

TÉCNICA DEL FISH



M^a Dolores Durán
HGU de Alicante

SEAP-IAP



SEPA



HIS : hibridación in situ

- Capacidad que poseen los **ácidos nucleicos** para hibridarse entre sí.
- Permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos en:
 - *cortes tisulares
 - *células y cromosomas
- Métodos de visualización
 - *Indirectos: biotina, digoxigenina
 - *Directos: el marcador está unido directamente a la **sonda**

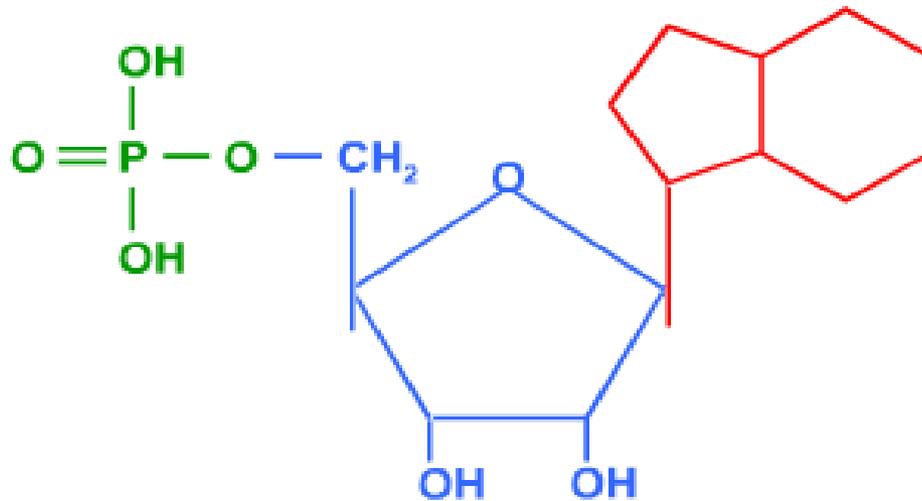
ESTRUCTURA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

- Constituidos por unidades elementales llamadas **NUCLEÓTIDOS**

ESTRUCTURA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

- Constituidos por unidades elementales llamadas **NUCLEÓTIDOS**

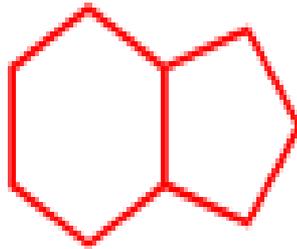
Nucleótidos



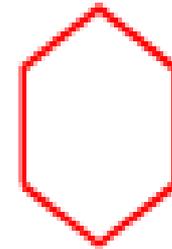
Ácido Fosfórico + Azúcar + Base Nitrogenada

Unión entre bases Nitrogenadas

Púricas



Pirimidínicas



Adenina..... A



{ T.....Timina (ADN)
U.....Uracilo (ARN)

Guanina..... G



C..... Citosina



Puentes de Hidrógeno

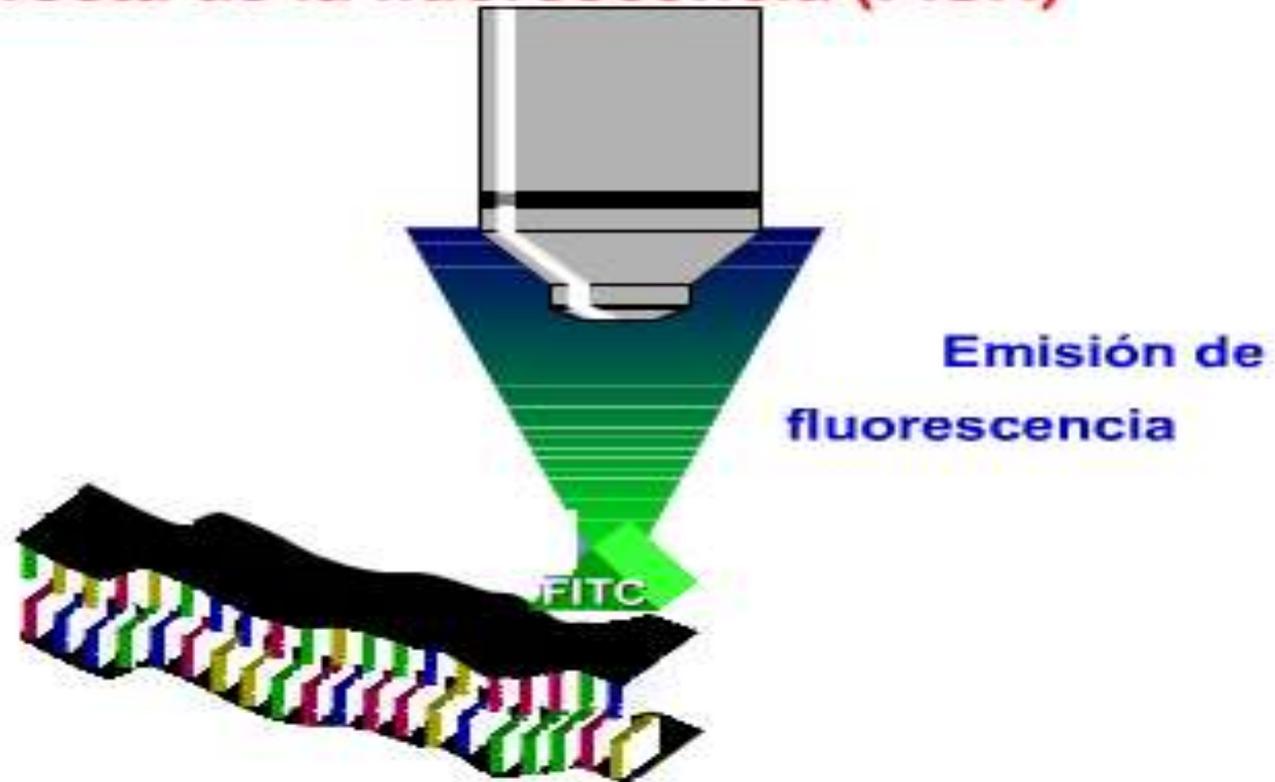
Cinética de la HIS

- Temperatura
- Longitud de sonda
- Porcentaje de Guanina - Citosina
- Homología sonda y secuencia diana
- Composición de la solución lavado de Astringencia (rigurosidad)

FISH

Utiliza **moléculas** fluorescentes para localizar in situ genes o fragmentos de ADN.

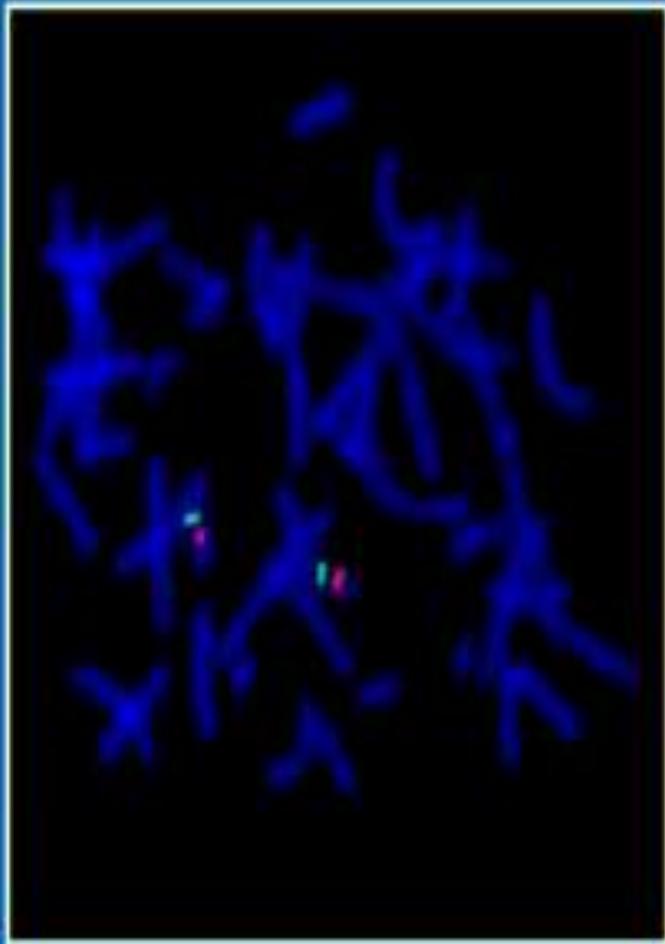
Visualización directa de la fluorescencia (FISH)



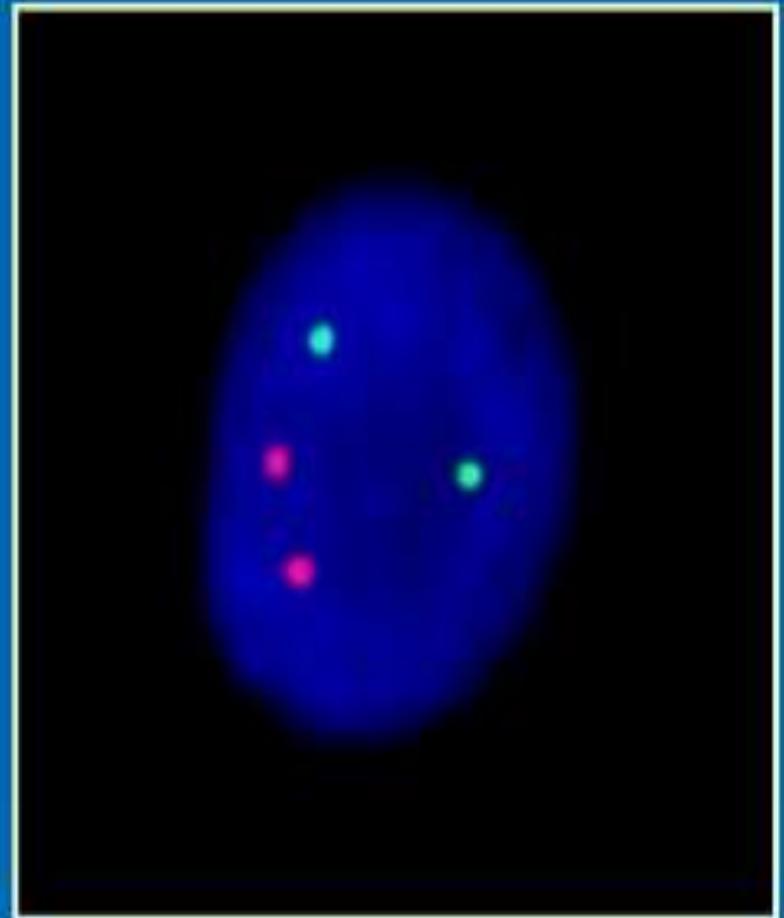
APLICACIÓN DEL FISH

- Células en metafase (células en división)
- Células en interfase:
 - Requiere núcleos completos

