

# MICRODISSECAÇÃO A LASER

**Prof. Carina Ladeira**

**Abril 2009**

# Microdissecação a Laser

- Microdissecação Captura Laser (LCM) é uma técnica desenvolvida pelo 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

- 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

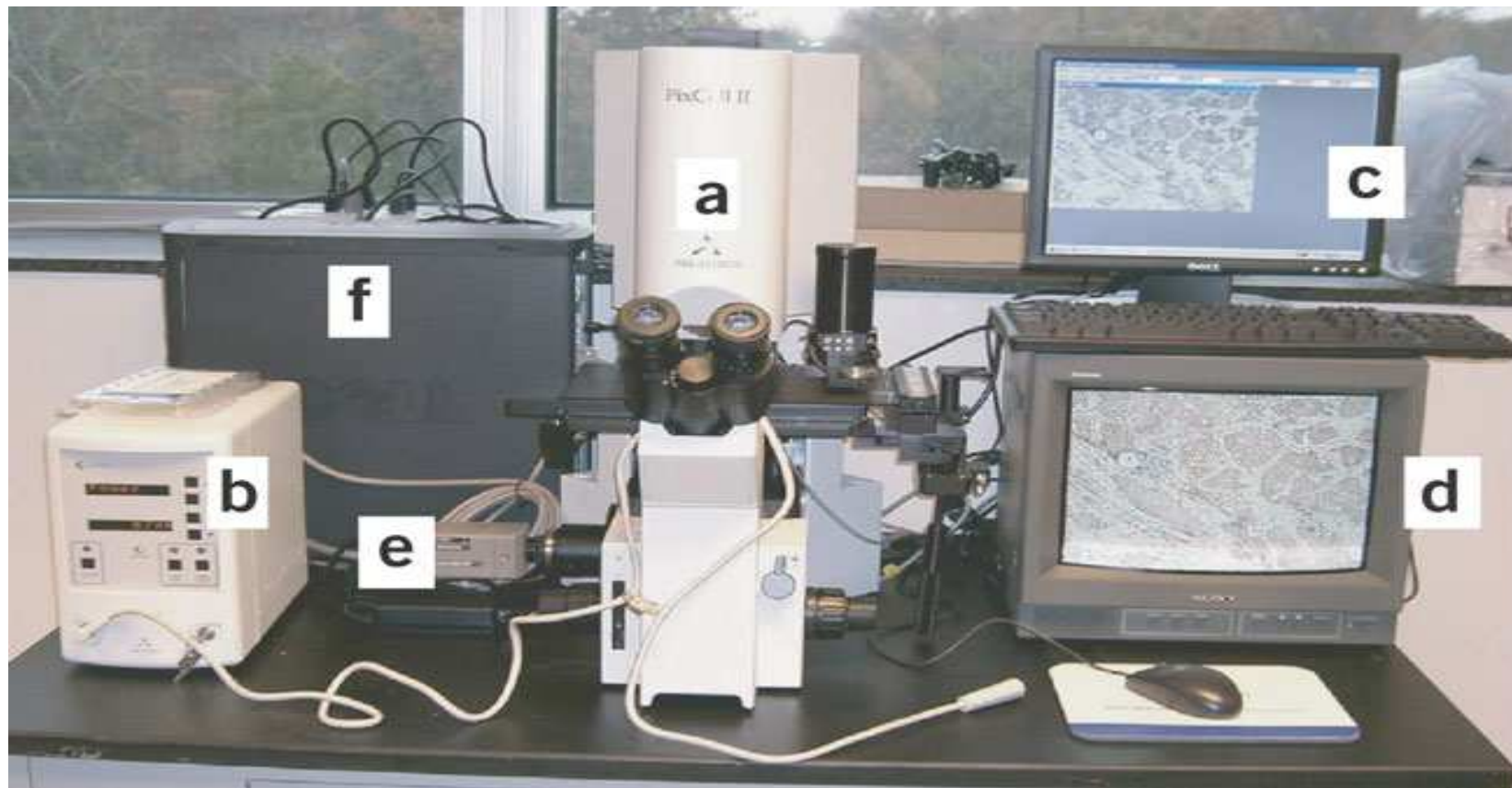
# Microdissecação Captura Laser (LCM)

