

HISTOTECNOLOGIA APLICADA

Prof. Carina Ladeira
Mai 2008

HISTOTECNOLOGIA APLICADA

MICRODISSECÇÃO A LASER

Microdissecação a Laser

- Microdissecação Captura Laser (LCM) é uma técnica desenvolvida pelo Instituto Nacional do Cancro (Instituto Nacional de Saúde, Bethesda)
- O desenvolvimento desta técnica encontra-se integrado no Projecto Anatomia do Genoma do Cancro
- Este projecto pretende compilar os catálogos de expressão de genes por tecidos normais, pré-neoplásico e neoplásicos
- Importante ferramenta para providenciar amostras celulares puras que irão constituir bibliotecas de expressão de genes humanos

Microdissecação a Laser

- Microdissecação a laser (LCM) é um método que permite a procura de subpopulações de células de tecidos através de visualização microscópica directa
- A tecnologia LCM extrai as células de interesse
- Recentemente, a etiologia e patogénese de um grande n.º de doenças verifica que estas podem estar relacionadas com alterações de genes, nos produtos génicos e vias bioquímicas relacionadas
- Para melhor compreensão do processo da doença têm sido desenvolvidas estratégias que relacionem as alterações moleculares com a morfologia microscópica

Microdissecação a Laser

- A combinação de procedimentos analíticos de elevada sensibilidade como o PCR e a de técnica de microdissecação em preparações histológicas e citológicas tem se constituindo como um importante instrumento para obter populações de células purificadas a partir de tecidos primários complexos
- Tem importantes avanços em termos de rapidez, facilidade de utilização e versatilidade
- Baseia-se na aderência das células seleccionadas a uma membrana termoplástica

Microdissecação a Laser

- Os tecidos são constituídos por diferentes tipos de células e matrizes, conferindo diferentes heterogeneidades
- Existem alterações moleculares específicas de um determinado tipo de células
- Por tudo isto, deve existir uma correlação da patologia a nível morfológico e molecular
- Este processo requer a procura de populações puras de células semelhantes morfológicamente para a realização de análise molecular



Microdissecação a laser

Microdissecação a Laser

- Existem 2 técnicas básicas de LCM que utilizam laser IV ou UV
- **Microdissecação de Captura a Laser**
- **Microdissecação Corte a Laser**
- Apesar desta terminologia, considera-se apenas LCM

Microdissecação a Laser

- Visualização das células de interesse via microscópio
- Transferência da energia laser para um polímero termolábil com formação de um composto polímero e células (Sistema IV)
- Remoção das células de interesse do tecido heterogêneo
- São sistemas compatíveis com uma variedade de tipos de tecidos, técnicas de coloração, fixação e arquivos

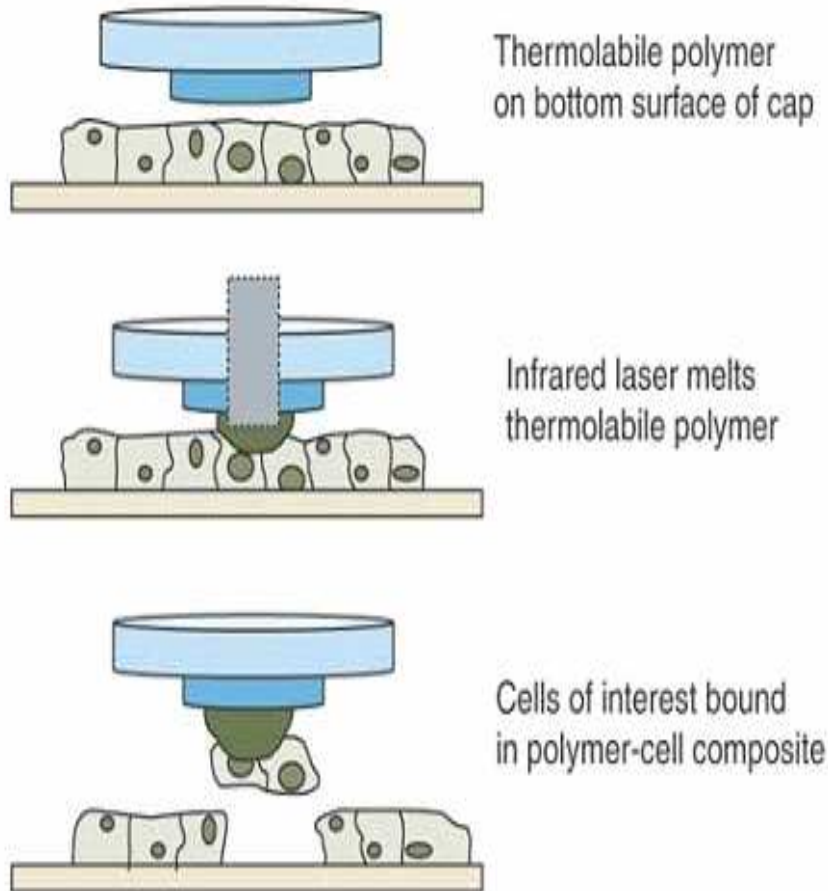
Microdissecação Captura Laser (LCM)

