



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização  
REF: LPS 018-S/LPS 018

## FGFR1 Breakpart/Amplification Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em [www.ogt.com](http://www.ogt.com)

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais e serve de forte adjuvante à citogenética clássica. Desenvolvimentos recentes fizeram com que esta valiosa técnica possa agora ser aplicada também à avaliação de biopsias de tumores sólidos, o que pode fornecer informações importantes para a previsão da progressão do tumor. As metodologias atuais, nomeadamente a imuno-histoquímica ou a "Southern blotting", podem fornecer informações ao nível da expressão genética mas, quando realizadas em secções de tecido (quer incluído em crióstato ou parafina), a FISH pode fornecer informações ao nível do gene, *in situ*, no local exato dentro do tumor. Isto pode revelar a heterogeneidade entre células e permitir a deteção de pequenos clones de células geneticamente distintas.

### Informações sobre a sonda

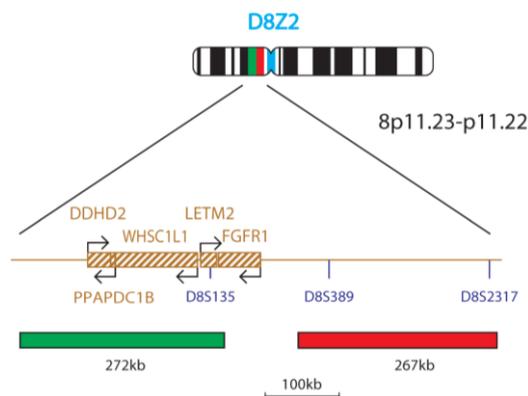
O recetor do fator de crescimento de fibroblastos 1 (FGFR1), localizado no cromossoma 8, foi o primeiro gene a ser ampliado em alguns cânceros da mama<sup>1</sup> e é também translocado para alguns pacientes com síndrome mieloproliferativa 8p11<sup>2</sup>. Pensa-se que a amplificação do gene seja o fator responsável por cerca de 10% dos tumores mamários<sup>3</sup> e demonstrou fornecer um mau prognóstico aos pacientes, uma vez que a sobre-expressão do produto do gene pode resultar numa recidiva precoce<sup>4</sup>.

Em comum com outros defeitos genéticos em perturbações linfoproliferativas, como a translocação BCR/ABL na LMC, o gene FGFR1 contém sequências que podem codificar uma proteína tirosina quinase putativa<sup>5, 6</sup>, que tem sido implicada na síndrome mieloproliferativa (também conhecida como EMS ou síndrome de leucemia/linfoma de células estaminais, SCLL), sublinhando a importância deste gene tanto em tumores sólidos como em cânceros no sangue. Existem, pelo menos, oito genes parceiros envolvidos com translocações do FGFR1, incluindo ZNF198 (o mais comum<sup>7</sup>), FOP, CEP110, BCR, HERV-K, FGFR10P2, TIF1 e MYO18A<sup>8</sup>.

A CytoCell desenvolveu uma sonda FISH de amplificação e quebra combinada de três cores para o FGFR1 que pode ser utilizada em amostras de medula óssea de pacientes com síndrome mieloproliferativa (EMS) ou em secções de tecido de pacientes em que se pode suspeitar de amplificação do gene. Na EMS, a estratégia de quebra mostrará a divisão de um dos dois sinais de fusão, assim como um centrómero azul para especificar o cromossoma 8. Em pacientes que estão a ser testados para amplificações de FGFR1, a sonda FISH do FGFR1 não translocado aparecerá como um sinal de fusão e este aparecerá amplificado. A sonda centromérica do cromossoma 8 atuará também como uma sonda de controlo nestes casos.

### Especificação da sonda

FGFR1, 8p11.23-p11.22, Vermelho  
FGFR1, 8p11.23-p11.22, Verde  
D8Z2, 8p11.1-q11.1, Azul



A FGFR1 Breakpart/Amplification probe consiste numa sonda de 272 kb verde e numa sonda de 267 kb vermelha, que estão posicionadas em cada lado do gene FGFR1. A sonda centromérica 8 azul atua como um controlo para o cromossoma 8.