- 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 às 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)

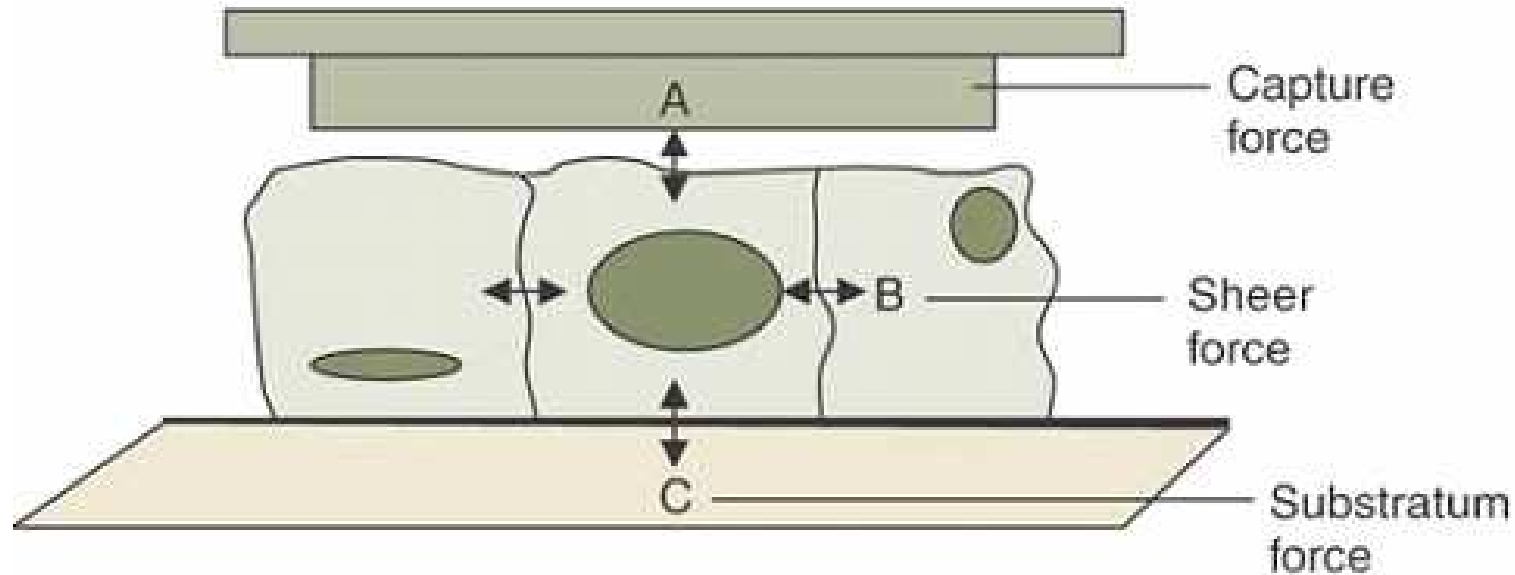
- Lesões específicas ou tipos celulares de tecidos complexos podem ser facilmente removidos sem dano morfológico da zona seleccionada e do tecido adjacente
- Esta estratégia permite que uma única célula inserida no meio de centenas de células seja procurada e removida com segurança
- Este método é especialmente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

