



A Sysmex Group Company



Instruções de Utilização
REF: LPS 036-S/LPS 036

P16 Deletion Probe



APENAS PARA USO PROFISSIONAL

PORTUGUÊS

Mais informações disponíveis em www.ogt.com

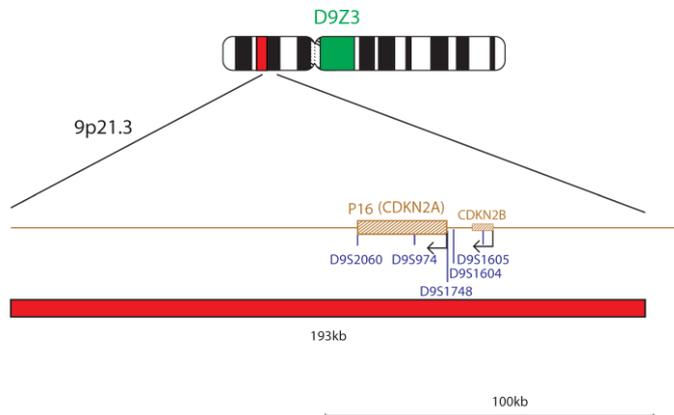
A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é uma técnica que permite detetar sequências de ADN em cromossomas metafásicos ou em núcleos interfásicos de amostras citogenéticas fixadas. A técnica recorre a sondas de ADN que se hibridizam com cromossomas inteiros ou sequências únicas individuais 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. Quando é realizada 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 linfoma difuso de grandes células B (LDGCB) é a forma mais frequente de linfoma agressivo e as deleções do locus P16 (agora conhecido como CDKN2A) ocorrem em aproximadamente um terço dos doentes com LDGCB¹. O gene CDKN2A codifica um inibidor da quinase dependente de ciclina que funciona no controlo da fosforilação do Retinoblastoma (RB), uma proteína que é frequentemente hipermetilada nos linfomas². Existem dois produtos proteicos produzidos pelo gene CDKN2A, o P16 e o P14ARF, sendo este último um produto de leitura alternativa. Estes produtos proteicos têm sido associados a duas vias de supressão de tumores, a RB e a p53. O P16 inibe a fosforilação da RB, enquanto o P14ARF visa a MDM2, uma proteína inibidora de P53, para degradação. Uma deleção do gene CDKN2A perturbaria, portanto, ambas as vias³. As perdas de CDKN2A estão significativamente associadas a uma sobrevivência mais curta após o tratamento⁴.

Especificação da sonda

P16, 9p21.3, Vermelho
D9Z3, 9q12, Verde



A sonda de P16, marcada a vermelho, abrange uma região de 193 kb em 9p21.3, estendendo-se desde 105 kb telomericamente em relação ao gene P16 (CDKN2A) a 46 kb centromericamente em relação ao CDKN2B. A mistura de sondas também contém uma sonda de controlo para o cromossoma 9 (D9Z3, o bloco heterocromático em 9q12) marcada a verde.

Materiais Fornecidos

Sonda: 50 µl por tubo (5 testes) ou 100 µl por tubo (10 testes)
Quantidade de sonda vermelha de P16: 160–200ng/teste
Quantidade de sonda verde de D9Z3: 120–150 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. Use 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. Use 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. Use 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 e -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.

Preparação das Amostras

Este kit foi concebido para utilização em:

- Secções de tecido fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) ou microarrays de tecido (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.

Protocolo do 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.

Desnaturaçã

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

Hibridizaçã

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridizaçã

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

Procedimento de Sangue Periférico ou Culturas de Medula Óssea

Preparação das lâminas

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

Pré-desnaturaçã

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

Desnaturaçã

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

Hibridizaçã

- Coloque a lâmina num recipiente húmido resistente à luz a 37 °C (+/- 1 °C) durante toda a noite.

Lavagens pós-hibridizaçã

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

Comentários

A eficiência da hibridizaçã e a morfologia dos tecidos estão geralmente correlacionadas negativamente. Os procedimentos de pré-tratamento agressivos que melhoram a eficiência da hibridizaçã (por exemplo, um tempo prolongado de digestã 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 penetraçã da sonda e para obter resultados de FISH bem-sucedidos.

A duraçã ideal do pré-tratamento térmico e do tempo de digestã enzimática dependerá da idade do bloco, da composiçã do tecido e da qualidade da fixaçã do tecido. A digestã 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 digestã 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

- Não é recomendado o aquecimento ou envelhecimento de lâminas que contém amostras de sangue periférico ou medula óssea, uma vez que tal pode reduzir a fluorescência do sinal.
- As condições de hibridizaçã podem ser negativamente afetadas pela utilizaçã de reagentes que não sejam os fornecidos ou recomendados pela CytoCell Ltd.
- Recomenda-se vivamente a utilizaçã 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.
- As concentrações de lavagem, o pH e as temperaturas são importantes, visto que condições pouco rigorosas podem resultar numa ligaçã não específica da sonda e condições demasiado rigorosas podem resultar na ausência de sinal.
- Uma desnaturaçã incompleta pode resultar em ausência de sinal e uma desnaturaçã excessiva também pode resultar numa ligaçã não específica.

Resultados Esperados

Numa célula normal, esperam-se dois sinais vermelhos e dois sinais verdes (2R, 2G). Uma célula com uma deleçã hemizigótica do P16 deve ter um sinal vermelho e dois sinais verdes (1R, 2G), enquanto uma célula com uma deleçã homozigótica não deve ter nenhum sinal vermelho e dois sinais verdes (0R, 2G).

Limitações

A comunicaçã e interpretaçã dos resultados da FISH devem ser consistentes com as normas da prática profissional e devem tomar em consideraçã 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@cytoCell.com

W: www.ogt.com

Bibliografia

- Guney *et al.*, Genes Chromosomes Cancer. 2012 Sep;51(9):858-67
- Chim *et al.*, Hum Pathol. 2007 Dec;38(12):1849-57
- Møller *et al.*, Leukemia. 1999 Mar;13(3):453-9
- Jardin *et al.*, Blood. 2010 Aug 19;116(7):1092-104

REF	PT: Número de catálogo
	PT: Dispositivo de diagnóstico <i>in vitro</i>
	PT: Código de lote
	PT: Consulte as Instruções de utilizaçã
	PT: Fabricante
	PT: Prazo de validade
	PT: Limites de temperatura
	PT: Suficiente para <n> testes
	PT: Conteúdo

Patentes e Marcas Comerciais

CytoCell é uma marca registada da CytoCell Ltd.

Este produto contém tecnologia licenciada pela Life Technologies Corporation e está disponível apenas para uso em diagnósticos humanos ou para fins de investigaçã na área das ciências da vida.

CytoCell Ltd.

Oxford Gene Technology,
418 Cambridge Science Park,
Milton Road,
Cambridge, CB4 0PZ, UK
T: +44(0)1223 294048
F: +44(0)1223 294986
E: probes@cytoCell.com
W: www.ogt.com

