em material fresco ou parafinado
- ✓ Estocado em temperatura ambiente

CISH - desvantagens

- ✓ Difícil interpretação
- ✓ Limitação do número de sondas (cores)

SISH



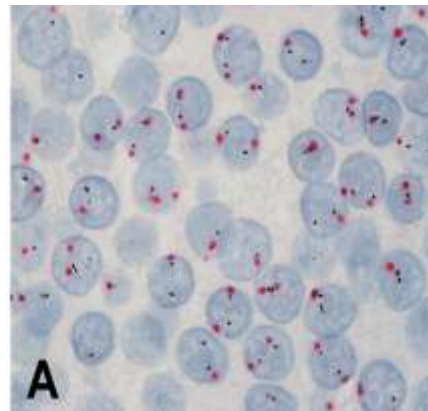
Dual ISH Her2/Cr17 (CISH + SISH)

Her2

- ✓ Sonda Genômica
- ✓ DNP
- ✓ ~200.000 bp
- ✓ **Silver Enzyme
Metalographic Detection**

Cromossomo 17

- ✓ Sonda de Oligonucleotídeo
- ✓ DNP
- ✓ ~45 bp
- ✓ **Alkaline Phosphatase
Naphthol Fast Red
Detection**



1 lâmina

2 sistemas de detecção ⇒ 2 cores ⇒ sinal preto para Her-2, sinal **vermelho** para Cr17

Sistema de Detecção Ultraview SISH

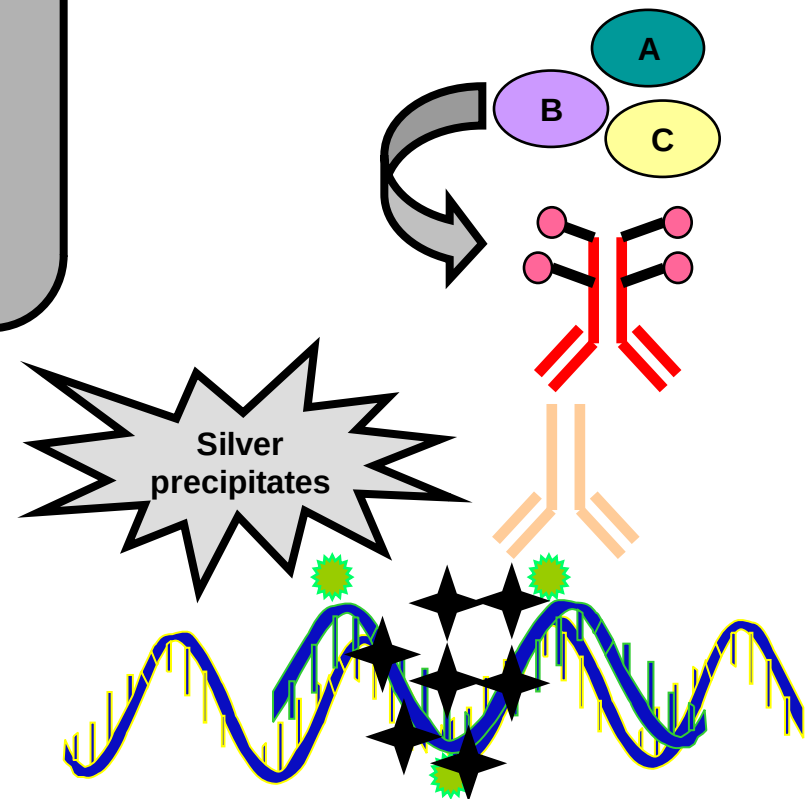
Ultraview SISH Detection Kit :

- ✓ Silver A : silver acetate
- ✓ Silver B : hydroquinone
- ✓ Silver C : H₂O₂
- ✓ Goat anti-Rabbit HRP antibody (*Multimer antibody*)

Rabbit anti-DNP antibody
(*Rabbit monoclonal*)

Probe

Target



Sistema de Detecção Ultraview SISH

Química do Depósito de Prata

Silver C : H_2O_2

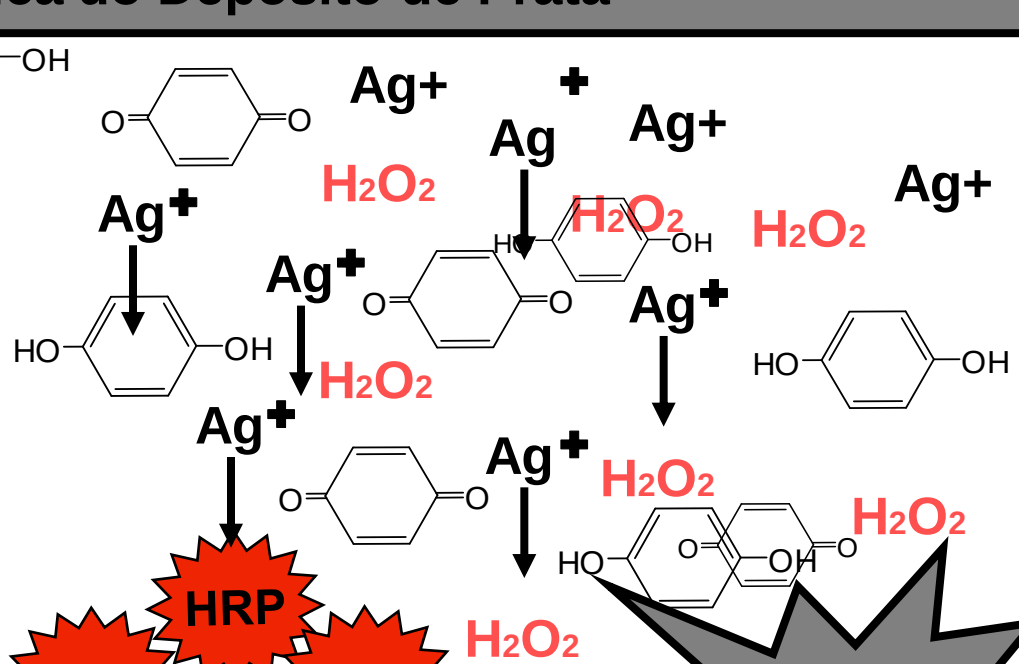
Silver B :