# 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

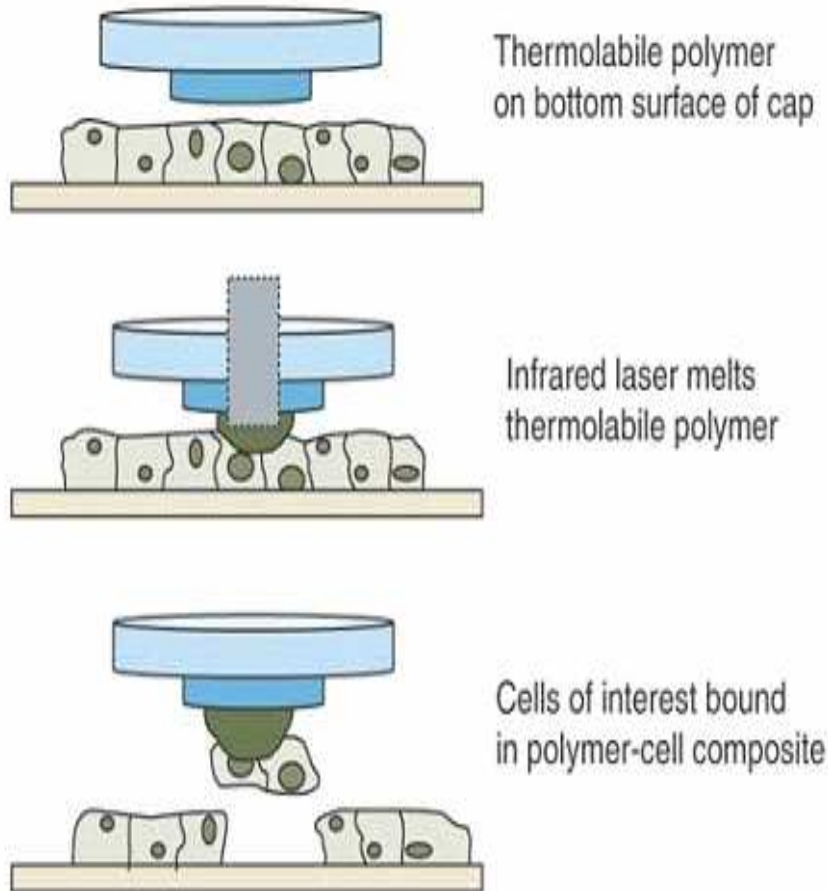
# Princípios e Base Técnica da LCM



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

# Princípio e Base Técnica da LCM

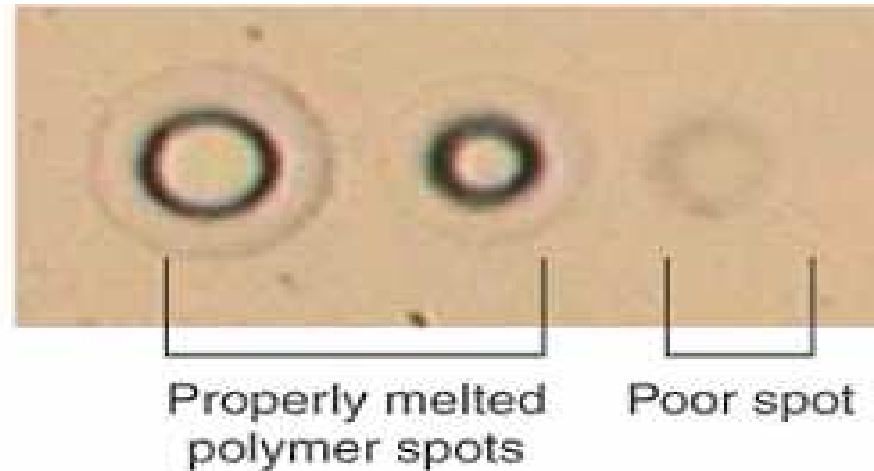


Um polímero termolábil é colocado na lâmina histológica

Laser IV “derrete” o polímero

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

# 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



Photo courtesy of  
Arcturus Biosciences