### Materiais fornecidos

**Sonda:** 50 µl por frasco (5 testes) ou 100 µl por frasco (10 testes)  
Quantidade de sonda de FGFR1 vermelha: 80-100ng/teste  
Quantidade de sonda de FGFR1 verde: 240-300ng/teste  
Quantidade de sonda centromérica 8 azul: 84-105 ng/teste  
As sondas são fornecidas pré-misturadas em solução de hibridização (formamida; sulfato de dextrano; SSC) e estão prontas para uso.

### Contracorante: 150 µl por frasco (15 testes)

O contracorante é o DAPI Antifade (ES: 0,125 µg/ml DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol)).

### Advertências e precauções

1. Para utilização em diagnóstico *in vitro*. Apenas para uso profissional.
2. Utilize luvas quando manusear sondas de ADN e o contracorante DAPI.
3. As soluções de sonda contêm formamida, que é um teratogénico. Não inale vapores provenientes das mesmas nem permita o contacto com a pele. Utilize luvas, uma bata de laboratório e manuseie num exaustor de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
4. O DAPI é um potencial agente cancerígeno. Manuseie com cuidado. Utilize luvas e uma bata de laboratório. Para a respetiva eliminação, lave com um grande volume de água.
5. Todos os materiais perigosos devem ser eliminados de acordo com as diretrizes da sua instituição relativamente à eliminação de resíduos perigosos.

### Conservação e manuseamento

O kit deve ser conservado num congelador a uma temperatura entre -25 °C a -15 °C, até ao prazo de validade indicado no rótulo do kit. Os frascos de sonda e de contracorante têm de ser conservados num local escuro.

### Equipamento necessário, mas não fornecido

1. Placa quente (com uma placa sólida e controlo exato da temperatura até 80 °C).
2. Micropipetas e pontas de volume variável, entre 1 µl e 200 µl.
3. Banho-maria com controlo exato da temperatura de 72 °C.
4. Tubos de microcentrifugação (0,5 ml).
5. Microscópio de fluorescência (ver secção "Recomendação de microscópio de fluorescência").
6. Jarras de Coplin em plástico ou vidro.
7. Pinça.
8. Óleo de imersão de lentes para microscópio de fluorescência.
9. Centrifugadora de bancada.
10. Lâminas de microscópio.
11. Lamelas de 24 x 24 mm.
12. Temporizador.
13. Incubadora a 37 °C.
14. Cola de solução de borracha.
15. Kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

### Recomendação de microscópio de fluorescência

Para obter a melhor visualização possível da sonda, recomendamos uma lâmpada de mercúrio de 100 Watts e lentes planas apocromáticas 63x ou 100x. O filtro passa-banda triplo DAPI/FITC/Texas Red é ideal para visualizar todas as substâncias fluorescentes e DAPI simultaneamente. Alternativamente, para a visualização de substâncias fluorescentes vermelhas e verdes, utilize o filtro passa-banda duplo FITC/Texas Red. A substância fluorescente azul tem especificidade para o espectro Aqua e DEAC (é necessário um filtro passa-banda simples Aqua ou DEAC).

### Preparação das amostras

Este kit foi concebido para utilização em:

- Secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou Tissue Microarrays (TMA); devem ser utilizadas secções de tecido com uma espessura de 4 µm-6 µm.
- Amostras de sangue periférico ou culturas de células da medula óssea fixadas no fixador de Carnoy e secas ao ar em lâminas de microscópio de acordo com procedimentos citogenéticos padrão.

Todas as amostras devem ser preparadas de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa.

### Protocolo da FISH

(Nota: Certifique-se de que a exposição da sonda às luzes do laboratório está sempre limitada).