Metafase- FISH



Interfase-FISH



SONDAS

- Secuencias de nucleótidos complementaria de la secuencia diana

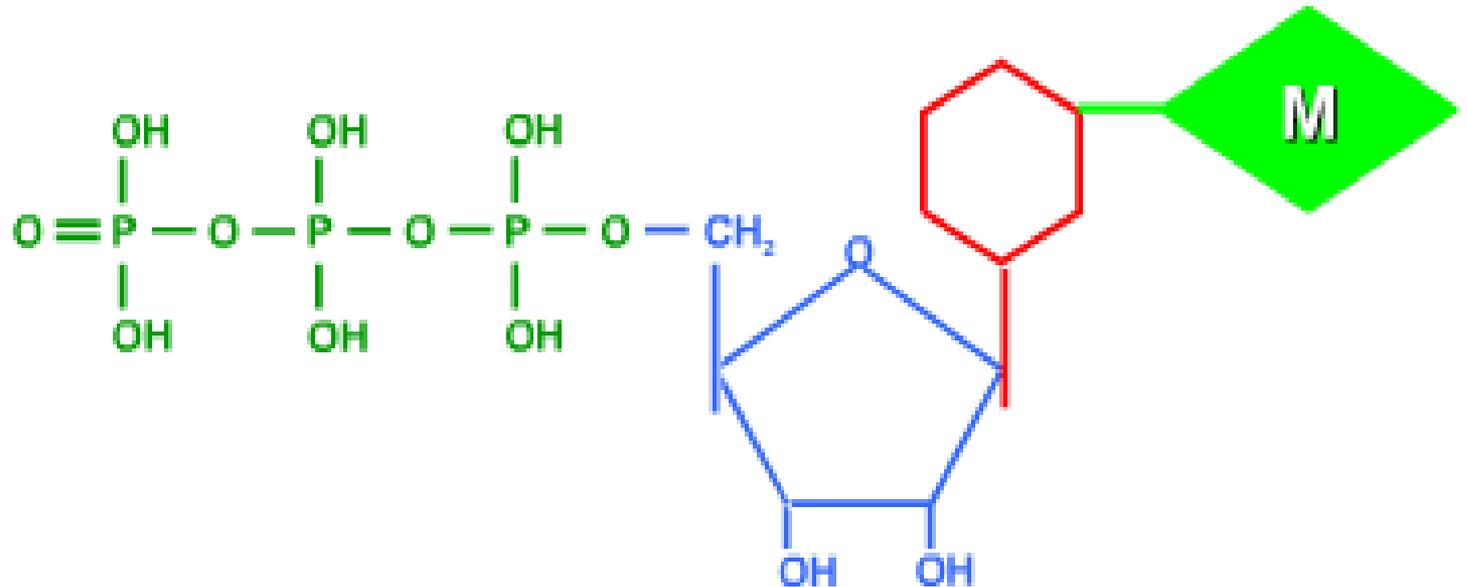
Requiere obligatoriamente su **marcaje** para la detección:

- isótopos radioactivos, enzimas y **fluorocromos**
 - estable bajo diversas condiciones de temperatura, detergentes, disolventes, etc., y no afectar la reacción de hibridación

Marcadores fluorescentes

Incorporan fluorocromos acoplados a la base nitrogenada

Los más usadas son: Fluoresceína, Rodamina, Texas red



TIPOS DE SONDAS

➤ Centroméricas:

Detectan alteraciones en el número de cromosomas

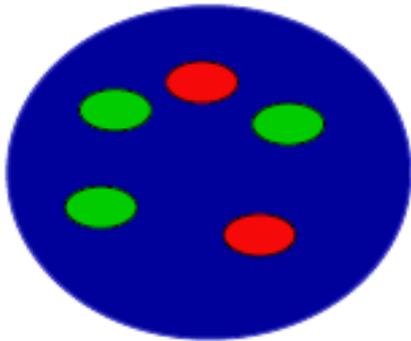
➤ Específicas de locus:

Detectan las translocaciones entre cromosomas

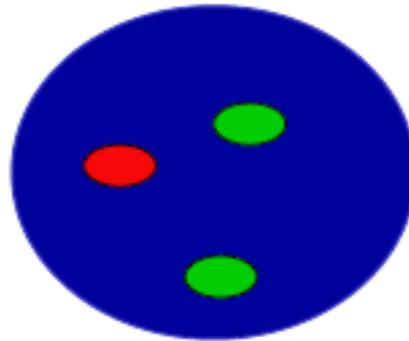
- Fusión

- Split o break-apart

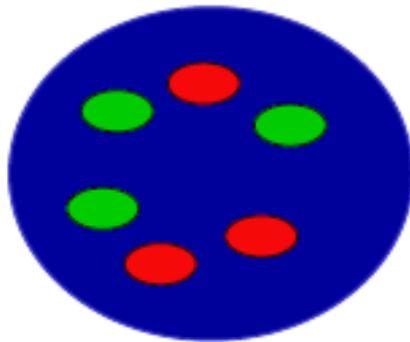
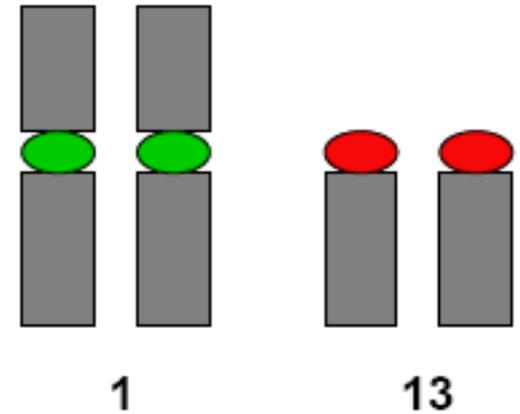
SONDAS CENTROMÉRICAS



TRISOMÍA 1



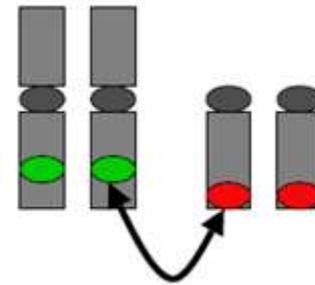
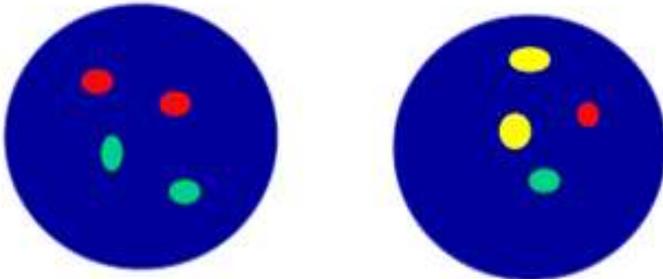
MONOSOMÍA 13



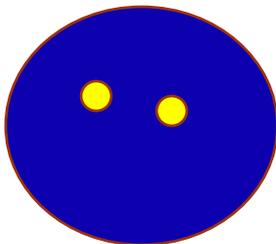
TRIPLOIDÍA O TRISOMÍA DE LOS 2 CROMOSOMAS

Sondas de locus específico

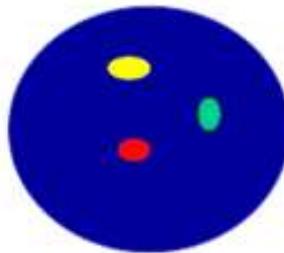
SONDAS DE FUSIÓN



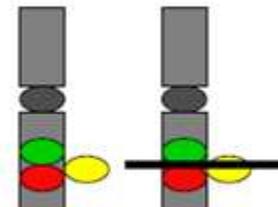
SONDAS SPLIT o BREAK APART



NORMAL



TRANSLOCADO



CONSENSO

VOLUME 25 · NUMBER 1 · JANUARY 1 2007

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ASCO SPECIAL ARTICLE

American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer

Antonio C. Wolff, M. Elizabeth H. Hammond, Jared N. Schwartz, Karen L. Hagerty, D. Craig Allred, Richard J. Cote, Mitchell Dowsett, Patrick L. Fitzgibbons, Wedad M. Hanna, Amy Langer, Lisa M. McShane, Soonmyung Paik, Mark D. Pogram, Edith A. Perez, Michael F. Press, Anthony Rhodes, Catharine Sturgeon, Sheila E. Taube, Raymond Tubbs, Gail H. Vance, Marc van de Vijver, Thomas M. Wheeler, and Daniel F. Hayes

VOLUME 27 · NUMBER 3 · MARCH 10 2009

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

SPECIAL ARTICLE

Guidelines for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing: Biologic and Methodologic Considerations

Guido Sauter, James Lee, John M.S. Barlett, Dennis J. Slamon, and Michael F. Press

Recomendación para la determinación de HER2 en cáncer de mama. Consenso nacional de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) y de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)

Guidelines for HER2 testing in breast cancer. A national consensus of the Spanish Society of Pathology and the Spanish Society of Medical Oncology

José Palacios^{1*}, Xavier Andreu², María José Calasanz³, Ángel Concha⁴, José María Corominas⁵, Tomás García-Caballero⁶, José Antonio López⁷, Fernando López-Ríos⁸, Santiago Ramón y Cajal⁹, Francisco J. Vera-Sempere¹⁰, Ramón Colomer¹¹, Miguel Martín¹², Emilio Alba¹³, Antonio González¹¹, Antonio Llombart¹⁴, Ana Lluch¹⁵, Joan Albanell^{16*}

FISH: TIPOS DE MUESTRA

- Biopsias o piezas quirúrgicas
- Muestras tomadas con aguja gruesa (BAG)
- Muestras citológicas sólo si no hay muestra de tejido

- Muestras subóptimas:
 - Defectos de fijación
 - Artefactos de retracción
 - Aplastamiento, etc...