- Laser IV (temperatura $<70^{\circ}\text{C}$)
- Não corta o tecido
- Utiliza uma membrana termoplástica de acetato de etil-vinilo que derrete e envolve o tecido desejado
- A membrana derretida agrega-se as células seleccionadas e são encaminhadas para um tubo que contém uma solução de extracção
- O tecido envolvente das células seleccionadas permanece inalterável

Microdissecação Captura Laser (LCM)

- Lesões específicas ou tipos celulares de tecidos complexos podem ser facilmente removidos sem dano morfológico da zona seleccionada e do tecido adjacente
- Esta estratégia permite que uma única célula inserida no meio de centenas de células seja procurada e removida com segurança
- Este método é especialmente utilizado para o isolamento de células individuais ou pequenos grupos celulares

Princípio e Base Técnica da LCM

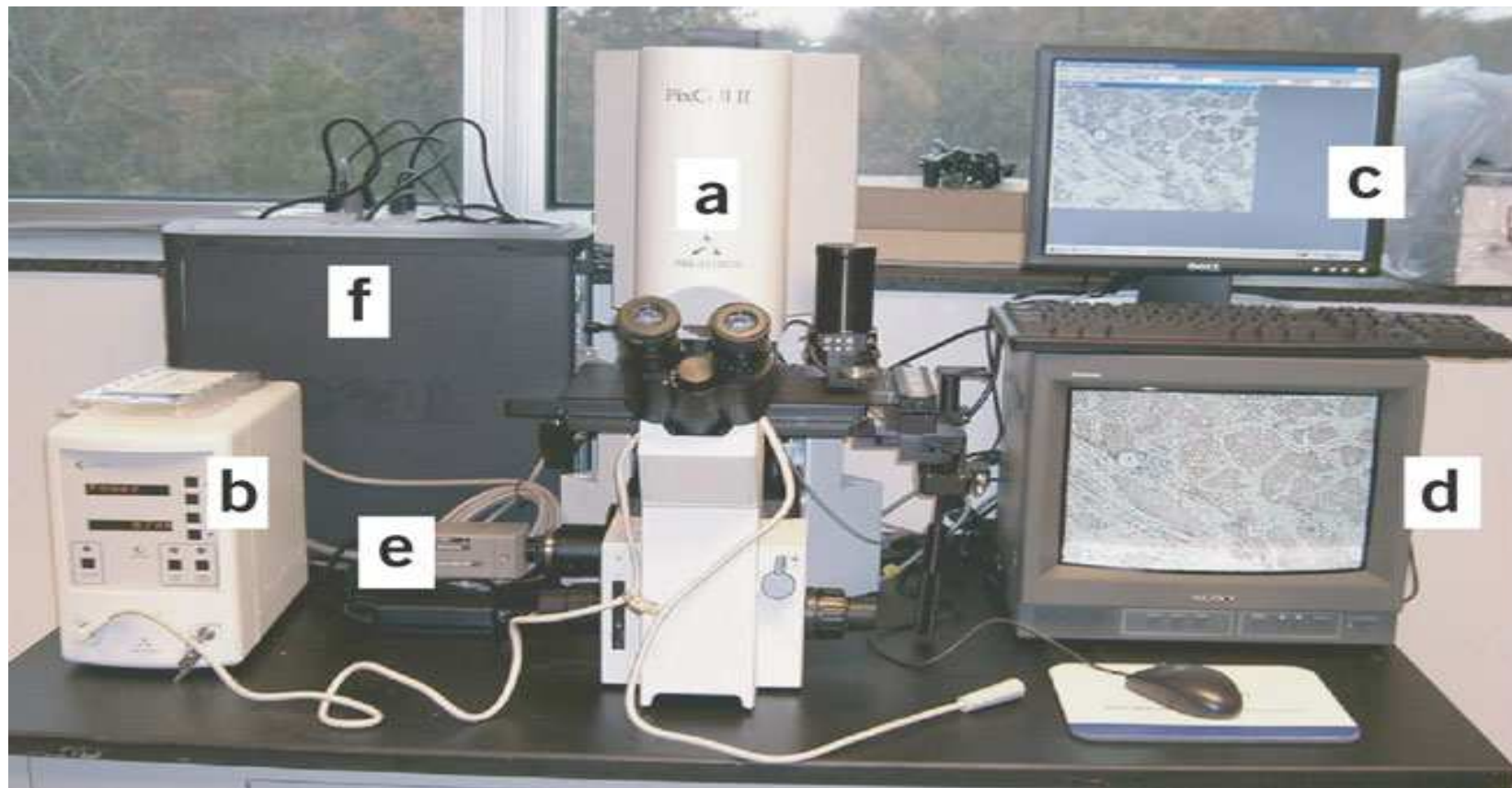


Um polímero termolábil é colocado na lâmina histológica

Laser IV “derrete” o polímero

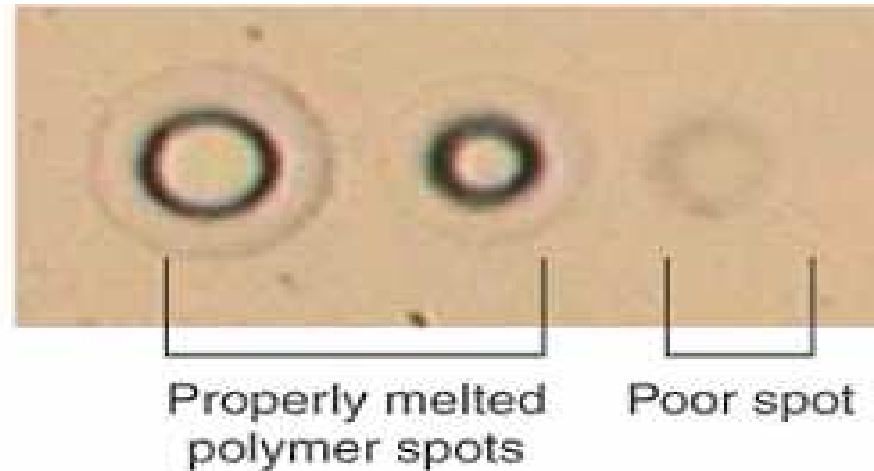
É formado um composto de polímero e células que foram removidas do tecido

LCM PixCell IIe



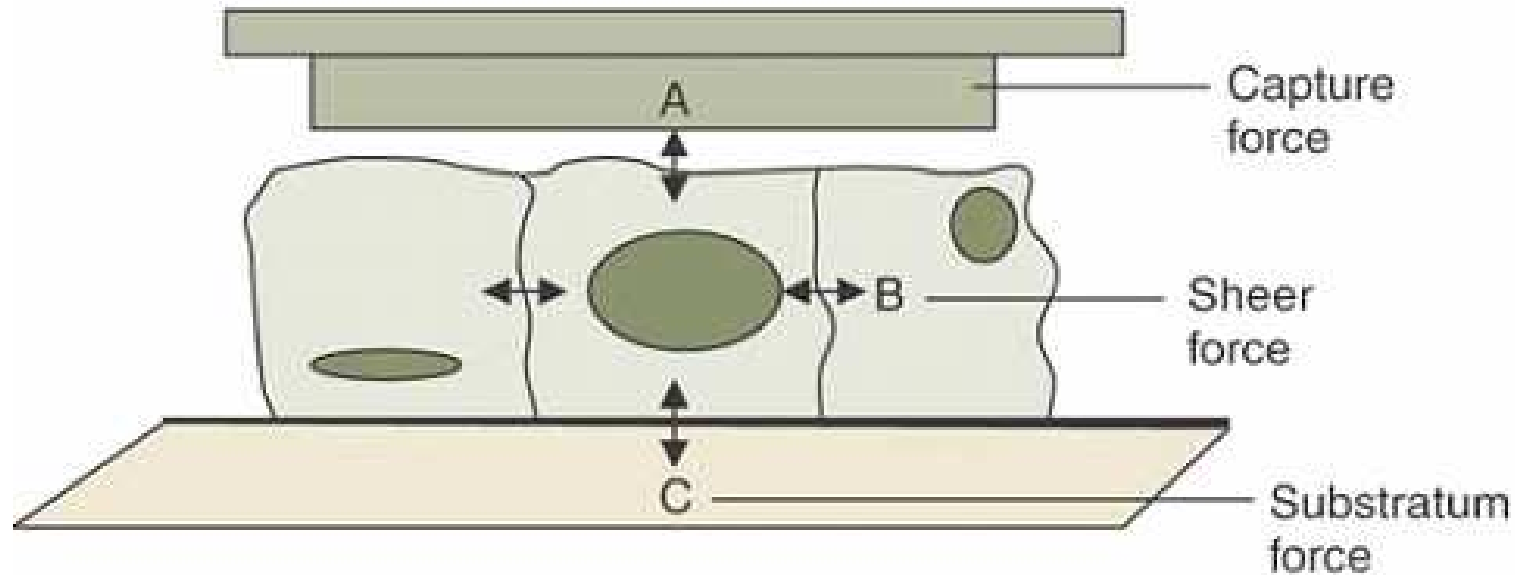
(a) Laser IV e Microscópio de Luz Invertida (b) Torre de Controlo do Laser (c) Monitor do PC e vídeo (d) Monitor do vídeo (e) Câmara de vídeo (f) Computador