## Procedimento de FFPE

### Pré-tratamento das amostras de tecido

O pré-tratamento das amostras de tecido deve ser feito de acordo com as diretrizes do laboratório ou da instituição em causa. Para obter os melhores resultados, utilize o kit de pré-tratamento de tecidos (LPS 100).

### Pré-desnaturação

1. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à temperatura ambiente (TA)
2. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
3. Retire 10 µl–15 µl (consoante o tamanho do tecido) de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
4. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
5. Coloque 10 µl–15 µl da solução de sonda na amostra e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

### Desnaturação

6. Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos.

### Hibridização

7. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) e deixe-a no mesmo de um dia para o outro.

### Lavagens pós-hibridização

8. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
9. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
10. Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
11. Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
12. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
13. Visualize com um microscópio de fluorescência.

## Procedimento de sangue periférico ou culturas de medula óssea

### Preparação das lâminas

1. Coloque uma gota de amostra celular numa lâmina de microscópio de vidro. Deixe secar.
2. Mergulhe a lâmina em SSC 2x durante 2 minutos à temperatura ambiente (TA) sem agitar.
3. Desidrate numa série de etanol (70%, 85% e 100%), cada uma durante 2 minutos à TA.
4. Deixe secar.

### Pré-desnaturação

5. Retire a sonda do congelador e deixe-a aquecer até à TA.
6. Certifique-se de que a solução da sonda é uniformemente misturada com uma pipeta.
7. Retire 10 µl de sonda por cada teste e transfira-os para um tubo de microcentrifugação. Reponha o restante volume da sonda no congelador.
8. Coloque a sonda e a lâmina da amostra numa placa quente a 37 °C (+/- 1 °C) durante 5 minutos para pré-aquecimento.
9. Coloque 10 µl da solução de sonda na amostra de células e aplique uma lamela com cuidado. Vede com cola de solução de borracha e deixe a cola secar completamente.

### Desnaturação

10. Desnatura a amostra e a sonda em simultâneo aquecendo a lâmina numa placa quente a 75 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos.

### Hibridização

11. Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) e deixe-a no mesmo de um dia para o outro.

### Lavagens pós-hibridização

12. Retire a lamela e todos os vestígios de cola com cuidado.
13. Mergulhe a lâmina em SSC 0,4x (pH 7,0) a 72 °C (+/- 1 °C) durante 2 minutos sem agitar.
14. Drene a lâmina e mergulhe-a em SSC 2x e 0,05% de Tween-20 à TA (pH 7,0) durante 30 segundos sem agitar.
15. Drene a lâmina e aplique 10 µl–15 µl de DAPI Antifade em cada amostra.
16. Cubra a amostra com uma lamela, elimine eventuais bolhas e deixe a cor desenvolver-se no escuro durante 10 minutos.
17. Visualize com um microscópio de fluorescência.

### Comentários

A eficiência da hibridização e a morfologia dos tecidos estão geralmente correlacionadas negativamente. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridização (por exemplo, um tempo prolongado de digestão enzimática) tendem a destruir a estrutura das células e a morfologia dos tecidos. No entanto, o pré-tratamento suave poupando as estruturas de tecido pode não ser suficiente para a penetração da sonda e para obter resultados de FISH bem sucedidos.

A duração ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestão enzimática dependerá da idade do bloco, da composição do tecido e da qualidade da fixação do tecido. A digestão enzimática deve ser reduzida para biopsias de agulha grossa e quaisquer secções que contenham poucas células tumorais ou que tenham grandes áreas de necrose. Estas amostras têm de ser manuseadas com especial cuidado para evitar uma digestão excessiva.

## Estabilidade das lâminas acabadas

As lâminas de FISH permanecem analisáveis durante um período máximo de 1 mês se conservadas no escuro a uma temperatura inferior a 4 °C.