FIJACIÓN

- Formol neutro tamponado 10%
 - No fijadores basados en alcohol o que contengan mercurio (Bouin, Zenker)
- Se desaconsejan los métodos de fijación rápida (microondas)
- Tiempo óptimo entre 24-48 h
 - Menos de 24 h pueden dar falsos negativos
- Las muestras pequeñas (BAG) mínimo 6 h
- Citología: Alcohol absoluto, metanol/acetona 50%

INCLUSIÓN Y MICROTOMÍA

- Bloques de 1 y 1,5 cm de lado y 0,2 cm de espesor
- Cortes recientes de 3-5 micras en portas tratados que impidan su despegamiento
- Si los cortes no se utilizan se guardan parafinados
No más de 6 meses
- Bloques almacenados mucho tiempo !!!

PROTOCOLO

Pretratamiento:

a) **Desenmascaramiento:**

Rompe los enlaces aldehído formados por el formol
95°-99° C

b) **Digestión enzimática:**

Digiere las proteínas a las que el ADN está
enrollado (histonas) para poder liberar la doble
hélice

Hibridación:

- a) **Desnaturalización:** Permite abrir la doble cadena para exponer la zona del gen homóloga a la sonda marcada $82^{\circ}\text{-}84^{\circ}\text{ C}$
- b) **Hibridación:** Incubación toda la noche 45° C
- c) **Astringencia:** Lavado que elimina las uniones inespecíficas de la sonda en otras regiones no homólogas 65° C

METODOLOGÍA DEL FISH (DÍA 1)

1. Desparafinado e hidratación:

Xilol → Etanol 100% → Etanol 96% → Etanol 75% → AD

2. Pretratamiento: Aplicar 95-99°C durante 10 min.

3. Atemperar en el mismo tampón 15 min.

4. Tampón de lavado: 3 min.

5. Pepsina: 5-8 gotas, 10 min.

6. Tampón de lavado: 2 x 3 min.

7. Deshidratación:

Etanol 70% → Etanol 85% → Etanol 96% → Secar al aire

7. Desnaturalizar:

- Aplicar 10 microlitros de sonda
- Poner un cubreobjeto de 22 x 22mm
- Sellar
- Desnaturalizar en la placa a 82°C durante 5 min.

8. Hibridación: Toda la noche a 45°C.

Hybridizer (Dako)



METODOLOGÍA DEL FISH (DÍA 2)

1. Lavado de astringencia:

- Precalentar la solución a 65°C
- Quitar el sellador y el cubreobjetos
- Pasar los portas a la solución de astringencia durante 10 min.

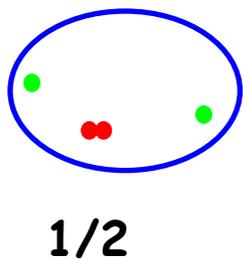
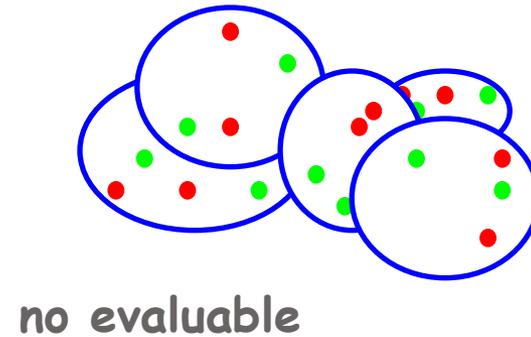
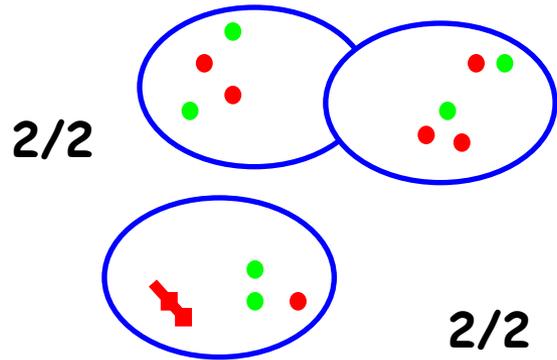
2. Tampón de lavado: 3 min.

3. Deshidratación: A oscuras

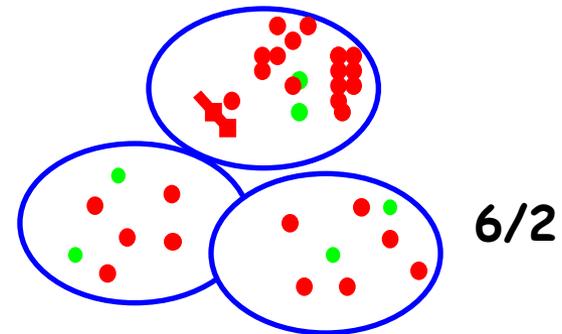
Etanol 70% → Etanol 85% → Etanol 96% → Secar al aire