Princípios e Base Técnica da LCM



Os polímeros derretidos propriamente possuem um anel externo de cor escura e um centro claro indicativo que o polímero derreteu e está em contacto directo com a preparação histológica

Princípios e Base Técnica da LCM



As forças físicas envolvidas na LCM incluem:

- Forças superiores de adesão entre o substrato e o tecido
- Forças laterais entre o polímero e as células

Princípios e Base Técnica da LCM



Photo courtesy of
Arcturus Biosciences

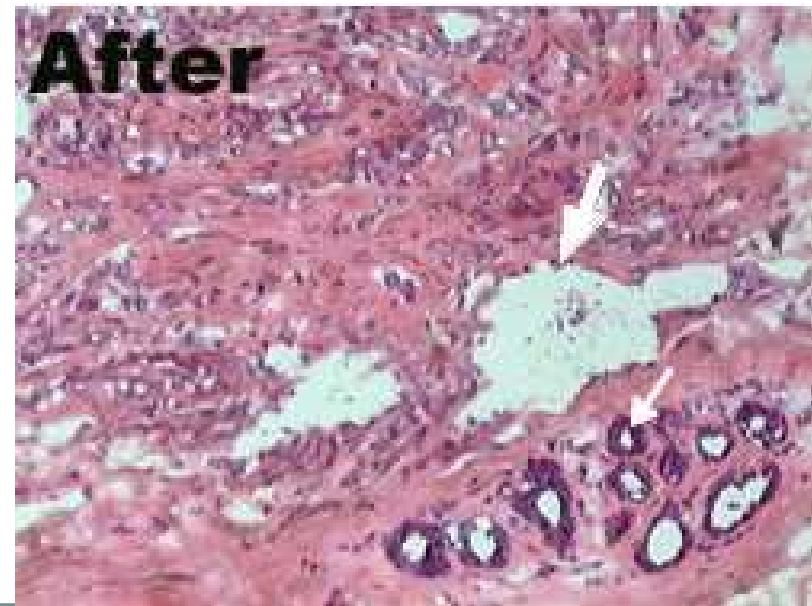
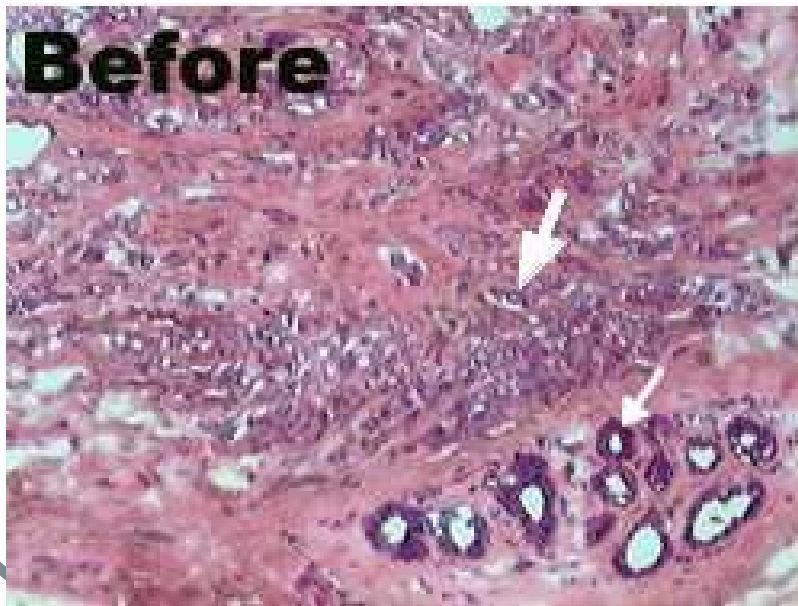
Uma única células está ligada ao polímero termolábil na técnica de LCM por IV

Princípios e Base Técnica da LCM

- Pode ser incorporada uma substância corante no polímero, de forma que:
- Absorva a energia laser, prevenindo danos nos constituintes celulares
- Auxilie a visualização das áreas derretidas do polímero
- O tampão de extracção é aplicado no composto polímero-células de interesse e permite a solubilização e libertação das células