Hidroquinona

Silver A : Acetato de Prata

HRP catalisa
redução da prata

Início da
Detecção



Deposição de
coloração escura

Sistema de Detecção Ultraview AP Red ISH

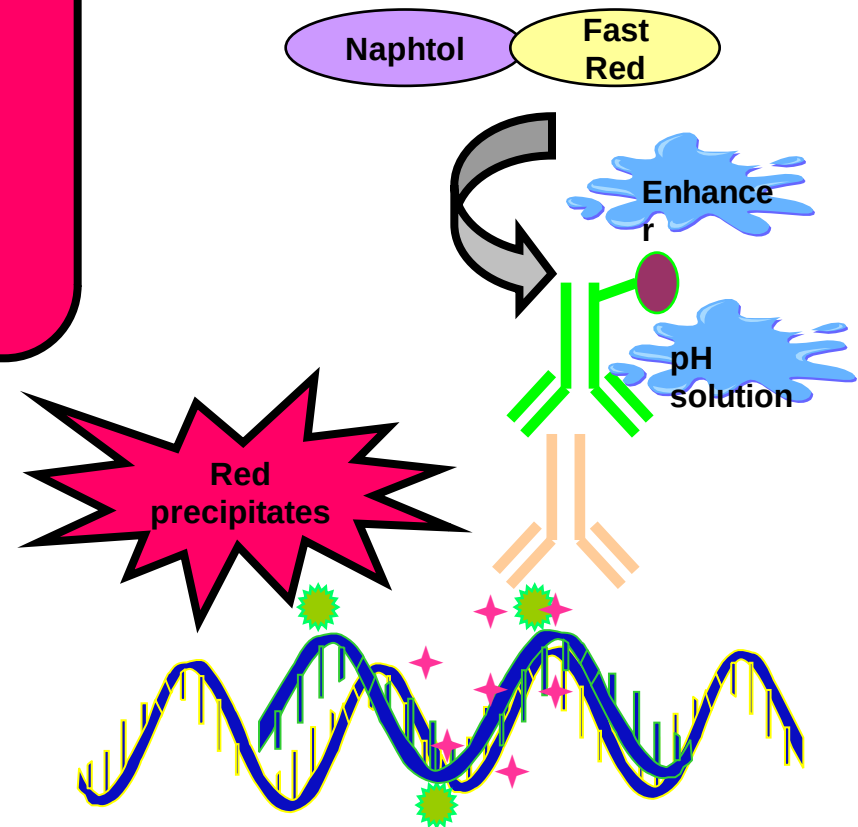
Sistema de Detecção Ultraview AP Red ISH:

- ✓ ultraView AP Red ISH pH Solution
- ✓ ultraView AP Red ISH Enhancer
- ✓ ultraView AP Red ISH Naphthol
- ✓ ultraView AP Red ISH Fast Red
- ✓ Goat anti-Rabbit AP antibody
(Multimer antibody)

Rabbit anti-DNP antibody
(Rabbit monoclonal)