4. Aplicar 15 microlitros de medio de montaje fluorescente y cubrir con cubreobjetos.

FISH: N° de copias

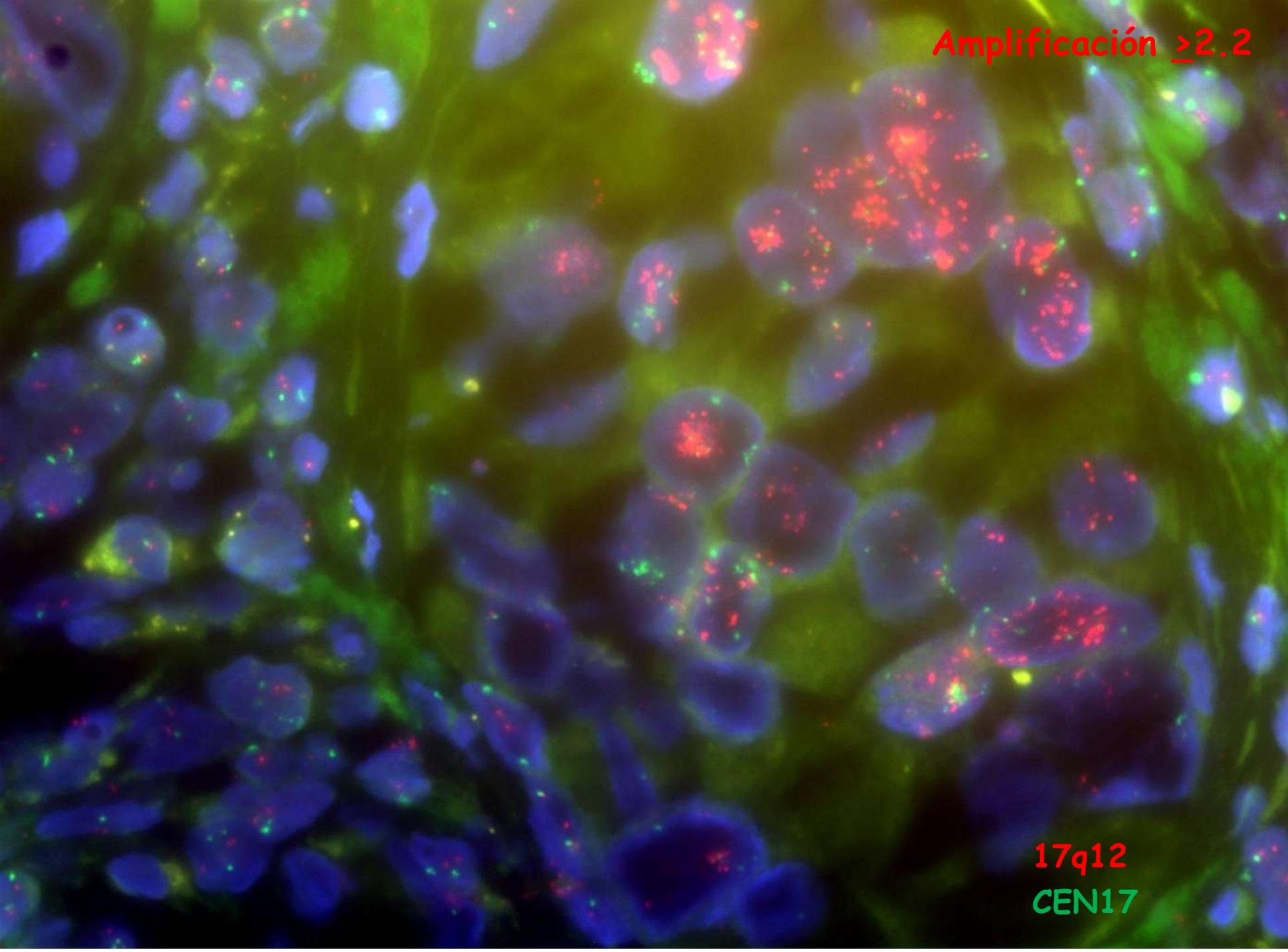


Delección:
Ratio ≤ 0.7



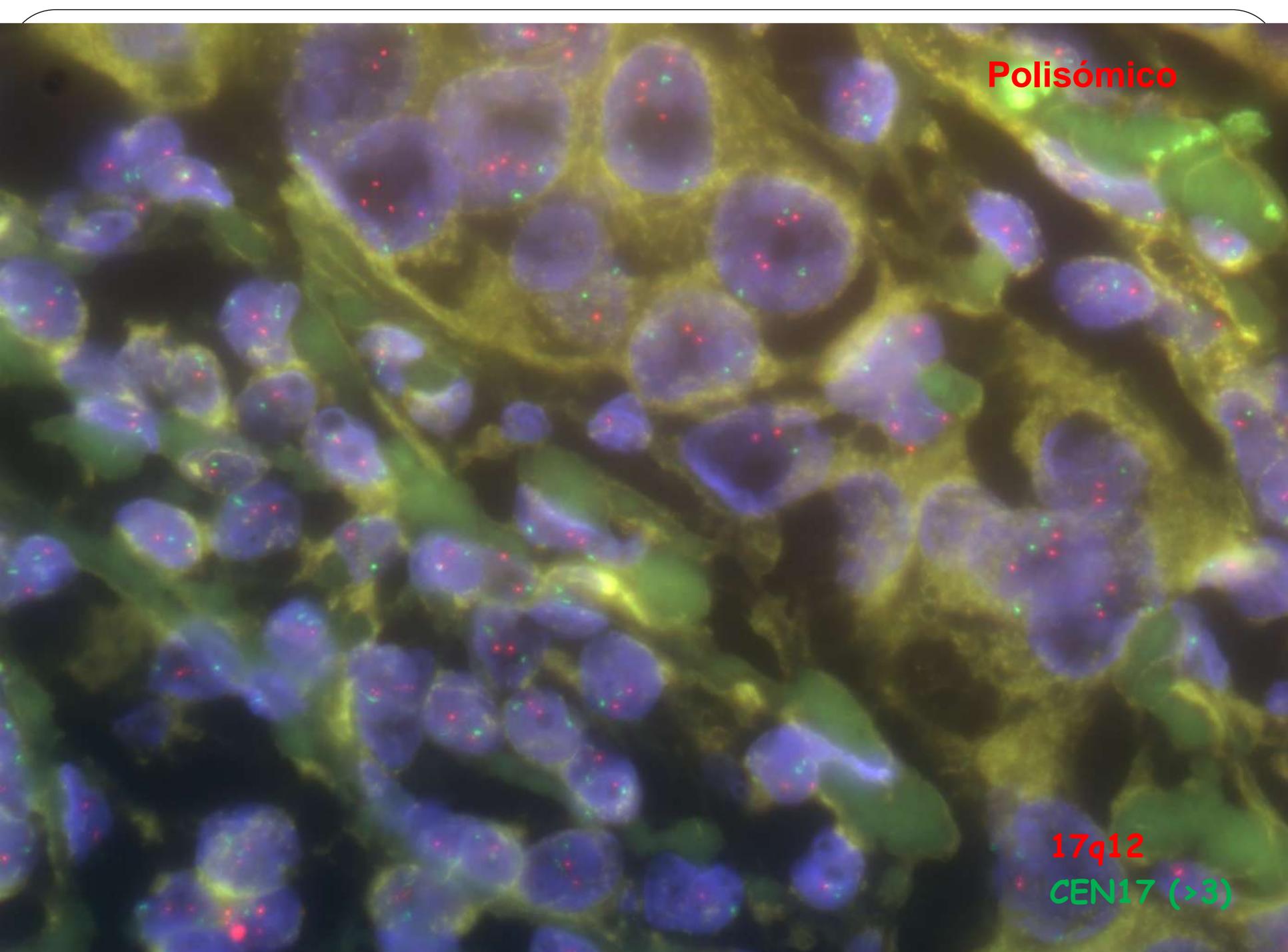
Amplificación ≥ 2.2
(≥ 60 céls tumorales)