LCM - Resultados

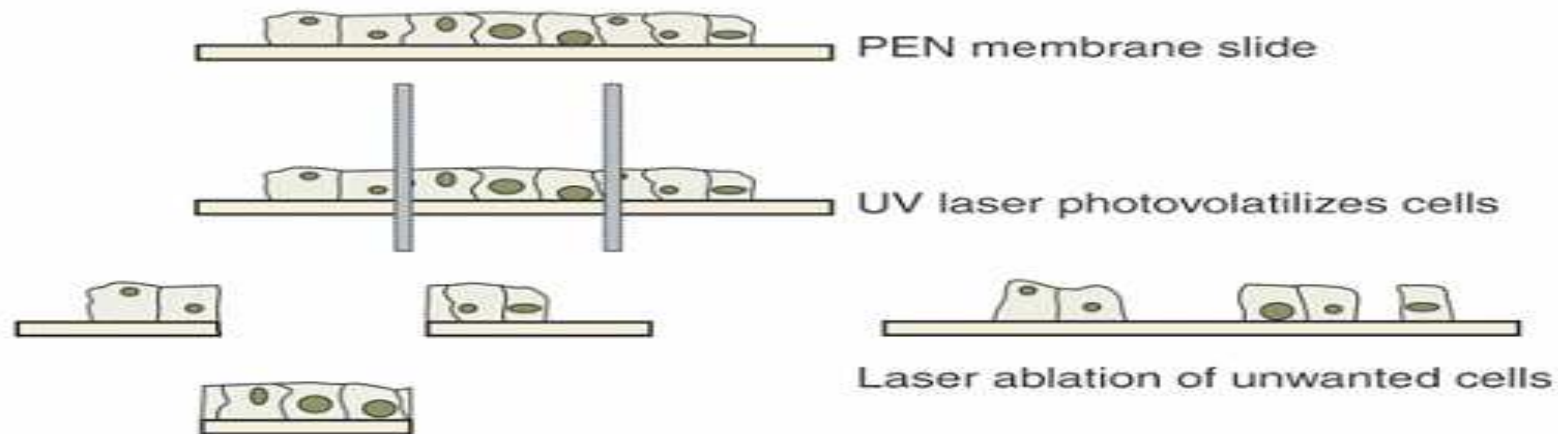
- LCM permite que células epiteliais de carcinoma da mama (seta maior) sejam isoladas e removidas do estroma adjacente e do epitélio mamário normal (seta menor). Esta é uma secção histológica preparada a partir de tecido mamário congelado e corada com HE



Microdissecação Corte por Laser

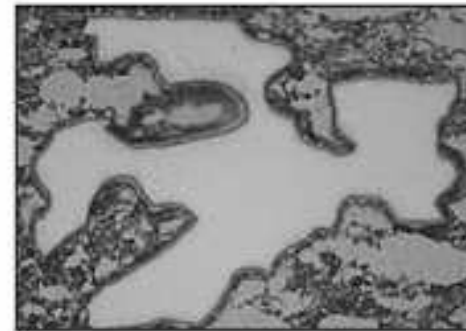
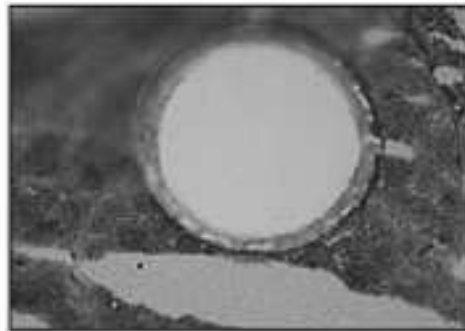
- Laser UV
- Seleciona e corta a área adjacente às células de interesse
- Separa as células desejadas dos tecidos adjacentes ou células
- Após cortar a zona pretendida, a pressão do laser faz com que a zona removida seja catapultada para um tubo
- A combinação providenciada pelo laser UV em cortar e catapultar para o tubo faz com que seja um método muito rápido e preciso
- Método ideal para a captura de um grande n.º de células, requerido para Proteómica e DNA Microarrays

Esquema da Microdissecação a Laser UV



O tecido é montado numa membrana de polietileno naftalato (PEN) ou polietileno tetranaftalato (PET)

O laser UV pode ser utilizado para cortar as células de interesse ou remover o tecido não pretendido, deixando as células de interesse intactas



Exemplos de definição de formas para corte e remoção do tecido:

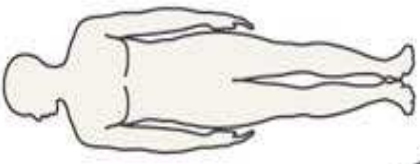
Formas circulares

Formas poligonais

Factores influentes

- Existem vários factores que afectam a recuperação de DNA, RNA e proteínas de células microdissecadas, tais como:
- Qualidade da amostra
- Tempo de preservação antes da microdissecação
- Tipo de preservação
- Método de fixação
- Eficácia da microdissecação