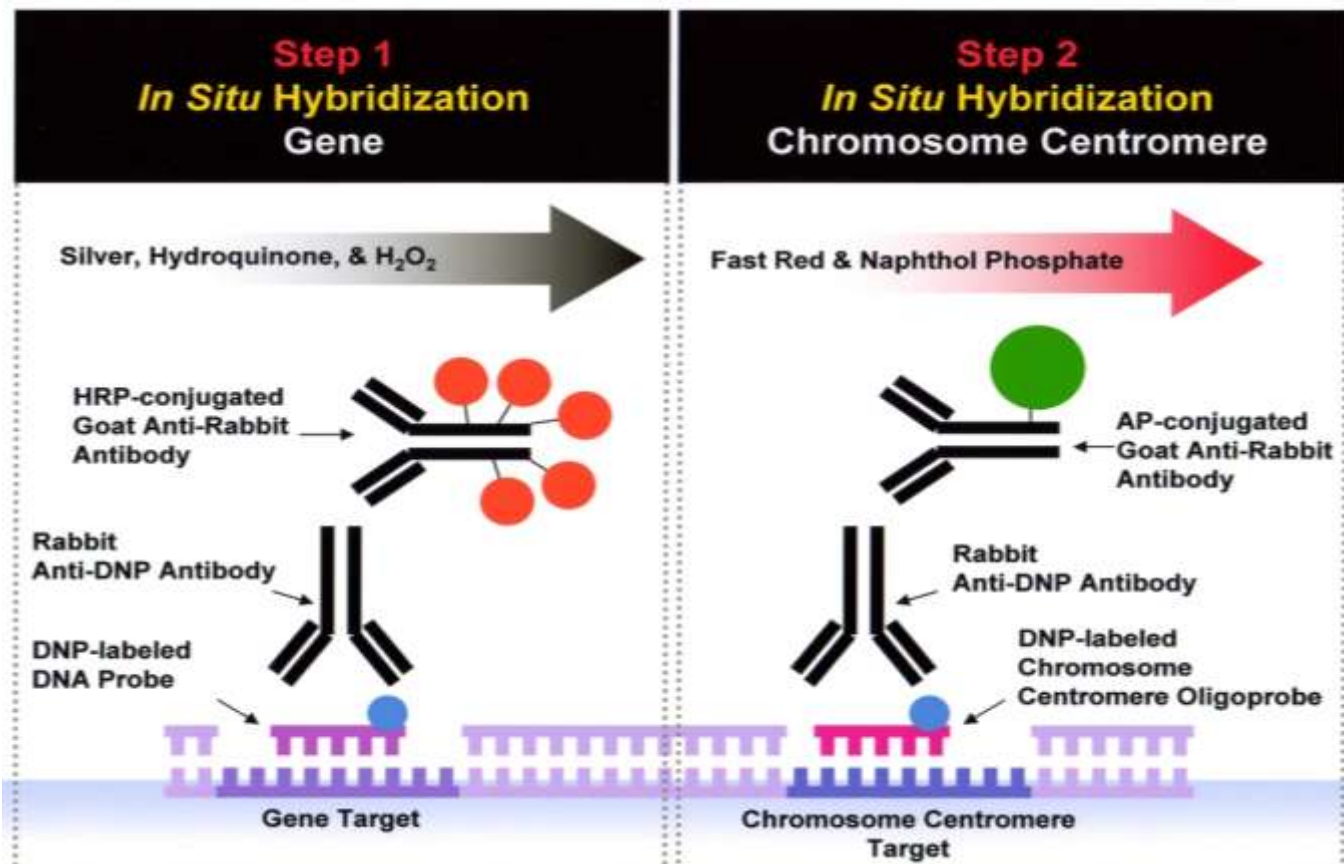
Probe
Chr17 ONLY

Target
Chr17 ONLY



Sistema Dual ISH Her2/Cr17 - Resumo

Brightfield Double *In Situ* Hybridization Application



2 reações ISH
sequenciais

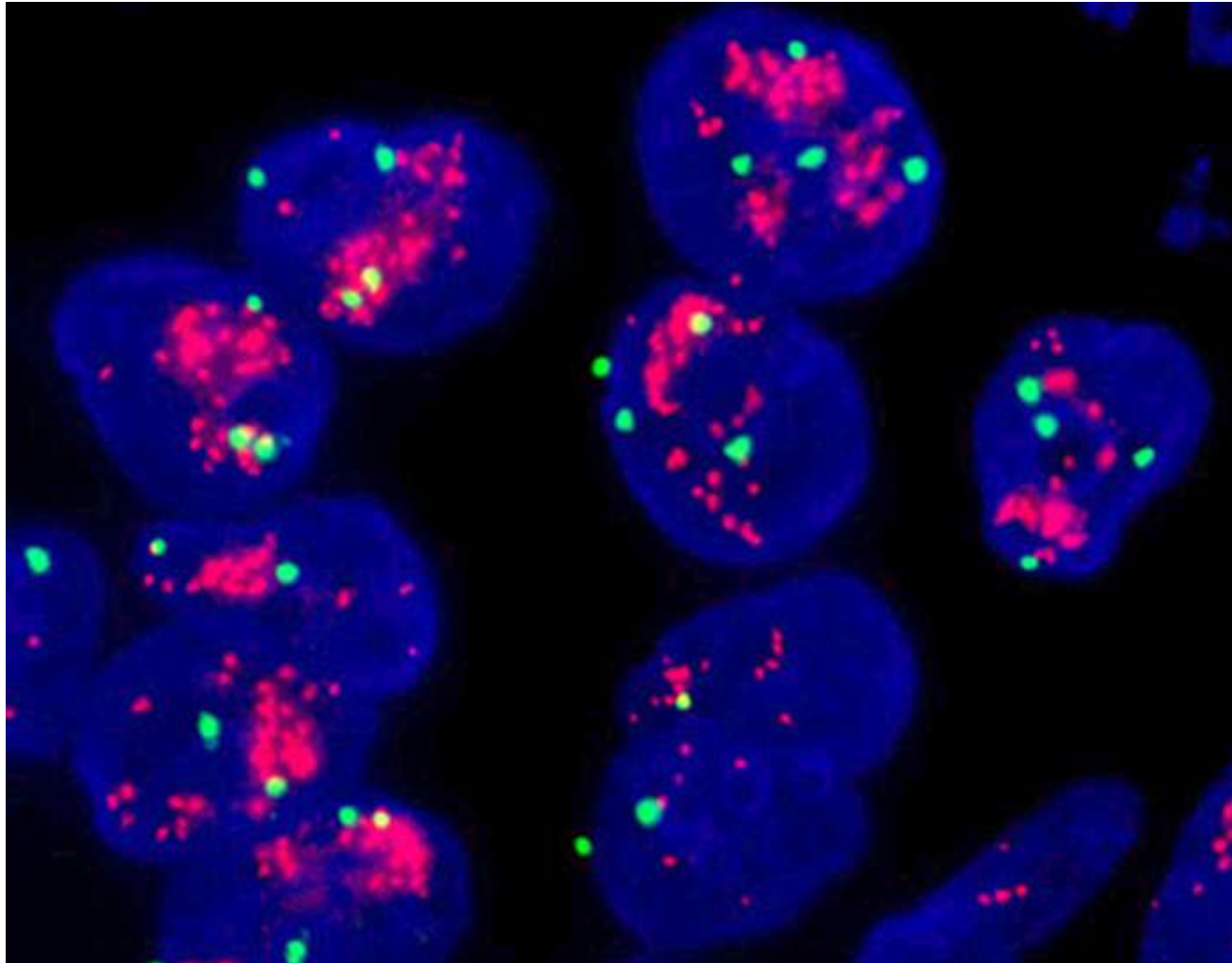
SISH - vantagens

- ✓ Análise por microscopia óptica
- ✓ Fácil detecção de células normais e tumorais
- ✓ Morfologia preservada
- ✓ Reação estável podendo ser armazenados por longos períodos
- ✓ Pode ser usado em material fresco ou parafinado
- ✓ Estocado em temperatura ambiente

✓ Aplicações na rotina diagnóstica



FISH



ALTERAÇÕES NUMÉRICAS

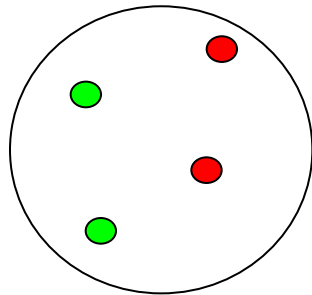
(Deleções)



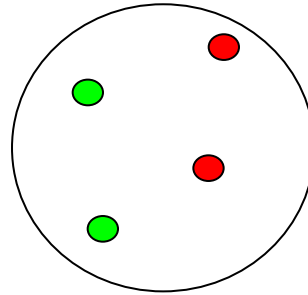
No, Brian! Don't do it!

Deleções

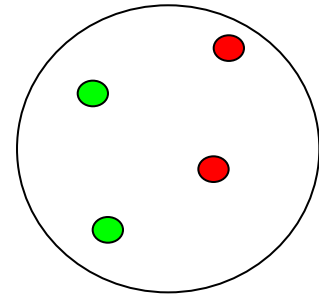
- ✓ Hemizigóticas (perda de 1 alelo)
- ✓ Homozigóticas (perda dos 2 alelos)