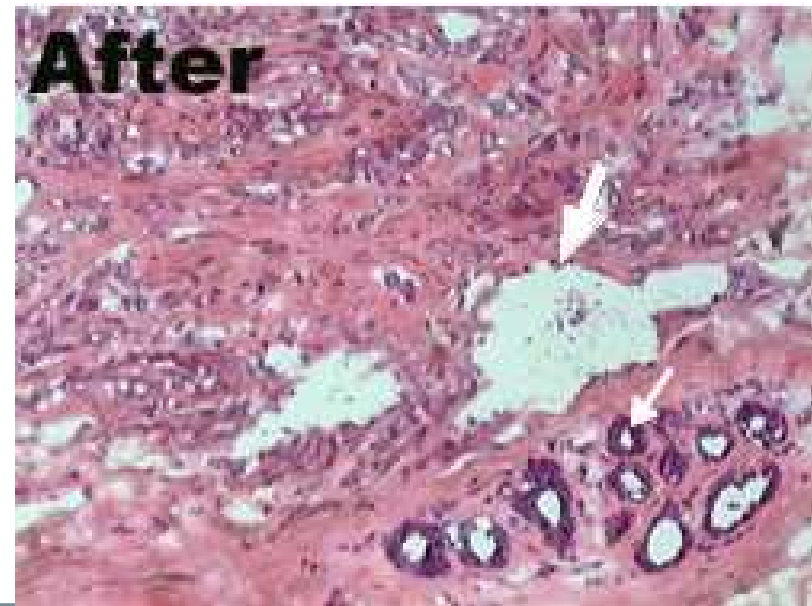
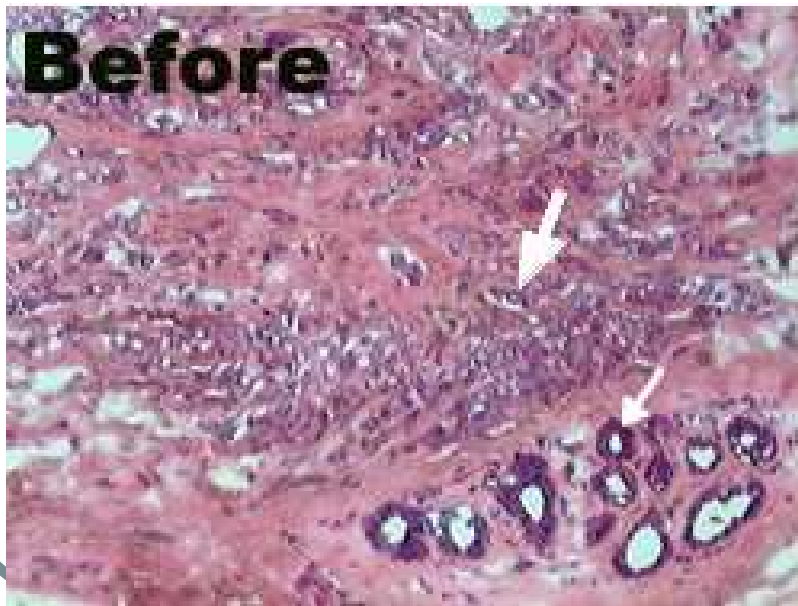
Uma única célula está ligada ao polímero termolábil na técnica de LCM por IV

# 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

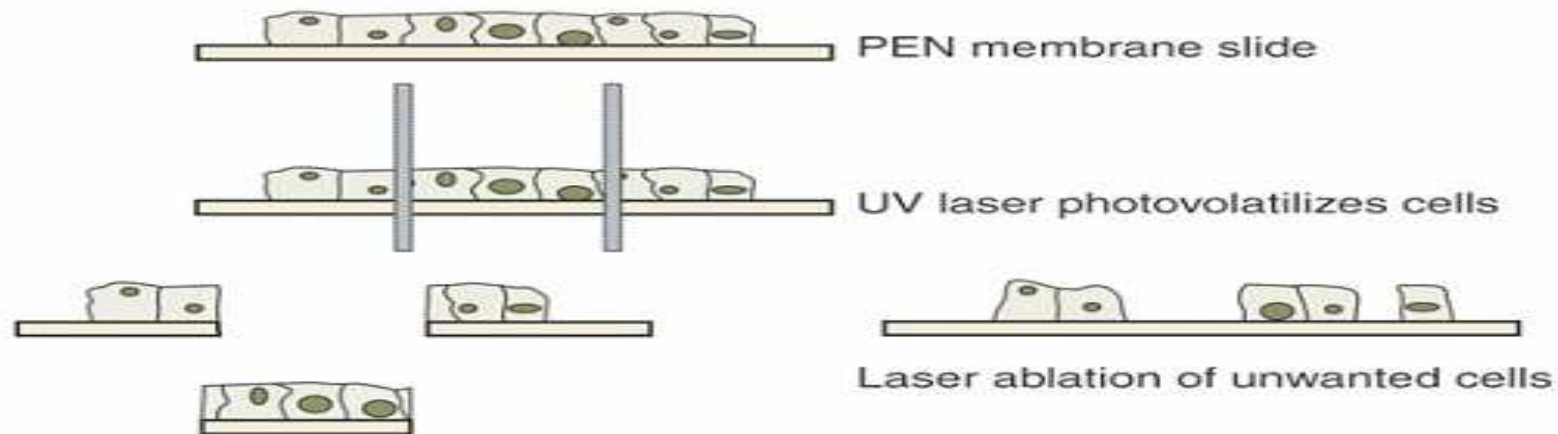
- LCM permite que células epiteliais de carcinoma da mama (seta maior) sejam isoladas e removidas do estroma adjacente e do epitélio mamário normal (seta menor). Esta é uma secção histológica preparada a partir de tecido mamário congelado e corada com HE