Specimen collection

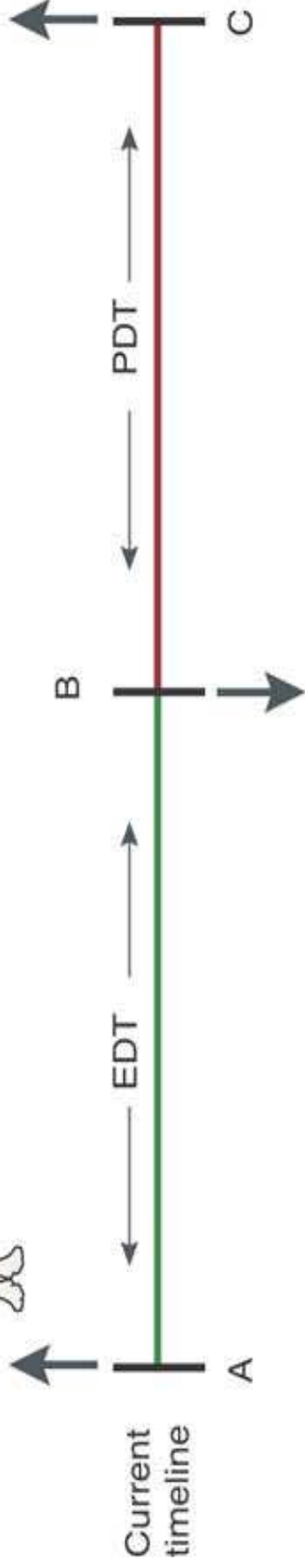
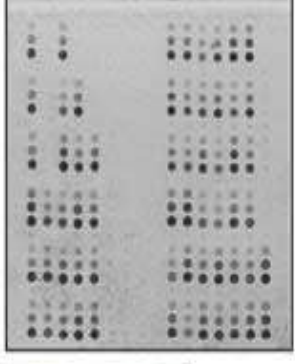


Biopsy

Microdissection



Molecular assays



Processing variables

EDT: Post excision delay time

PDT: Processing delay time

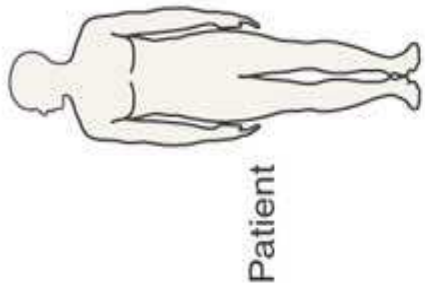
1. Tissue evaluation time
2. Time to placement of tissue in preservative
3. Storage of tissue in varying freezers
4. Variable tissue thickness
5. Temperature fluctuation
6. Phosphatase and proteinase activities
7. Tissue staining procedures
8. Preparation time variability for molecular tests

Diversidade de Aplicação

- Perfil molecular do tecido
- Avaliação das interações entre tumor e microambiente
- RT-PCR
- Perfil molecular proteômico
- Perfil molecular genómico
- Análises forenses de mistura de amostras e folículos capilares
- Estudos de desenvolvimento da biologia e embriologia
- Modelos animais
- Biologia de doenças infecciosas

Diversidade de Aplicação

- Biologia celular de plantas
- Estudos de metilação de DNA na espermatogénese
- Análises de proteínas, DNA e RNA
- LOH
- Produção de bibliotecas de cDNA
- Expressão génica
- Entre outros...