Célula normal



Deleção hemizigótica



Deleção homozigótica

- Centrômero do cr Z
- Gene de interesse

Deleção de PTEN



British Journal of Cancer (2007) 97, 678–685

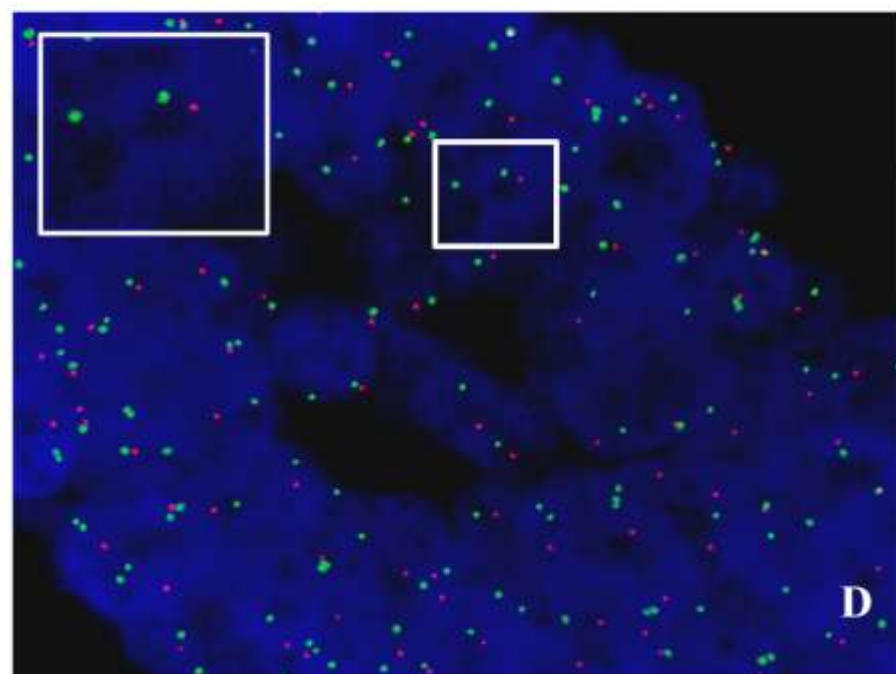
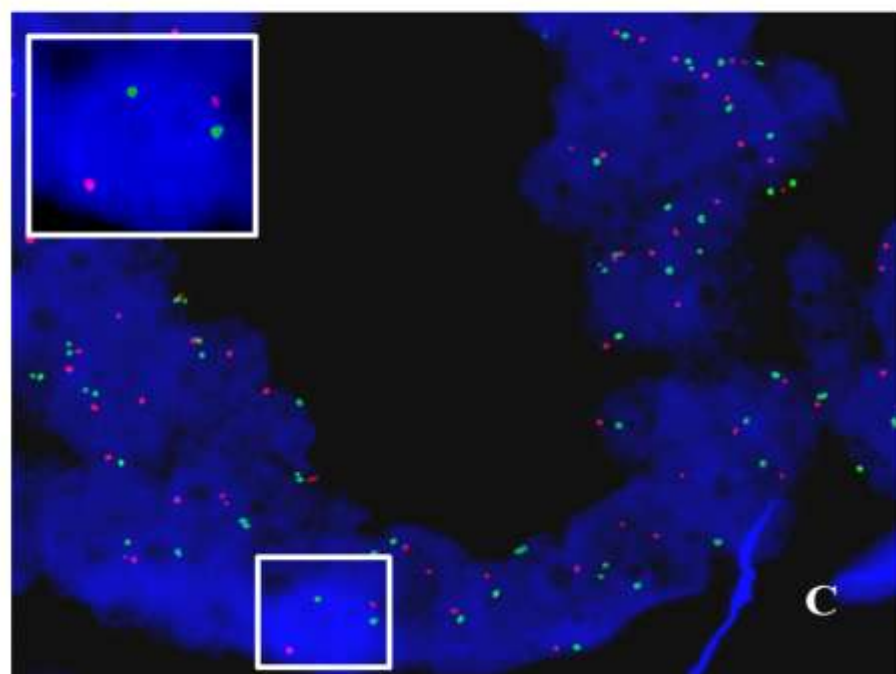
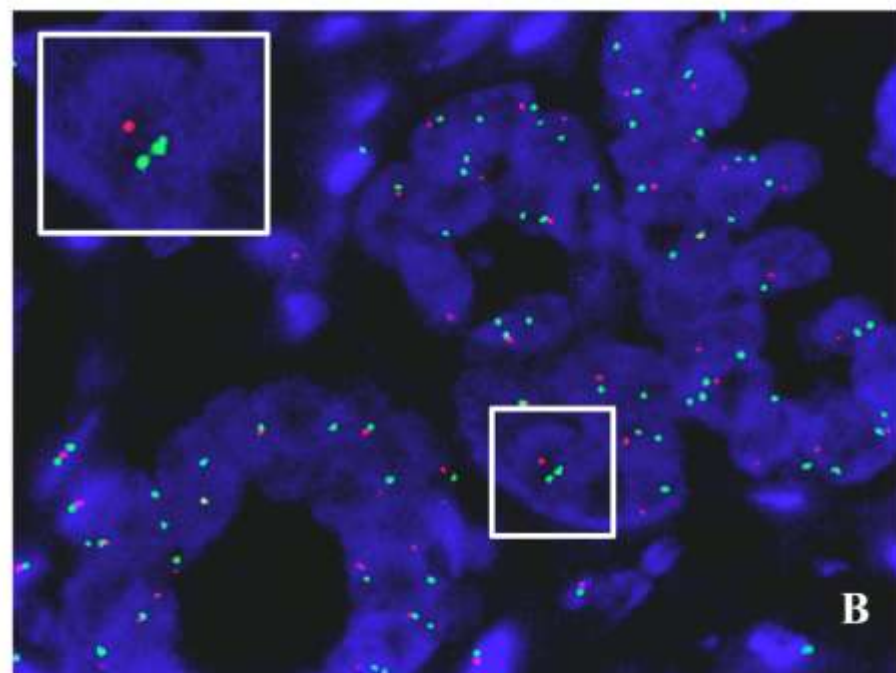
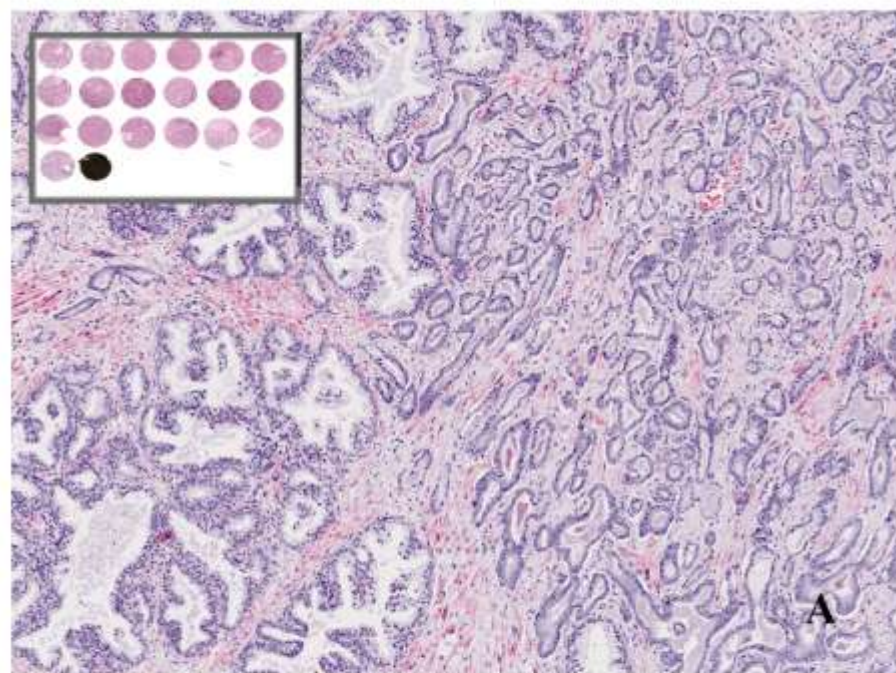
© 2007 Cancer Research UK All rights reserved 0007–0920/07 \$30.00

www.bjcancer.com

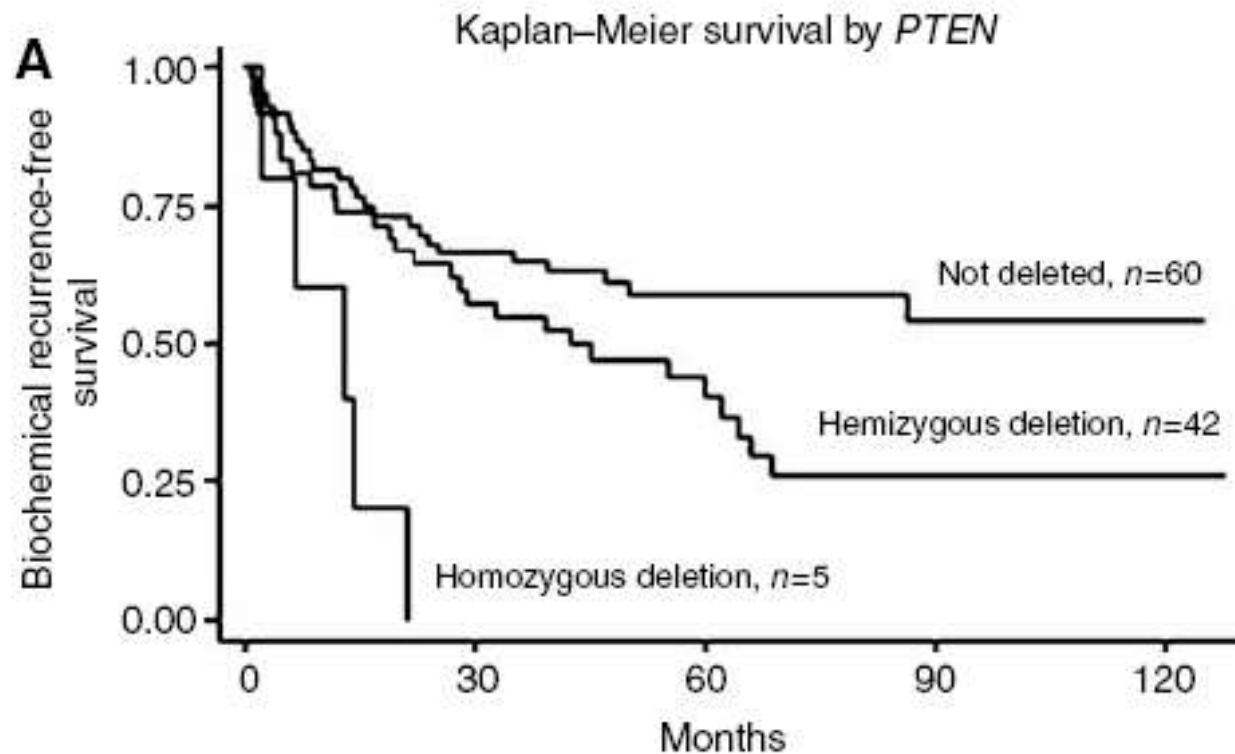
FISH analysis of 107 prostate cancers shows that *PTEN* genomic deletion is associated with poor clinical outcome