# 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

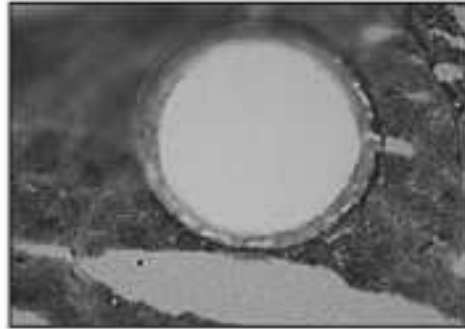
# Esquema da Microdissecação a Laser UV



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

# Formas de corte



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

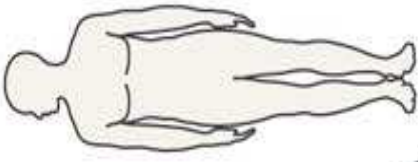
Formas circulares

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

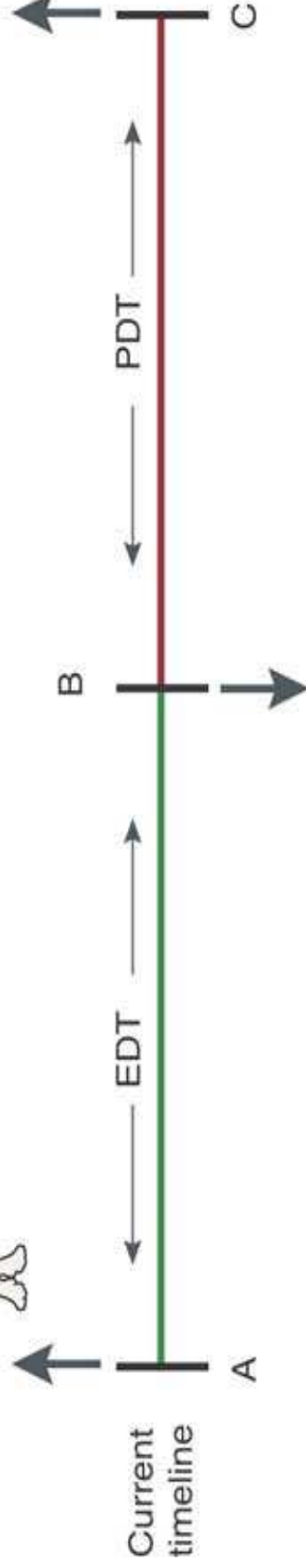
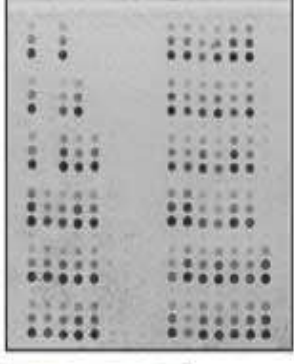


Biopsy

Microdissection



Molecular assays



Processing variables

EDT: Post excision delay time

PDT: Processing delay time

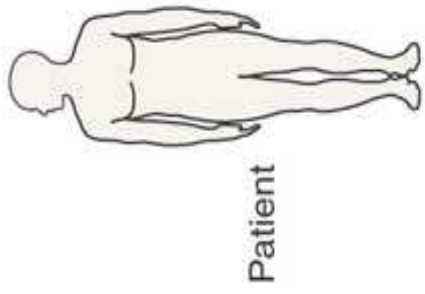
1. Tissue evaluation time
2. Time to placement of tissue in preservative
3. Storage of tissue in varying freezers
4. Variable tissue thickness
5. Temperature fluctuation
6. Phosphatase and proteinase activities
7. Tissue staining procedures
8. Preparation time variability for molecular tests