Amplificación ≥ 2.2

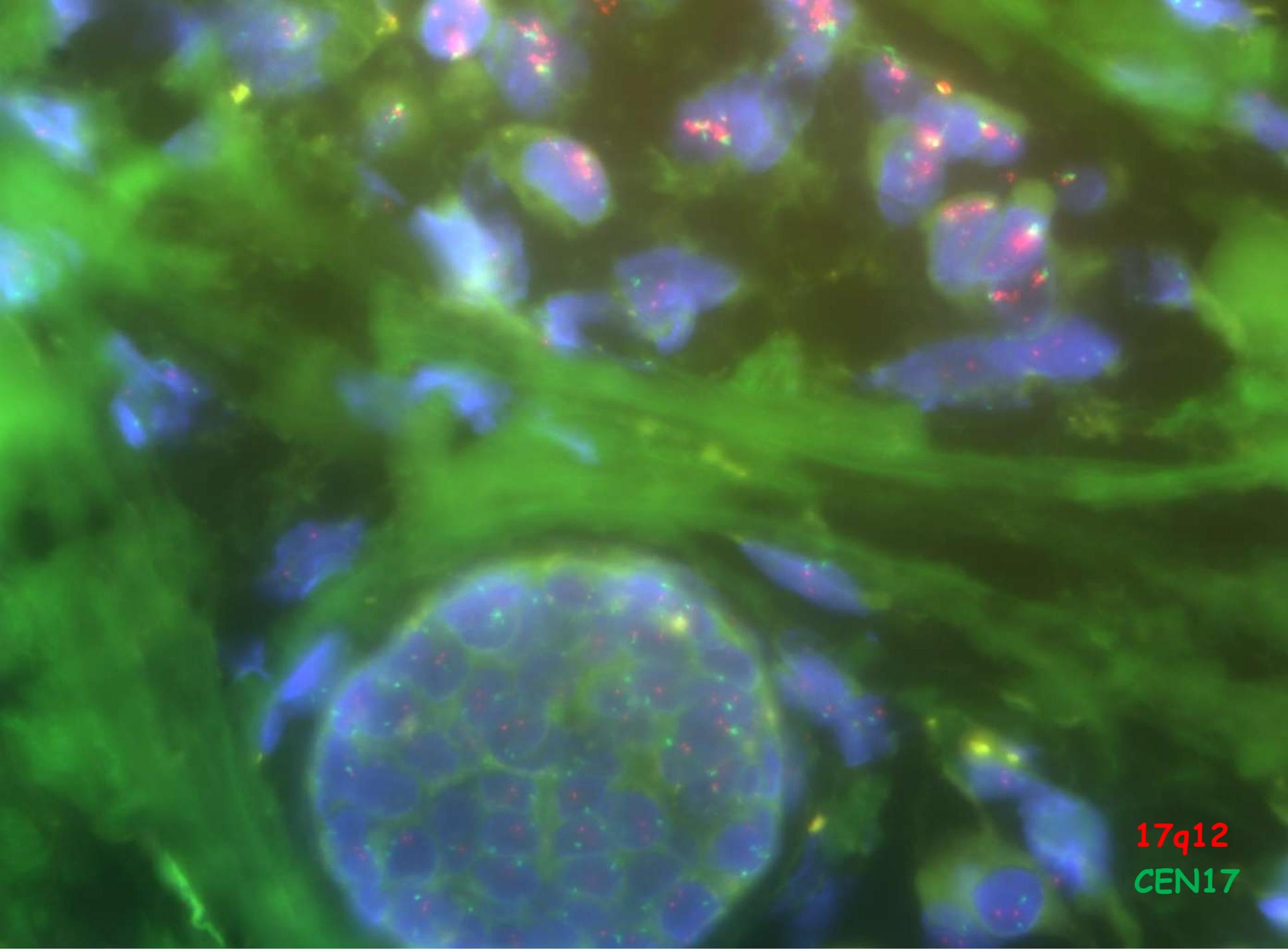


17q12
CEN17

Polisómico

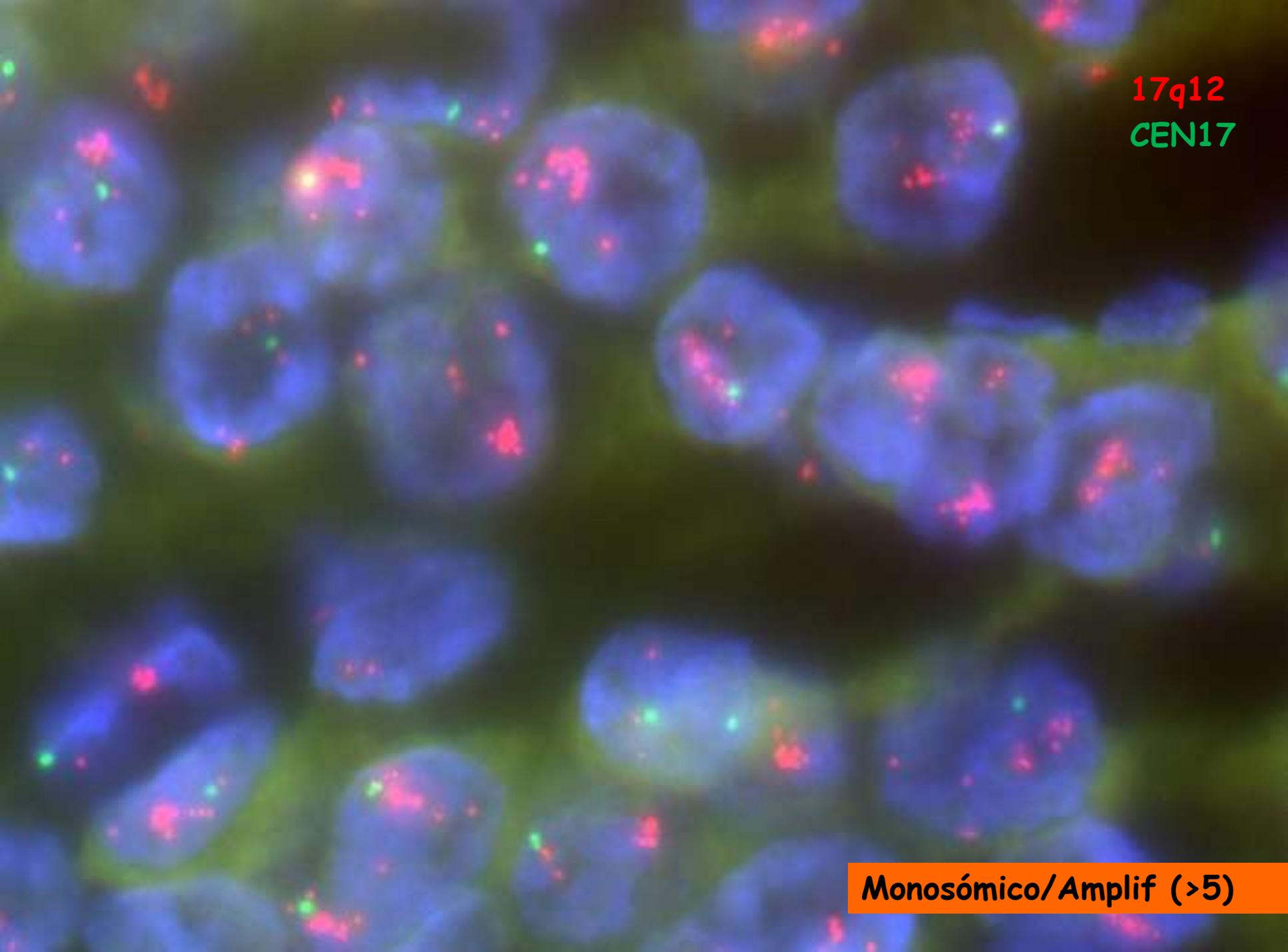


17q12
CEN17 (>3)

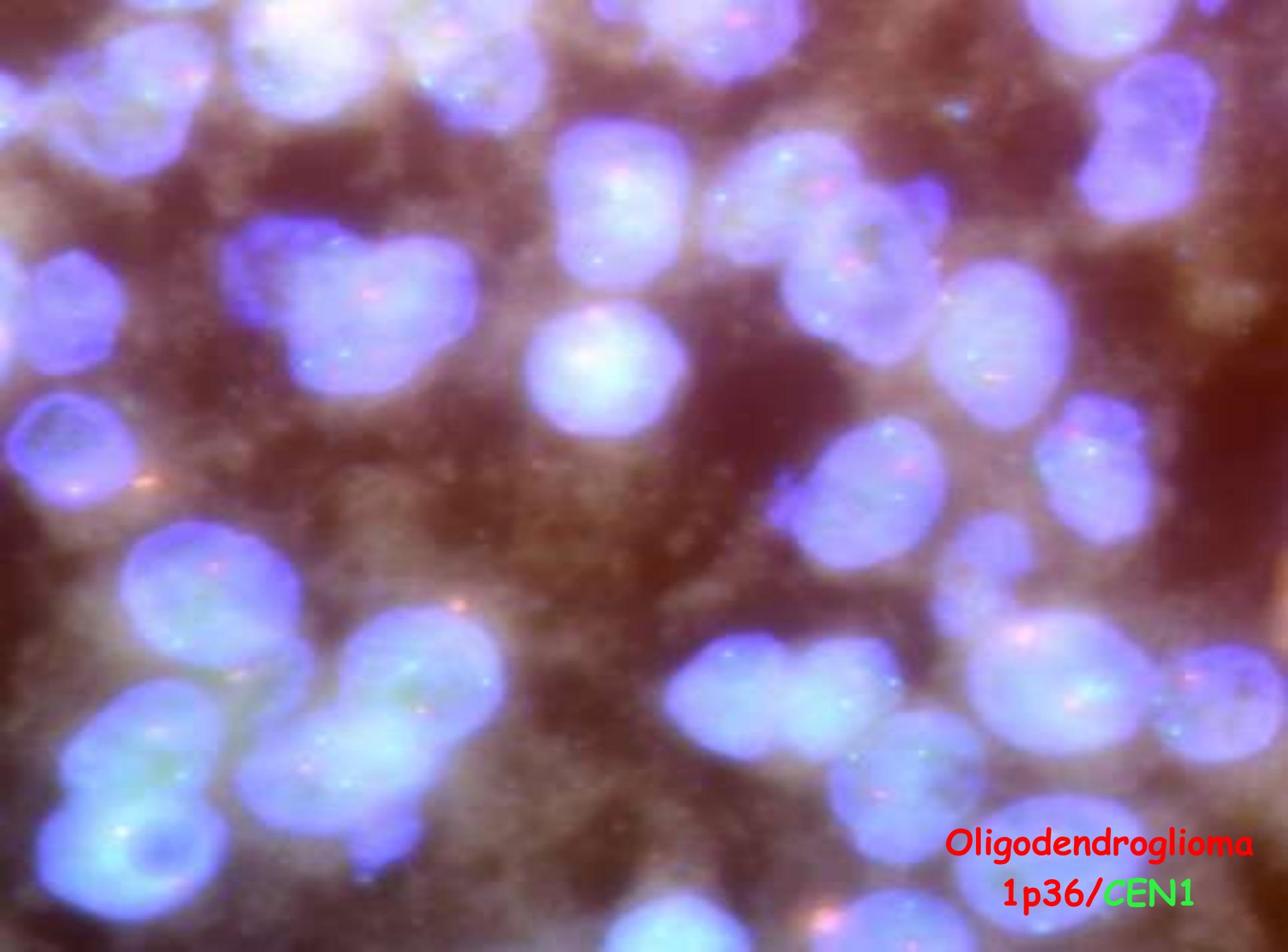


17q12
CEN17

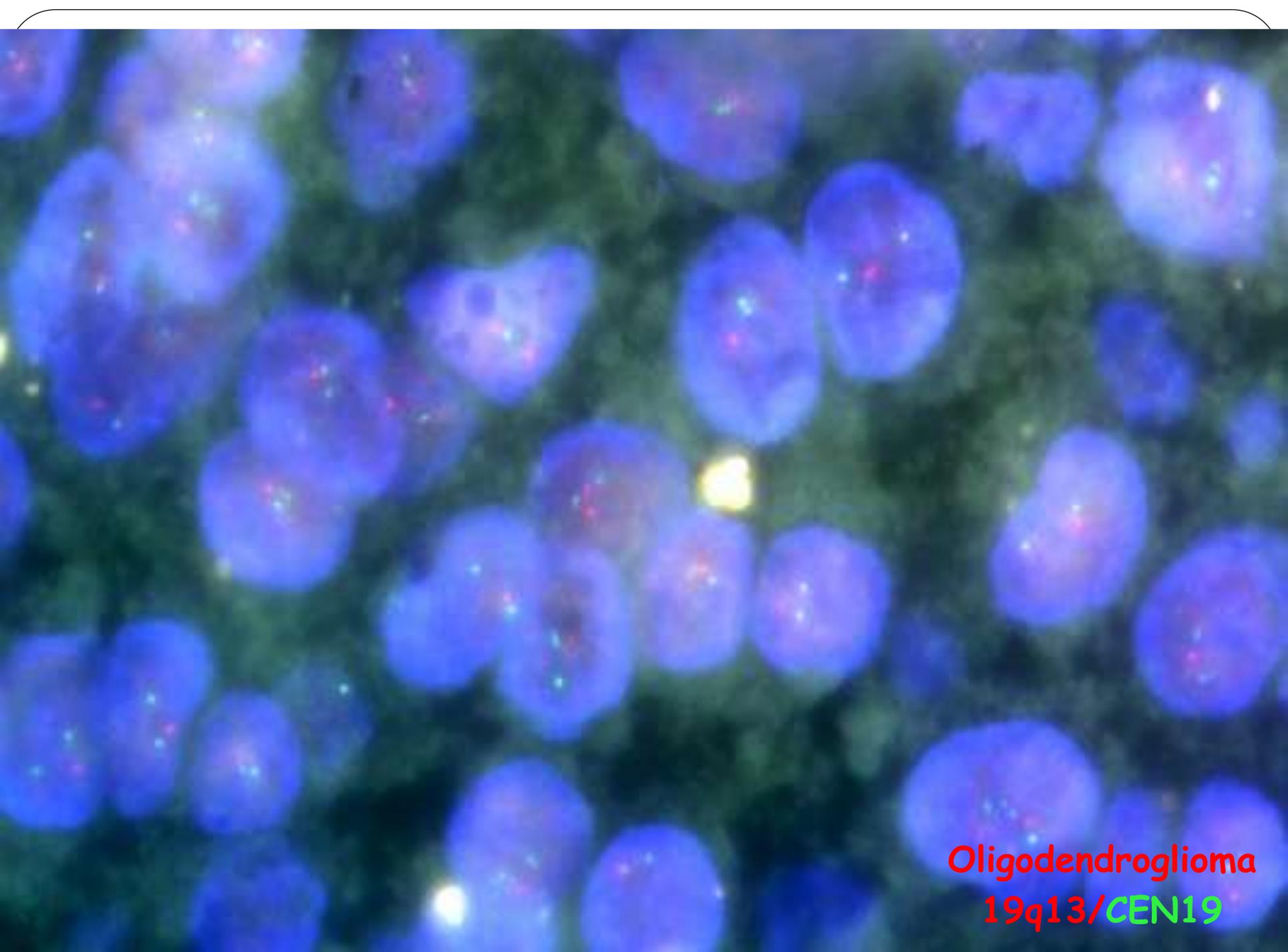
17q12
CEN17



Monosómico/Amplif (>5)