M Yoshimoto¹, IW Cunha², RA Coudry², FP Fonseca³, CH Torres⁴, FA Soares² and JA Squire^{*,1,5}

¹Division of Applied Molecular Oncology, Ontario Cancer Institute, Princess Margaret Hospital, Toronto, Ontario, M5G 2M9, Canada; ²Departamento de Patologia, Centro de Tratamento e Pesquisa, Hospital do Câncer, A.C. Camargo, São Paulo, 01509 010, Brazil; ³Serviço de Urologia, Departamento de Cirurgia Pélvica, Hospital do Câncer, A.C. Camargo, São Paulo, 01509 010, Brazil; ⁴Instituto de Matemática e Estatística, Universidade de São Paulo, São Paulo, 01509 010, Brazil; ⁵Department of Medical Biophysics, Faculty of Medicine, University of Toronto, M5G 2M9, Canada



FISH analysis of 107 prostate cancers shows that *PTEN* genomic deletion is associated with poor clinical outcome



DETECTANDO TRANSLOCAÇÕES

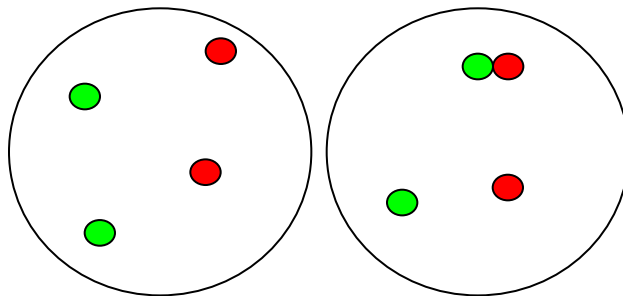


"Ever get the feeling that we're being watched??"

Translocação

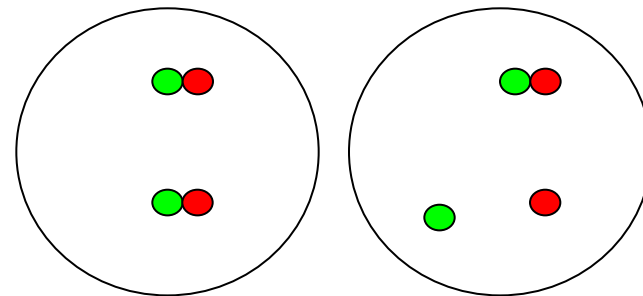
✓ Tipos de sondas

- ✓ **Dual fusion** (marcação dos dois genes envolvidos; translocação vista pela junção dos sinais)
- ✓ **Break apart** (marcação das extremidades de um único gene; translocação vista pela separação de sinais)



● Gene A
● Gene B

Dual Fusion



● Extremidade 1 do gene A
● Extremidade 2 do gene A

Break Apart

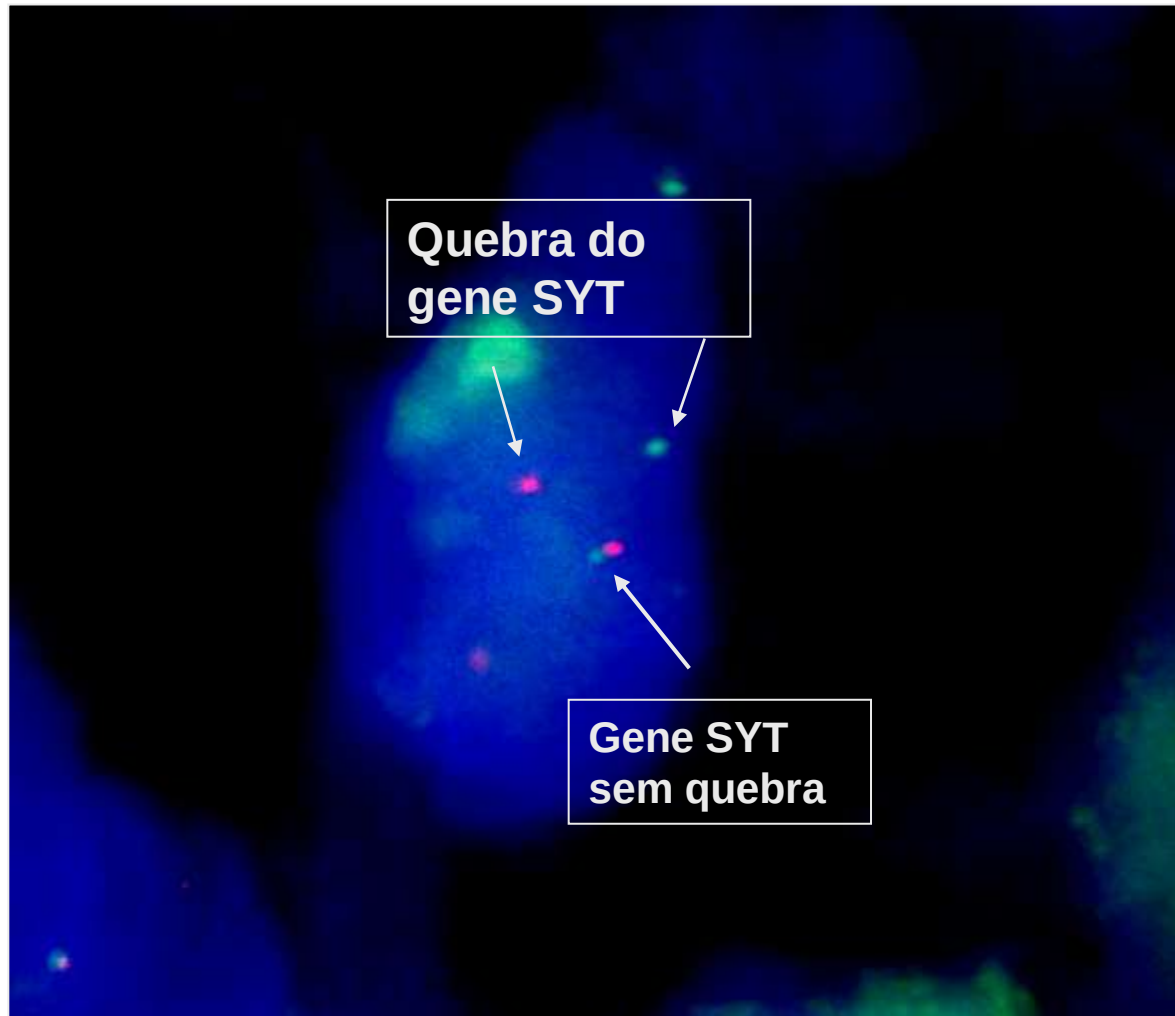
Importância das Translocações Cromossômicas

- ✓ São consistentemente encontradas nos tumores
- ✓ São tumor-específicas
- ✓ Oportunidade de utilização em:
 - ✓ **Entender o fenômeno biológico**
 - ✓ **Auxiliar no diagnóstico**
 - ✓ **Potencial alvo terapêutico**