## Recomendações para o procedimento

1. Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento de lâminas que contêm amostras de sangue periférico ou medula óssea, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
2. As condições de hibridização podem ser negativamente afetadas pela utilização de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
3. Recomenda-se vivamente a utilização de um termómetro calibrado para medir as temperaturas das soluções, banhos-maria e incubadoras, visto que estas temperaturas são críticas para o desempenho ideal do produto.
4. As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligação não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
5. Uma desnaturação incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturação excessiva também pode resultar numa ligação não específica.

## Resultados esperados

A CytoCell desenvolveu uma sonda FISH de amplificação e quebra combinada de três cores para o FGFR1 que pode ser utilizada em amostras de medula óssea de pacientes com EMS ou na secção de tecido em pacientes possivelmente amplificados.

Como o envolvimento do domínio da tirosina quinase do FGFR1 é importante na EMS, a deteção do gene parceiro envolvido é menos importante do que estabelecer que houve uma translocação que interrompeu o gene FGFR1. Nestes casos, a estratégia de quebra mostrará a divisão convencional de um dos dois sinais de fusão num sinal vermelho e num sinal verde, juntamente com um centrómero 8 azul para especificar o cromossoma 8. Embora não seja estritamente relevante nestes casos, esta sonda adicional pode atuar como um enumerador adicional em alguns casos.

Em pacientes que estão a ser testados para amplificações de FGFR1, a estratégia de quebra não é relevante, mas o sinal FISH do FGFR1 não translocado aparecerá como uma sonda de fusão e é este sinal de fusão que aparecerá amplificado. De forma a enumerar corretamente esta sonda em secções de tecido, a sonda centrómerica cromossoma 8, incluída numa cor contrastante (azul), é útil.

Numa célula normal, devido à justaposição próxima das sondas, serão observados dois sinais de fusão amarelos e dois sinais de controlo azuis (2A, 2Az). No caso de uma translocação 8p11, observar-se-á uma divisão e um sinal fundido resultando numa conformação amarela, numa vermelha, numa verde e em duas conformações azuis (1A, 1V, 1Verd, 2Az). No caso de uma amplificação do gene FGFR1, serão observados três ou mais sinais de fusão amarelos e dois sinais de controlo azuis (3+A, 2Az).

## Limitações

A comunicação e interpretação dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideração outras informações clínicas e de diagnóstico. Este kit destina-se a ser utilizado como adjuvante de outros testes de diagnóstico laboratoriais e não deve ser iniciada qualquer medida terapêutica apenas com base nos resultados da FISH.

## Informações adicionais

Para obter mais informações sobre o produto, contacte o departamento de assistência técnica da CytoCell.

T: +44 (0)1223 294048

E: techsupport@cytozell.com

W: www.ogt.com

## Bibliografia

1. Theillet *et al.*, Genes Chromosomes Cancer 1993;7:219-26
2. Macdonald *et al.*, Leukemia 1995;9:1628-30
3. Courjal F *et al.*, Cancer Res 1997;57(19):4360-7
4. Turner N *et al.*, Cancer Res 2010;70(5):2085-94
5. Ruta M *et al.*, Oncogene 1988;3:9-15
6. Smedley *et al.*, Hum Mol Genet 1998;7(4):637-42
7. Xiao *et al.*, Nature Genet 1998;18:84-7
8. Huret JL. FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 2008

## Glossário de símbolos

	pt: Número de catálogo
	pt: Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
	pt: Código de lote
	pt: Consulte as Instruções de Utilização
	pt: Fabricante
	pt: Prazo de validade

	<b>pt:</b> Limite de temperatura
	<b>pt:</b> Manter afastado da luz solar
	<b>pt:</b> Suficiente para <n> testes
	<b>pt:</b> Conteúdo

**Patentes e marcas comerciais**

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.



**CytoCell Limited**  
Oxford Gene Technology  
418 Cambridge Science Park  
Milton Road  
Cambridge  
CB4 0PZ  
UNITED KINGDOM

T: +44(0)1223 294048  
F: +44(0)1223 294986  
E: [probes@cytoCell.com](mailto:probes@cytoCell.com)  
W: [www.ogt.com](http://www.ogt.com)