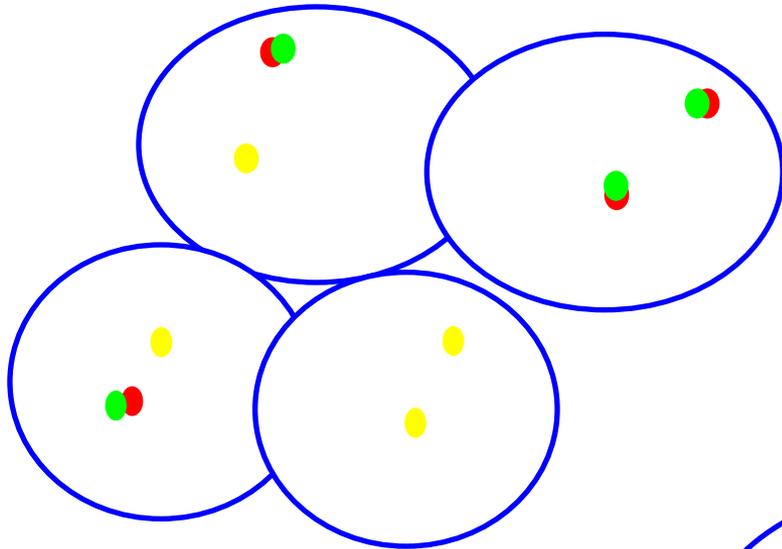


Oligodendrogloma
1p36/CEN1

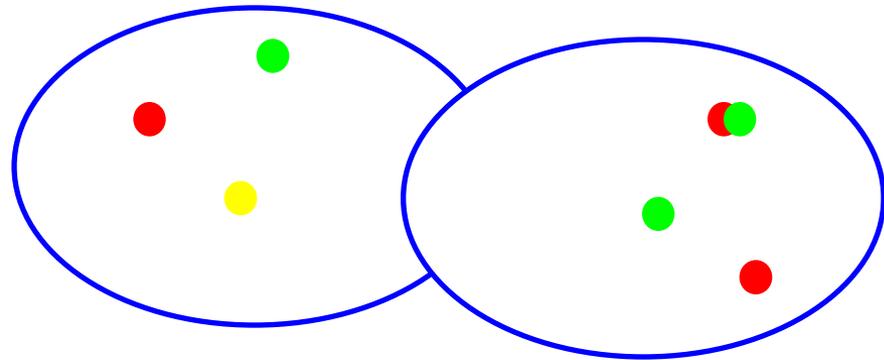


Oligodendroglioma
19q13/CEN19

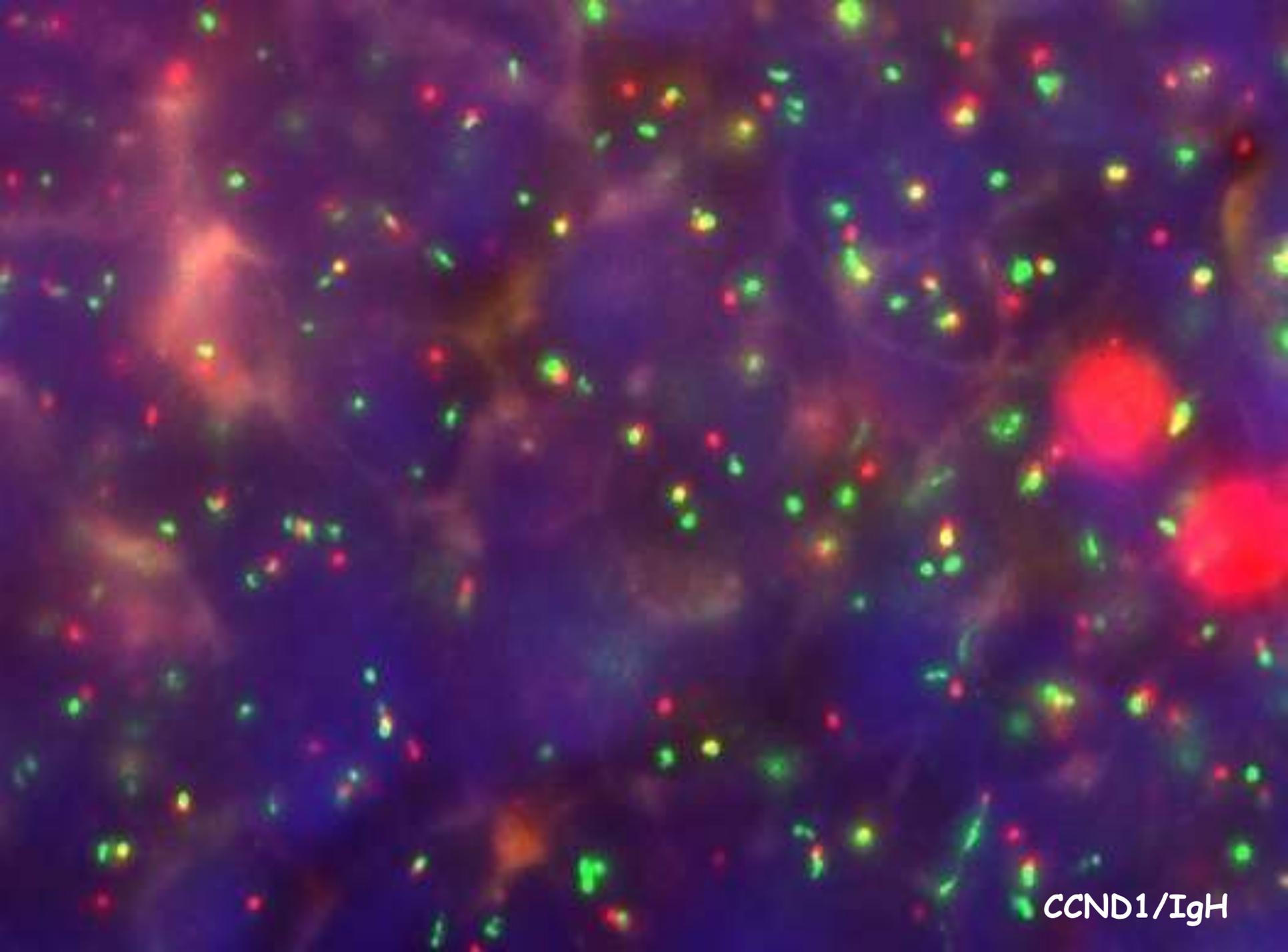
FISH: Translocación (Sondas „break apart“)