Patient

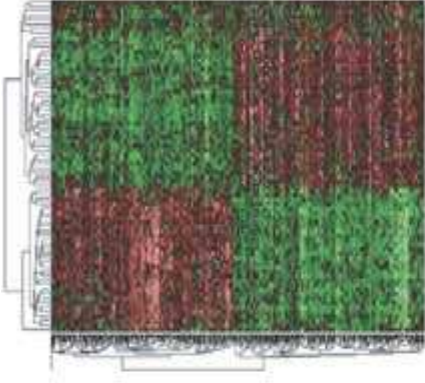


Biopsy



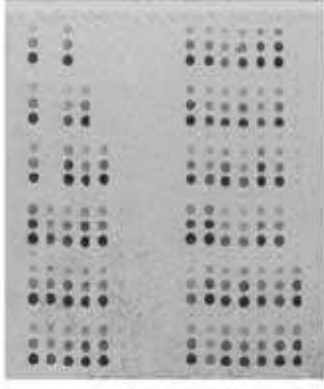
Microdissection

Transcript
profiling



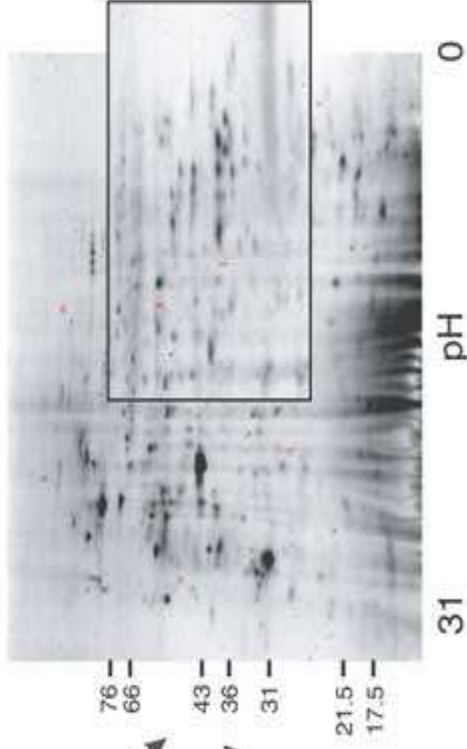
RNA microarray
1,000 cells/array

Protein
profiling



Protein microarray
1,000 cells/array

Protein
discovery



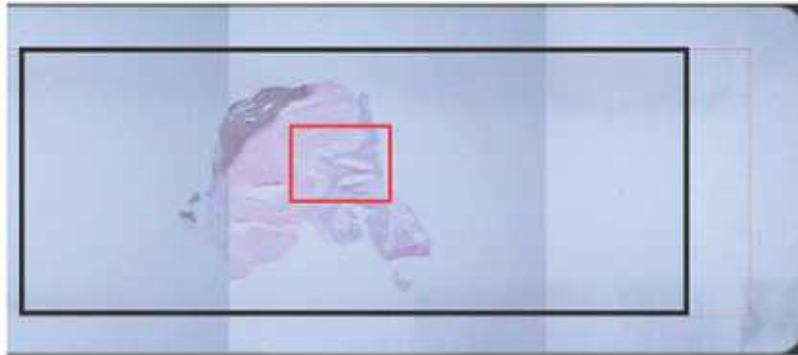
2D gel microdissected
~55,000 cells
Human DCIS

pH 31 0

Limitações

- Necessidade de identificação das células de interesse baseada nas suas características morfológicas
- A identificação das células é usualmente efectuada em parceria com o patologista ou técnico treinado em identificação de células
- Alterações de estabilidade celular promovidas pela intervenção cirúrgica
- A extensiva reacção de adição provocada pelo formaldeído pode limitar a análise de RNA e proteínas
- Fragmento deve estar centrado no terço central da lâmina

Limitações



Correcta localização do tecido,
no terço central da lâmina



Incorrecta localização do tecido,
perto de um dos extremos da
lâmina

Futuros Avanços

- Tecnologia *Touch-screen*
- Microdissecação automática
- Programas de Inteligência Artificial com *Software* de reconhecimento de células
- Telemedicina, em que o patologista indica as células de interesse para a microdissecação

Resumo

- Microdissecação a Laser
- Factores de influência
- Diversidade de aplicação
- Limitações
- Futuros avanços

HISTOTECNOLOGIA APLICADA

**EXTRACÇÃO DE DNA DE
BLOCOS DE PARAFINA**

Introdução

- Técnicas baseadas na Biologia Molecular, que envolvem a amplificação de ácidos nucleicos tem sido utilizadas intensamente na detecção de cancro e doenças infecciosas
- Nas técnicas de amplificação com tecidos ou outras amostras clínicas importantes, impurezas nos ácidos nucleicos podem inibir ou reduzir a sensibilidade e eficiência da amplificação

Extracção de DNA de tecidos em parafina

- A extracção de DNA a partir de tecidos incluídos em parafina é uma técnica particularmente útil em estudos retrospectivos em que a determinação de um diagnóstico molecular pode ser correlacionado com a ficha clínica do paciente
- As vantagens de um estudo deste tipo, isto é, um estudo retrospectivo de análise de DNA são múltiplas e podem ter inúmeras aplicações

Aplicações

- O estudo de numerosos processos de doença, em que vírus, bactérias ou parasitas são suspeitos de serem agentes etiológicos e eventual existência de correlação de prognóstico pode estar relacionada
- O estudo do DNA em doenças genéticas
- Estudos retrospectivos acerca de doenças raras, podendo através deste tipo de arquivos obter-se uma boa amostra comparativamente com os estudos prospectivos com tecidos a fresco
- A possibilidade de correlação de presença ou ausência de uma doença em particular, diagnóstico morfológico, estadio da doença, prognóstico e resposta a uma terapêutica, quando o diagnóstico clínico é conhecido

Procedimento

1. Cortes de 50 μm de blocos de parafina
2. Incubar em xilol durante 15' a 45°C
3. Centrifugar 10' a 14.000 rpm
4. Pipetar e descartar o sobrenadante
5. Repetir 2 – 4
6. Adicionar 1 ml de etanol 100% ao *pellet*, vortex, centrifugar durante 10' a 14.000 rpm e pipetar e descartar o sobrenadante
7. Adicionar 1 ml de etanol 70% ao *pellet*, vortex, centrifugar durante 10' a 14.000 rpm e pipetar e descartar o sobrenadante e secar o *pellet*