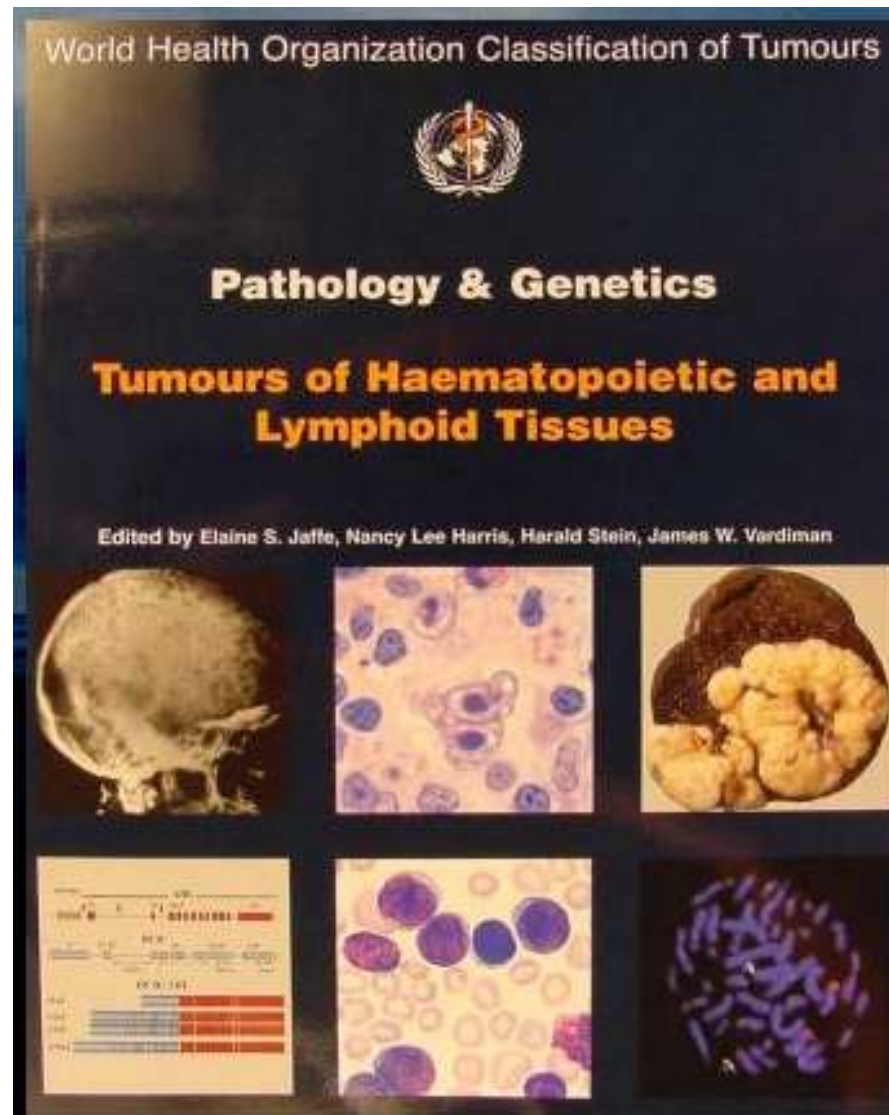
Translocações em Sarcomas

Tumor	translocação
PNET/Ewing	t(11;22), t(21;22), t(7;22), t(1;16)
Sa cels. Claras	t(12;22)
DSCRT	t(11;22)(p13;q12)
Lipo Cels redondas	t(12;16)
Rabdiomiosa alveolar	t(2;13); t(1;13)
Sa sinovial	t(X;18)
Sa Alveolar de PM	t(X;17)
Liposa Mixóide	t(12;16), t(12;22)

Break apart probe



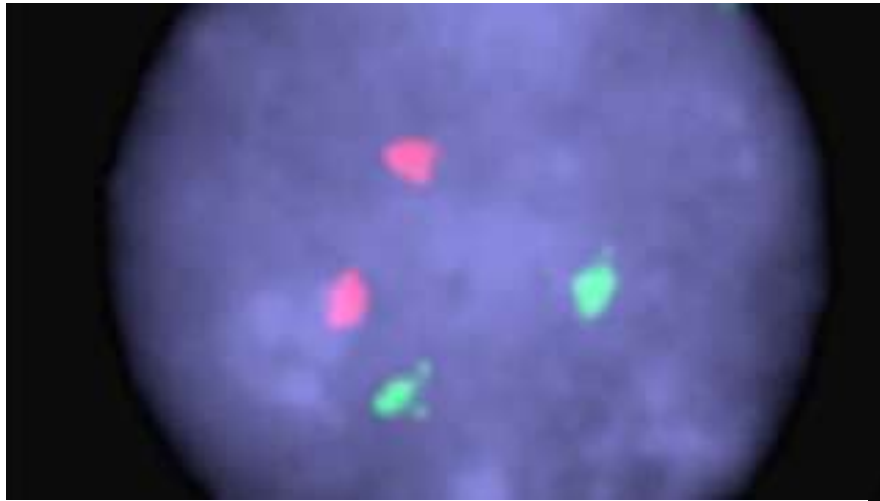
LINFOMAS



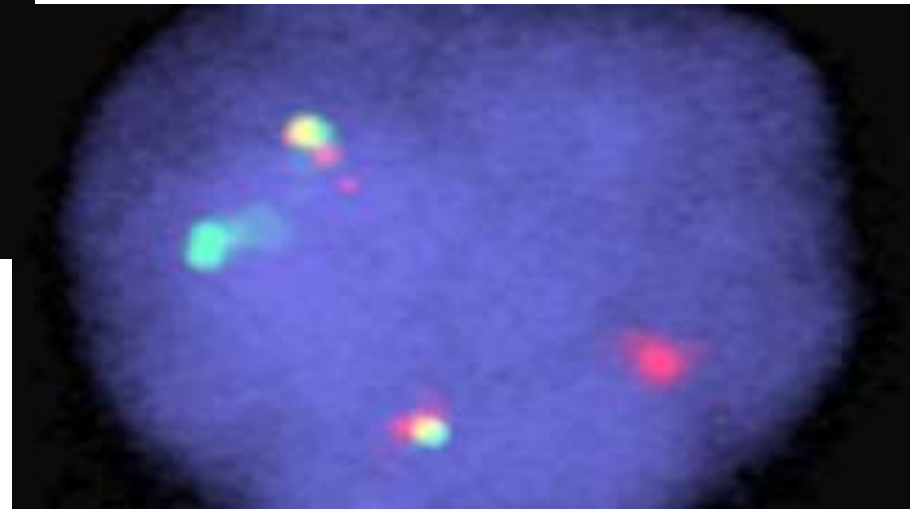
Linfomas B

<i>Tumor</i>	<i>Alterações Cromossômicas</i>	<i>Genes envolvidos</i>
Linfoma folicular	t(14;18) (q32;q21) t(2;18) (p12;q21)	IGH-BCL2 IGλ-BCL2
Linfoma de células do manto	t(11;14) (q13;32) deleção 11q22-23	IGH-BCL1 ATM
Linfoma de células da zona marginal	t(11;18) (q21;q21) t(14;18) (q32;q21) t(3;14) (p14.1;q32)	API2-MALT1 IGH-MALT1 IGH-FOXP1
Linfoma linfocítico/leucemia linfocítica crônica	Deleções de 13q14, 11q22-23, 17p13, 6q21 Trissomia 12	desconhecidos
Linfoma difuso de grandes células B	t(14;18) (q32;q21) rearranjos de 3q27	IGH-BCL2 BCL6
Linfoma de Burkitt	t(8;14) (q24;q32) t(8;22) (q24;q11) t(2;8) (p12;q24)	IGH-CMYC IGκ-CMYC IGλ-CMYC