# Diversidade de Aplicação

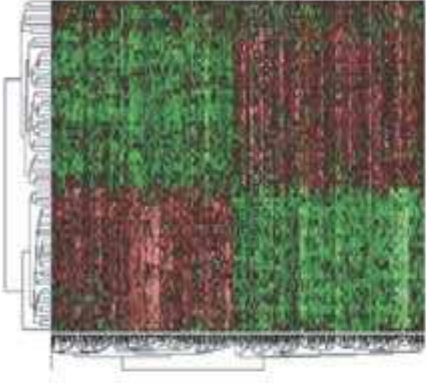
- Perfil molecular do tecido
- Avaliação das interações entre tumor e microambiente
- RT-PCR
- Perfil molecular proteómico
- Perfil molecular genómico
- Análises forenses de mistura de amostras e folículos capilares
- Estudos de desenvolvimento da biologia e embriologia
- Modelos animais
- Biologia de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

# Diversidade de Aplicação

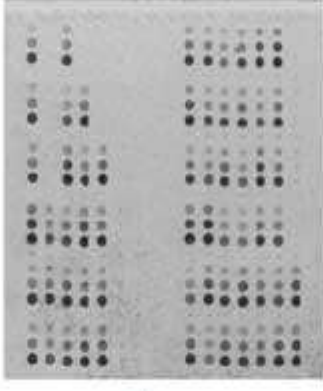
- Biologia celular de plantas
- Estudos de metilação de DNA na espermatogénese
- Análises de proteínas, DNA e RNA
- LOH
- Produção de bibliotecas de cDNA
- Expressão génica
- Entre outros...



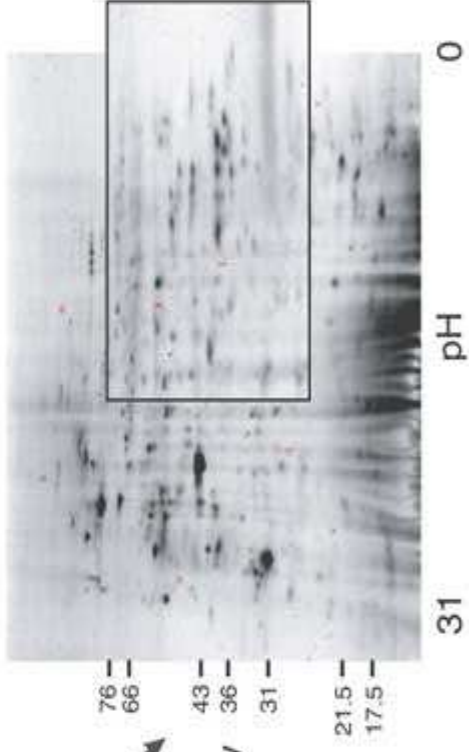
Transcript  
profiling



Protein  
profiling



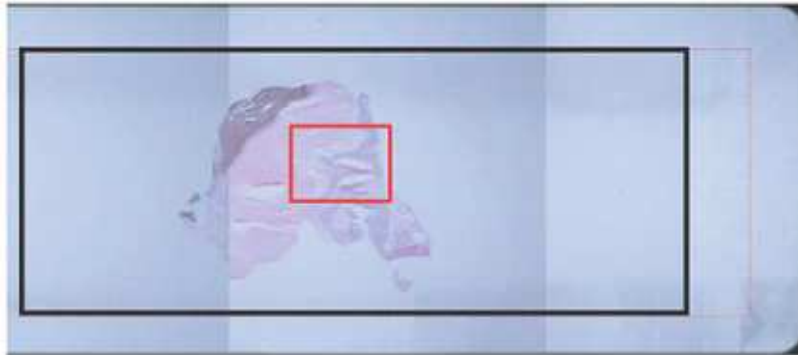
Protein  
discovery



# 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