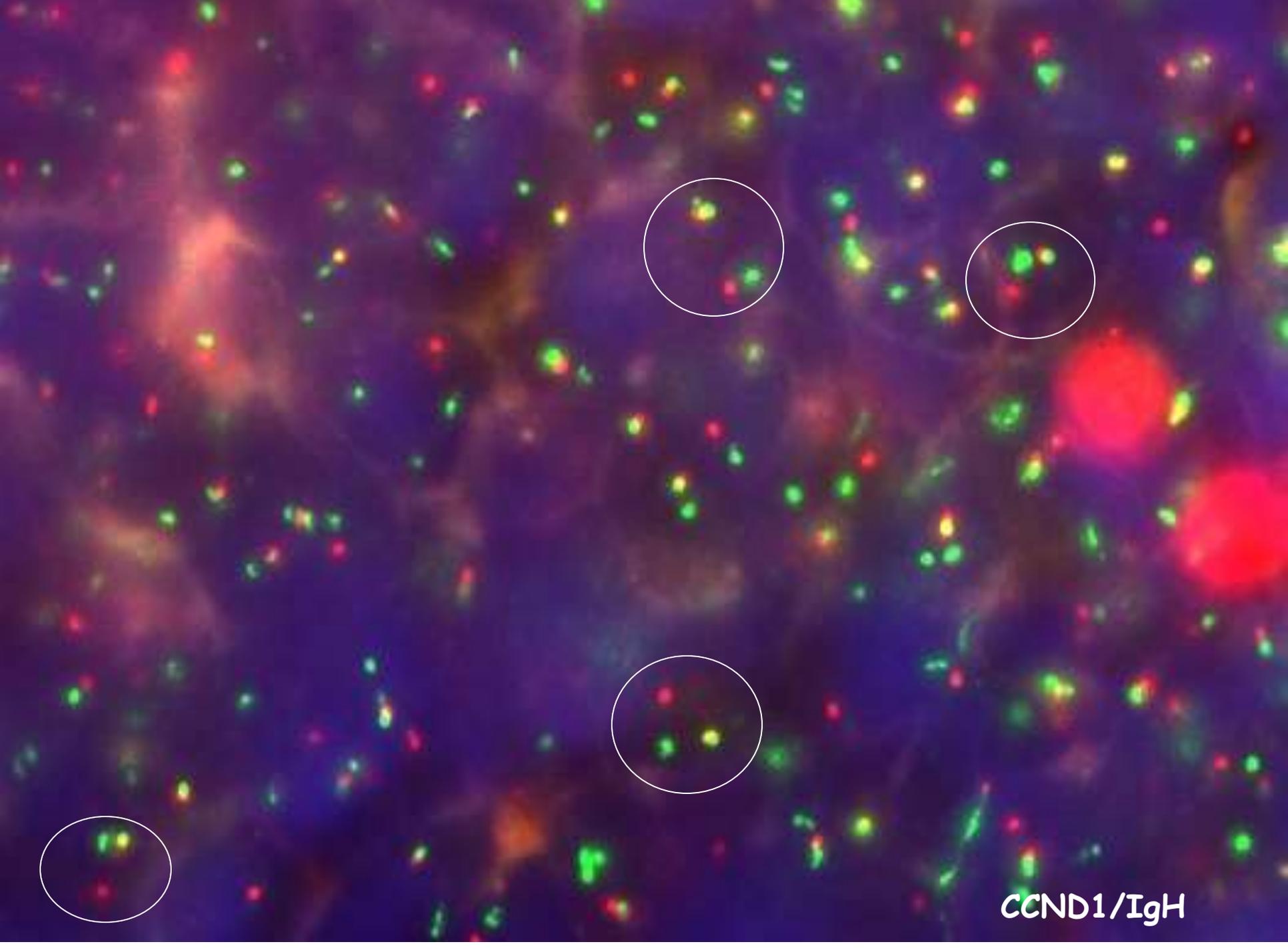
Normal



Translocación



CCND1/IgH



CCND1/IgH

PROBLEMAS

➤ Desparafinado insuficiente

➤ Mala morfología tisular

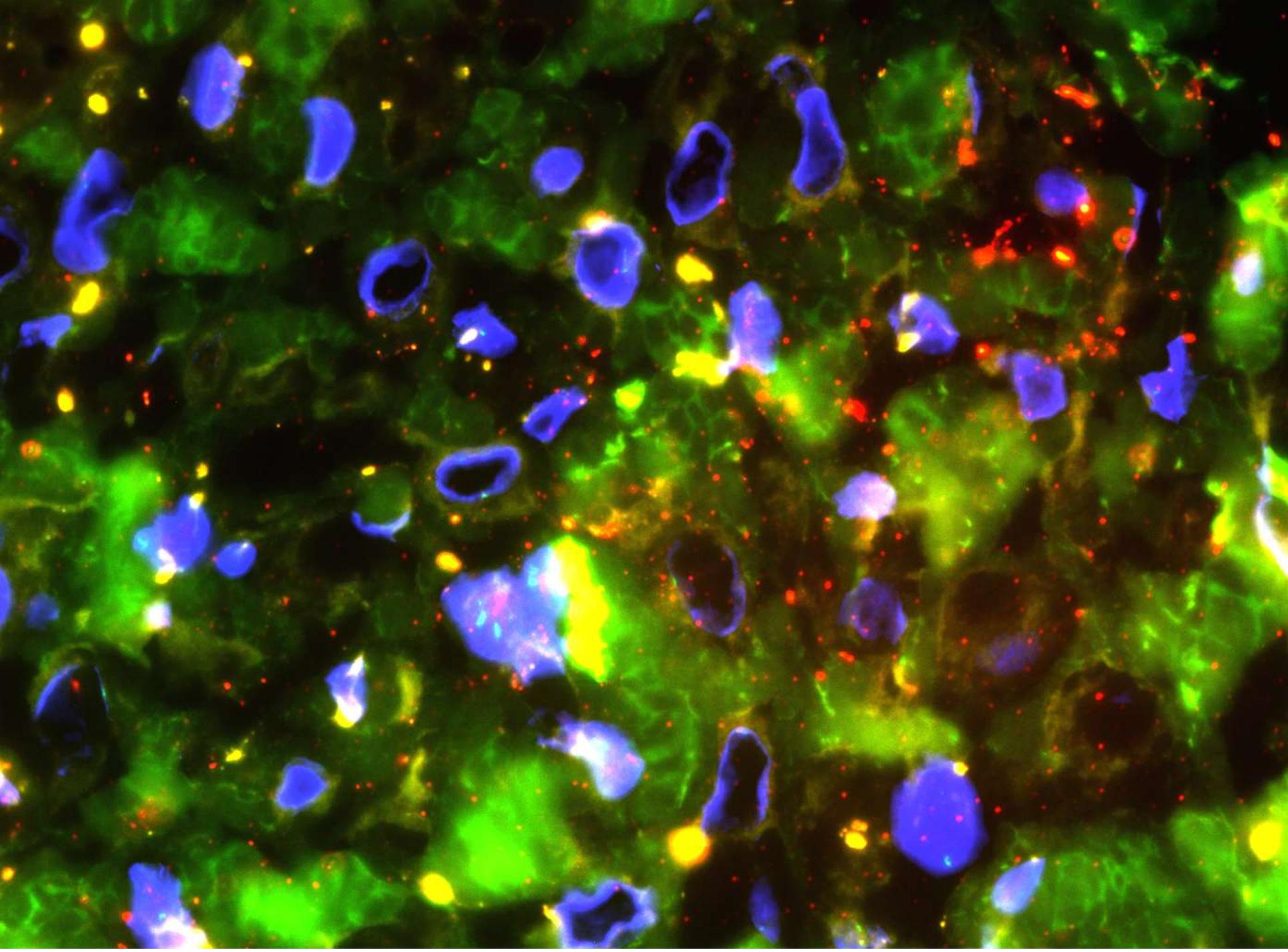
- Digestión
- Grosor del corte
- Fijación incorrecta