Linfoma do Manto: Translocação t(11/14)

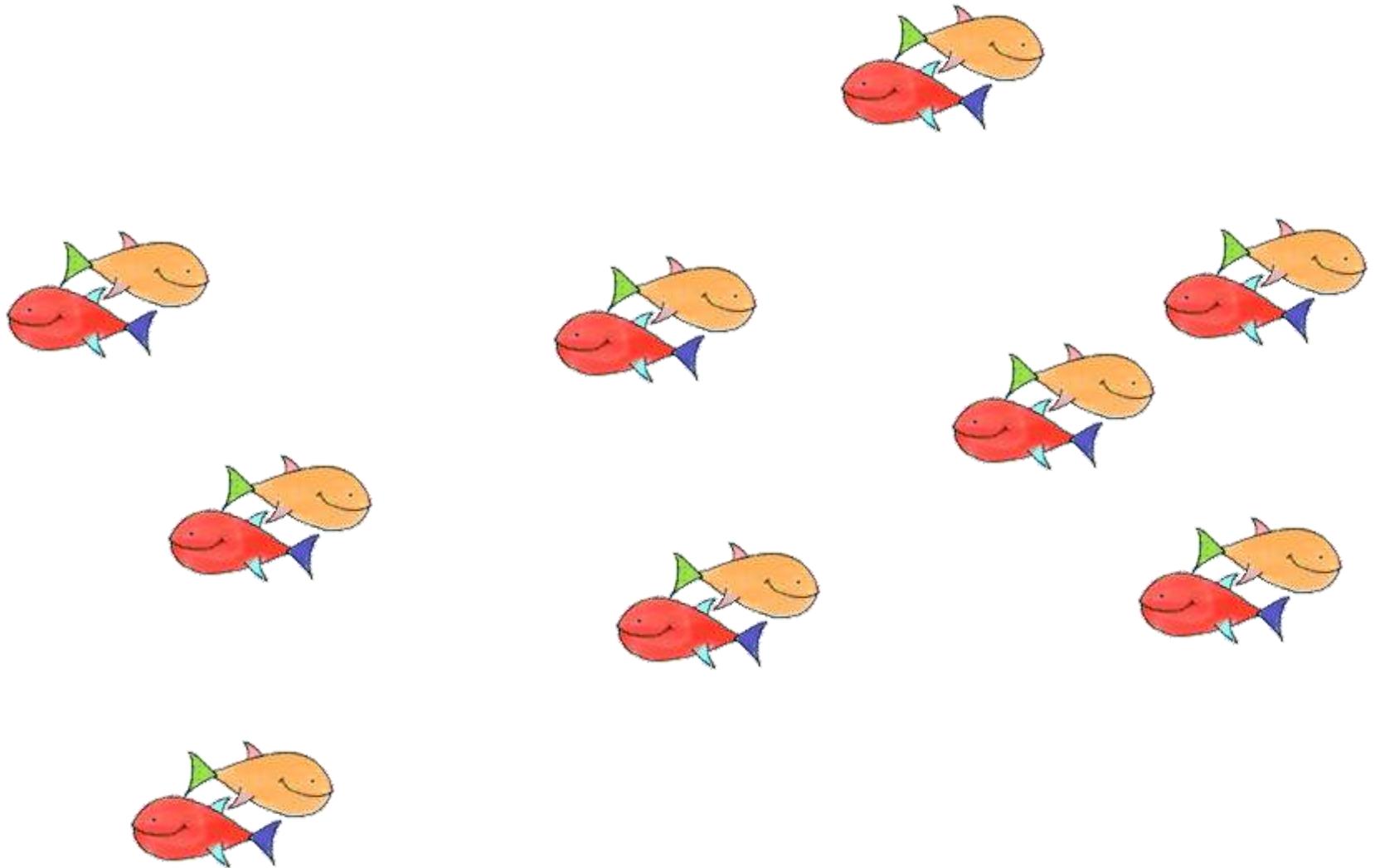


Célula normal



t (11;14)

ALTERAÇÕES NUMÉRICAS (Amplificações)



Algumas Aplicações

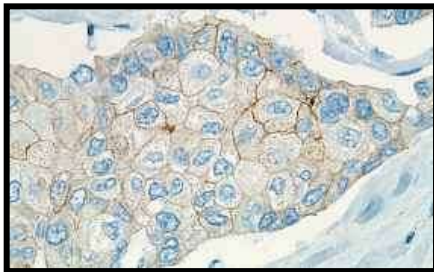
- ✓ Câncer de Mama e Estômago:
 - ✓ A superexpressão de oncogenes tem papel importante na progressão de vários tumores.



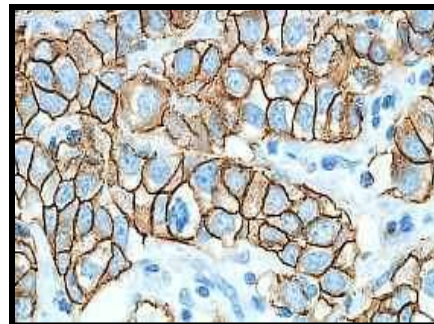
Detectando HER-2 - Imunoistoquímica

HercepTest > Guidelines for Scoring HercepTest

Score to report	HER2 protein overexpression assessment	Staining pattern
0	Negative	No staining is observed, or faint membrane staining present in less than 10% of infiltrating tumor cells.
1+	Negative	A faint/barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the infiltrating tumor cells. The cells exhibit incomplete membrane staining.
2+	Positive	A weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the infiltrating tumor cells.
3+	Positive	A strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the infiltrating tumor cells.