Procedimento

8. Ressuspender o pellet em 1 ml de NaSCN (1M) e incubar a 37°C *overnight*
9. Centrifugar durante 10' a 14.00 rpm, pipetar e descartar o sobrenadante
10. Ressuspender o *pellet* em 400 µl de tampão de extracção de DNA
11. Adicionar 5 µl de RNase (20 mg/ml) e incubar durante 1H a 37°C (o tratamento com RNase é opcional, o material em parafina não possui grandes quantidades de RNA)
12. Adicionar 40 µl de Proteinase K (10 mg/ml), vortex, incubar a 55°C *overnight*

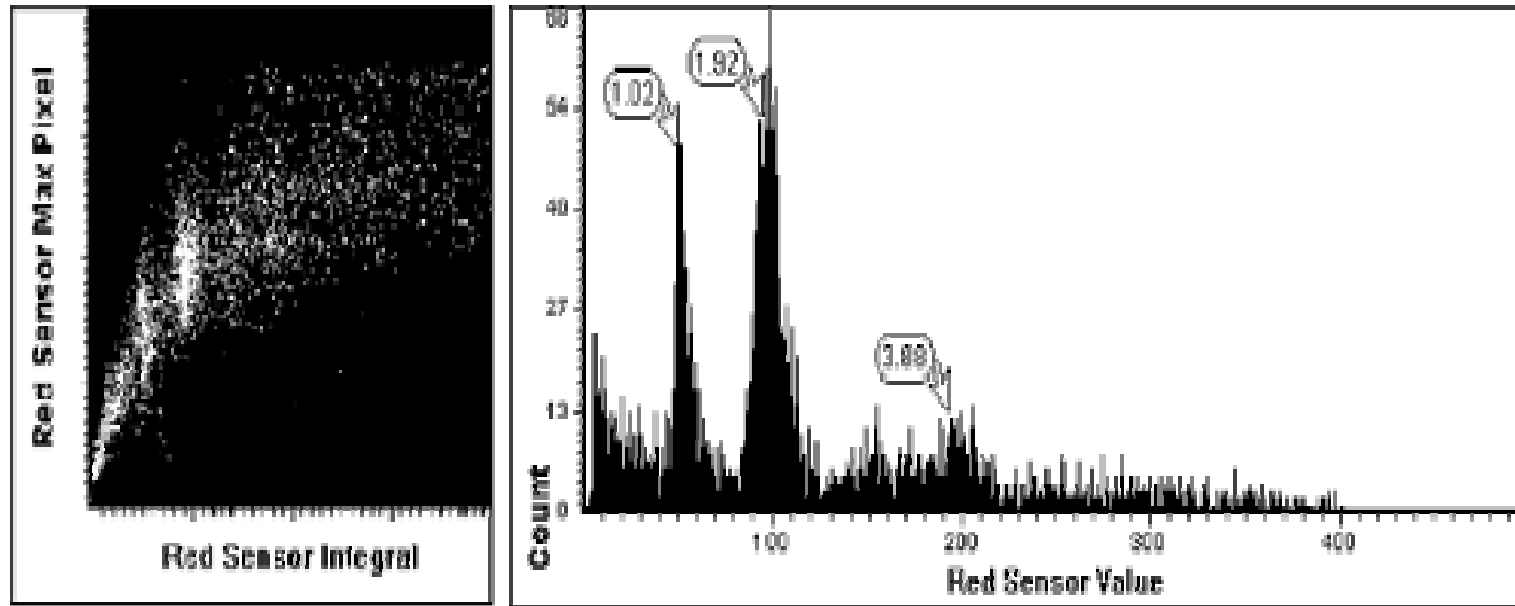
Procedimento

14. Adicionar 440 μ l de fenol, agitar vigorosamente durante 5' e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
15. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo e adicionar a solução de 220 μ l mais 220 μ l clorofórmio/álcool isoamil (24:1), agitar vigorosamente e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
16. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo, adicionar 440 μ l clorofórmio/álcool isoamil (24:1), agitar vigorosamente durante 5' e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
17. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo (2 ml num *eppendorf*), adicionar 1/10 de acetato de sódio (pH 5.2), adicionar 3 volumes de etanol a 100% e manter o tubo durante 1H a -80°C ou *overnight* a -20°C

Procedimento

- Centrifugar durante 30' a 4°C
- Remover o sobrenadante
- Secar o *pellet*
- Adicionar 20-50 µl em água estéril
- Agitar gentilmente no *termomixer* a 37°C durante 2H
- Medir a concentração de DNA com um espectrofotómetro e correr em gel de agarose a 1%

Resultados



Análise de DNA dos núcleos de adenocarcinoma da mama

Existência de população aneuplóide que é representativa de tumor

RESUMO

- Introdução
- Extracção de DNA de tecidos em parafina
- Aplicações
- Procedimento
- Resultados