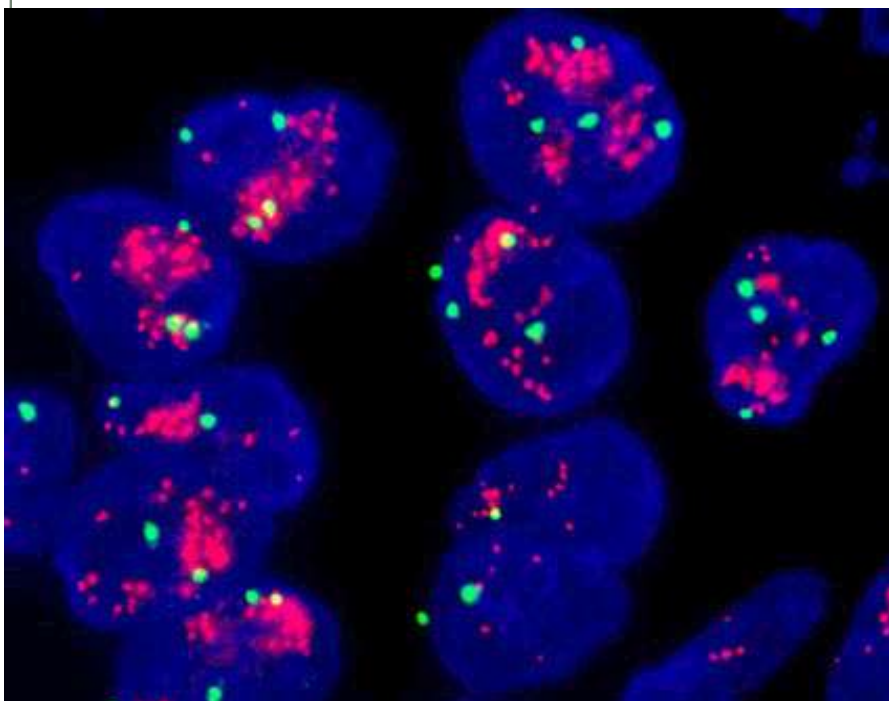
Score 1+



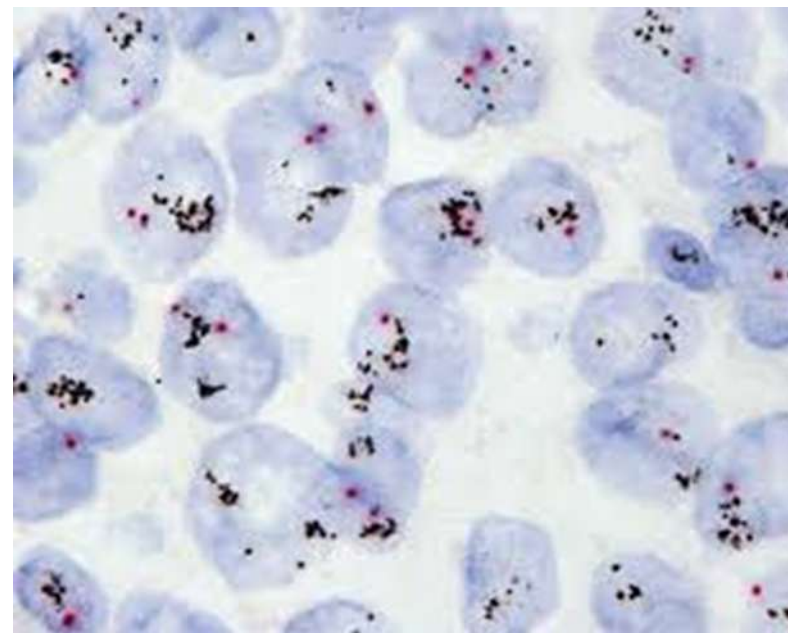
Score 2+



Score 3+



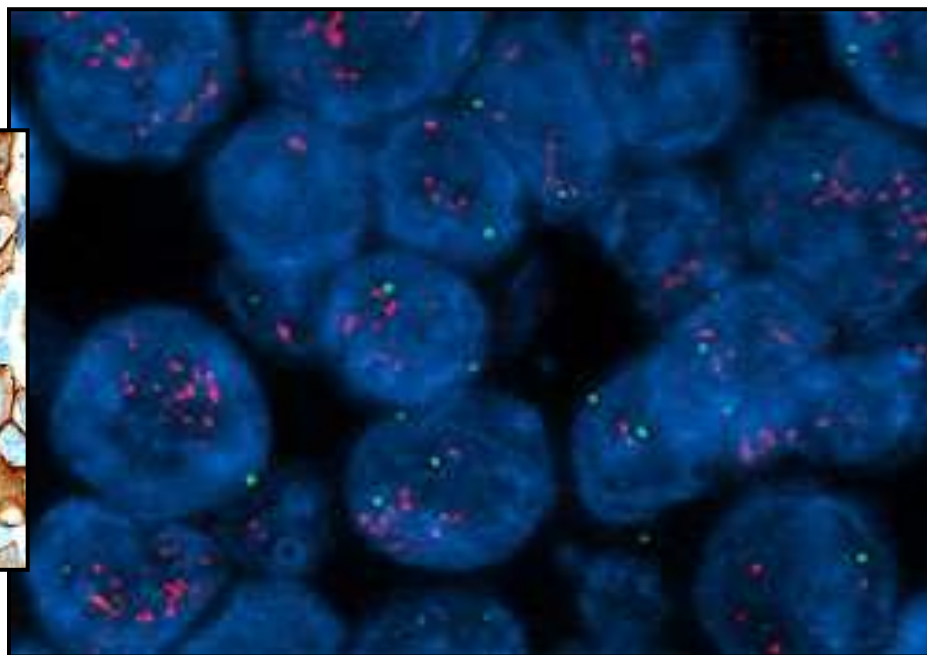
Cromossomo 17 em verde e os genes Her2 em laranja.



Cromossomo 17 em vermelho e os genes HER-2 em preto.

Detectando HER-2 – ASCO GUIDELINE 2007

- Quando há positividade de expressão de proteína uniforme e homogênea, muito provavelmente, o tumor apresenta amplificação do gene

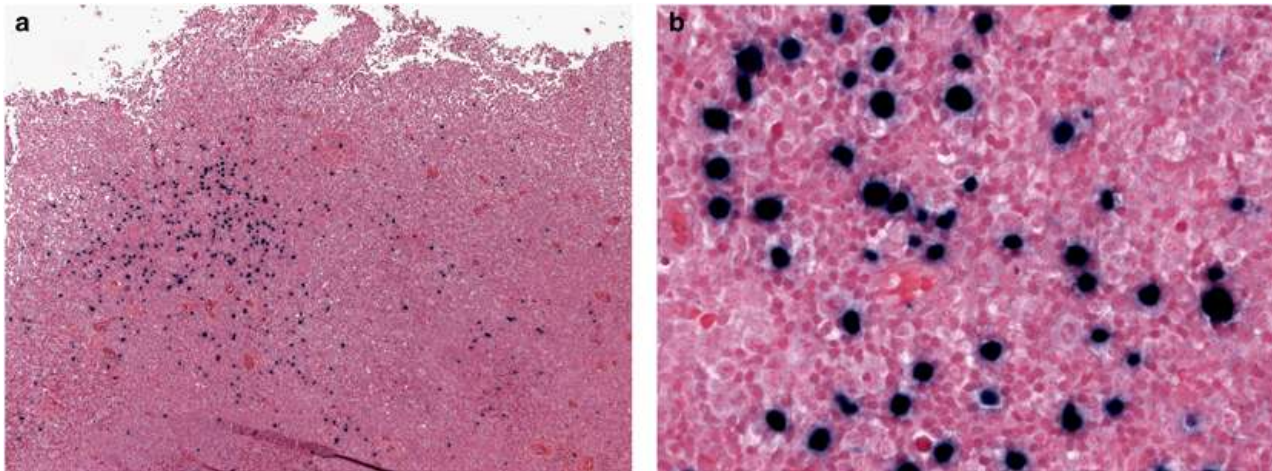


Herceptin

- ✓ O Trastuzumabe (Herceptin) é um anticorpo monoclonal desenvolvido para bloquear o receptor de membrana
- ✓ Apenas se beneficiam desse tratamento: IHQ 3+ ou FISH+/SISH+



Detecção agentes virais : EBV - HPV



Considerações Finais

- ✓ Hibridização in situ
 - ✓ Técnica baseada na detecção de alterações cromossômicas estruturais e/ou numéricas
 - ✓ Útil no diagnóstico e prognóstico das neoplasias
 - ✓ Também utilizada para detecção de infecções virais
 - ✓ Pode ser utilizada em material parafinado
 - ✓ Preserva a morfologia

XX Congresso Brasileiro
de Histotecnologia

Belo Horizonte
Novembro- 2017