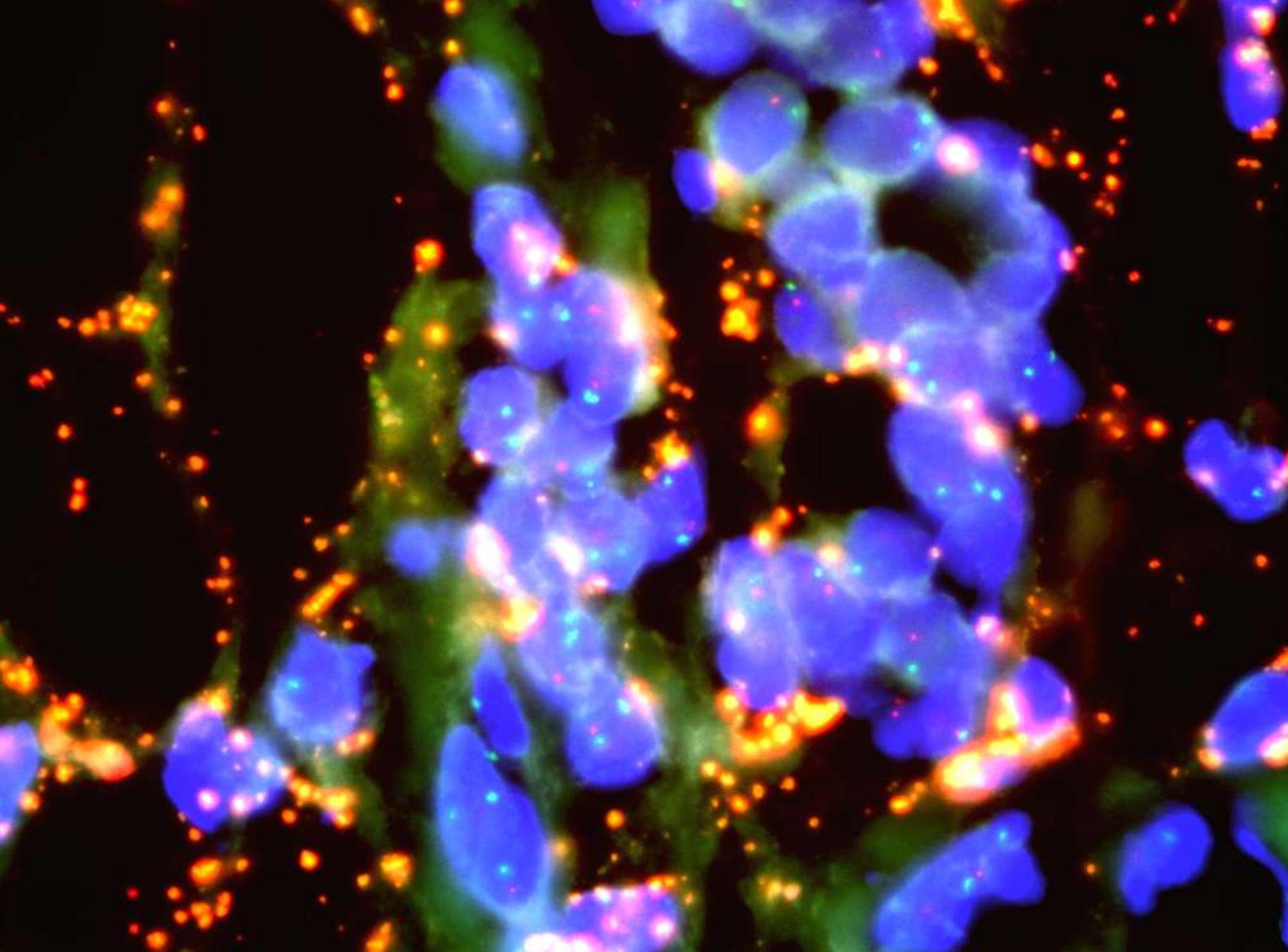
➤ Señal débil o áreas in señal

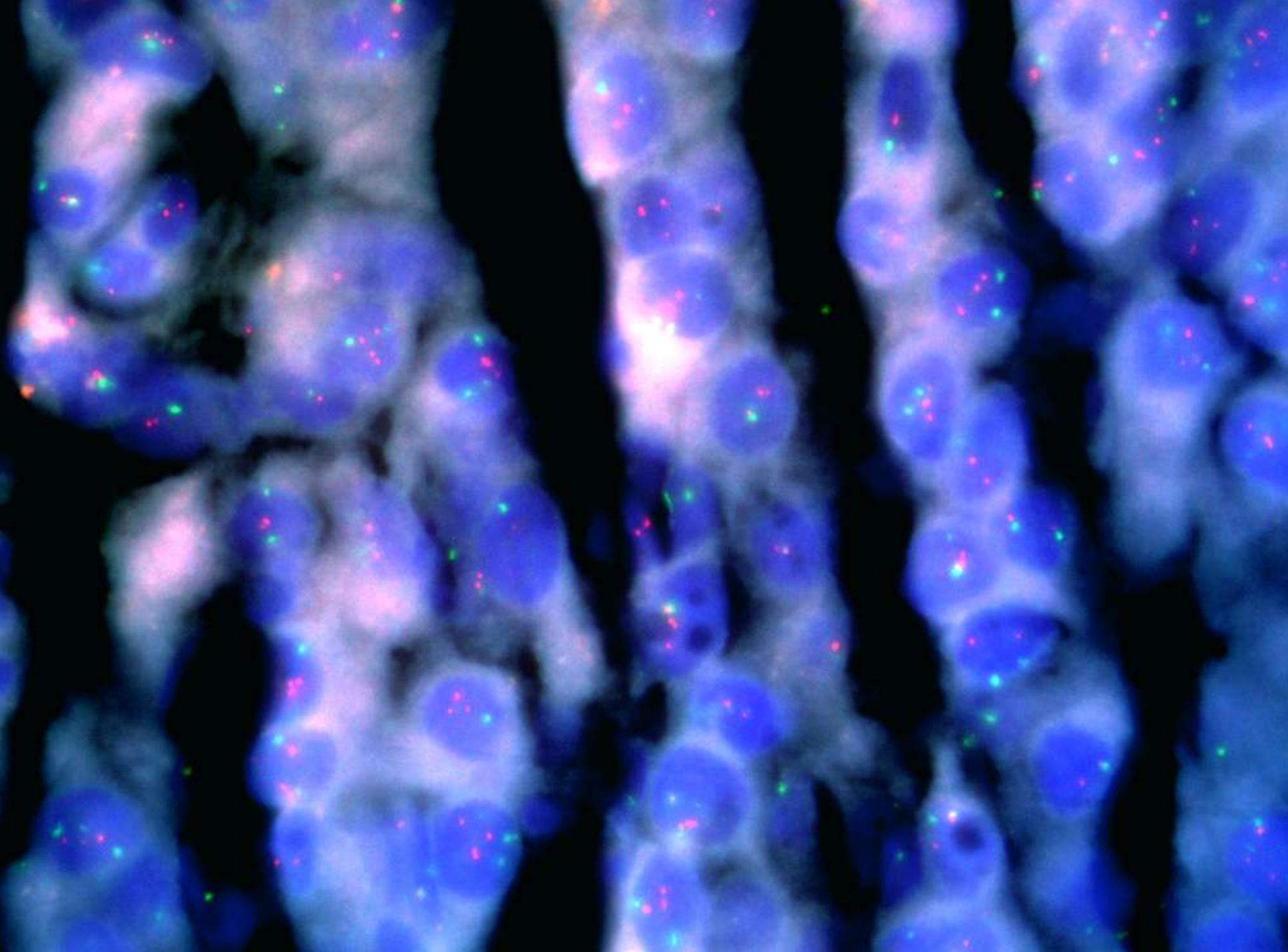
- Burbuja de aire
- Insuficiente sonda
- Digestión insuficiente

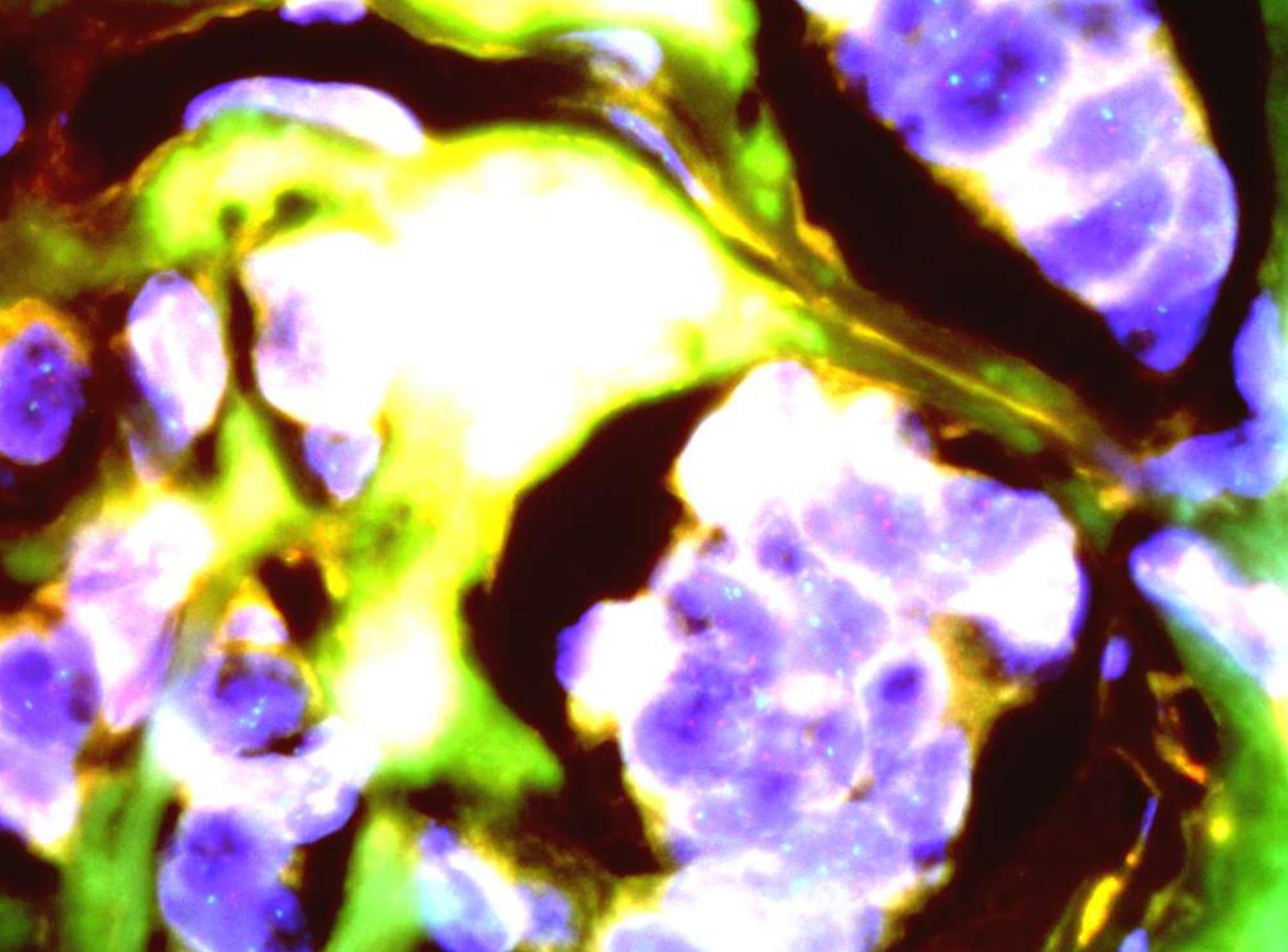
➤ Digestión excesiva

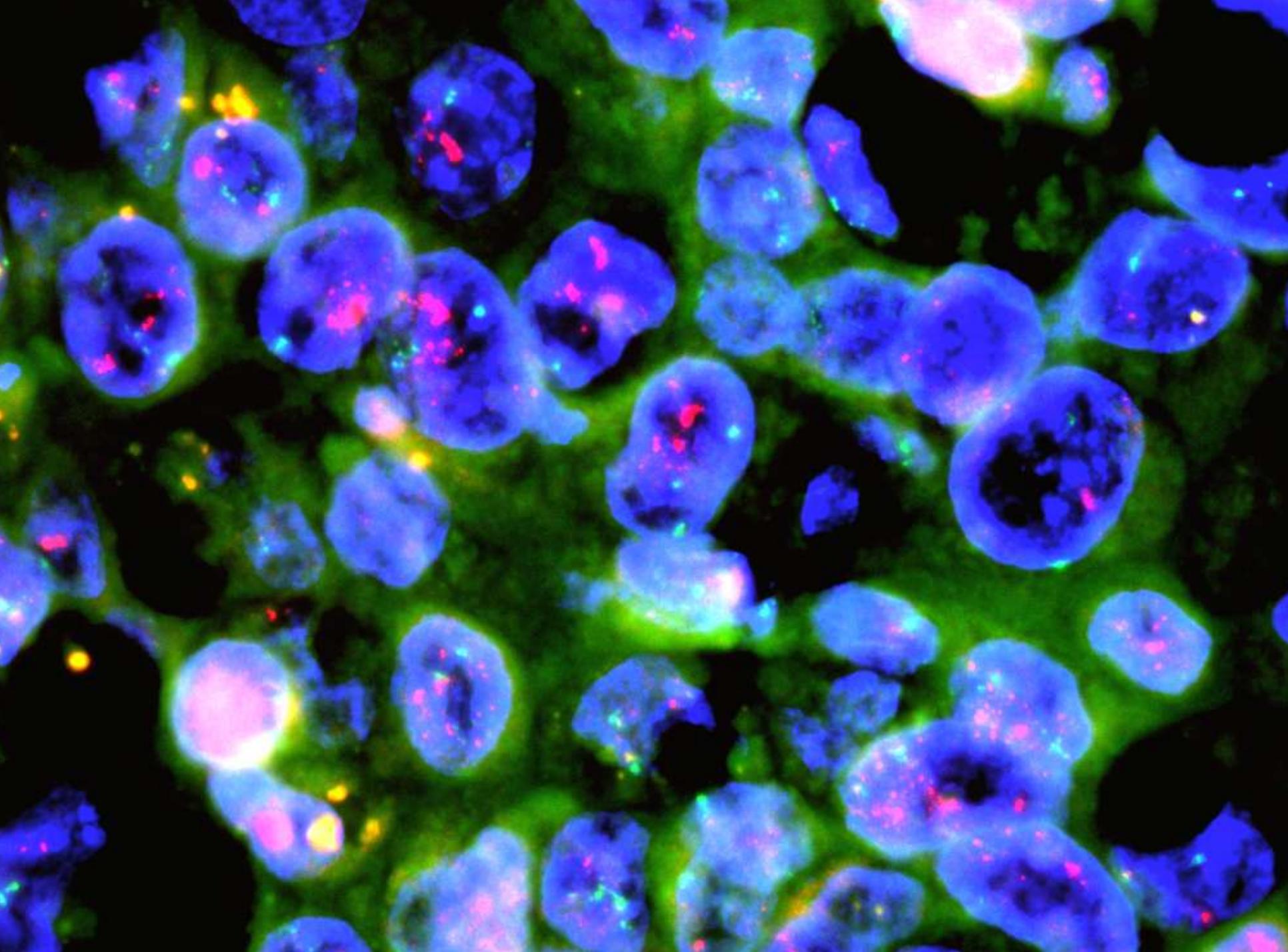
➤ Ruido de fondo

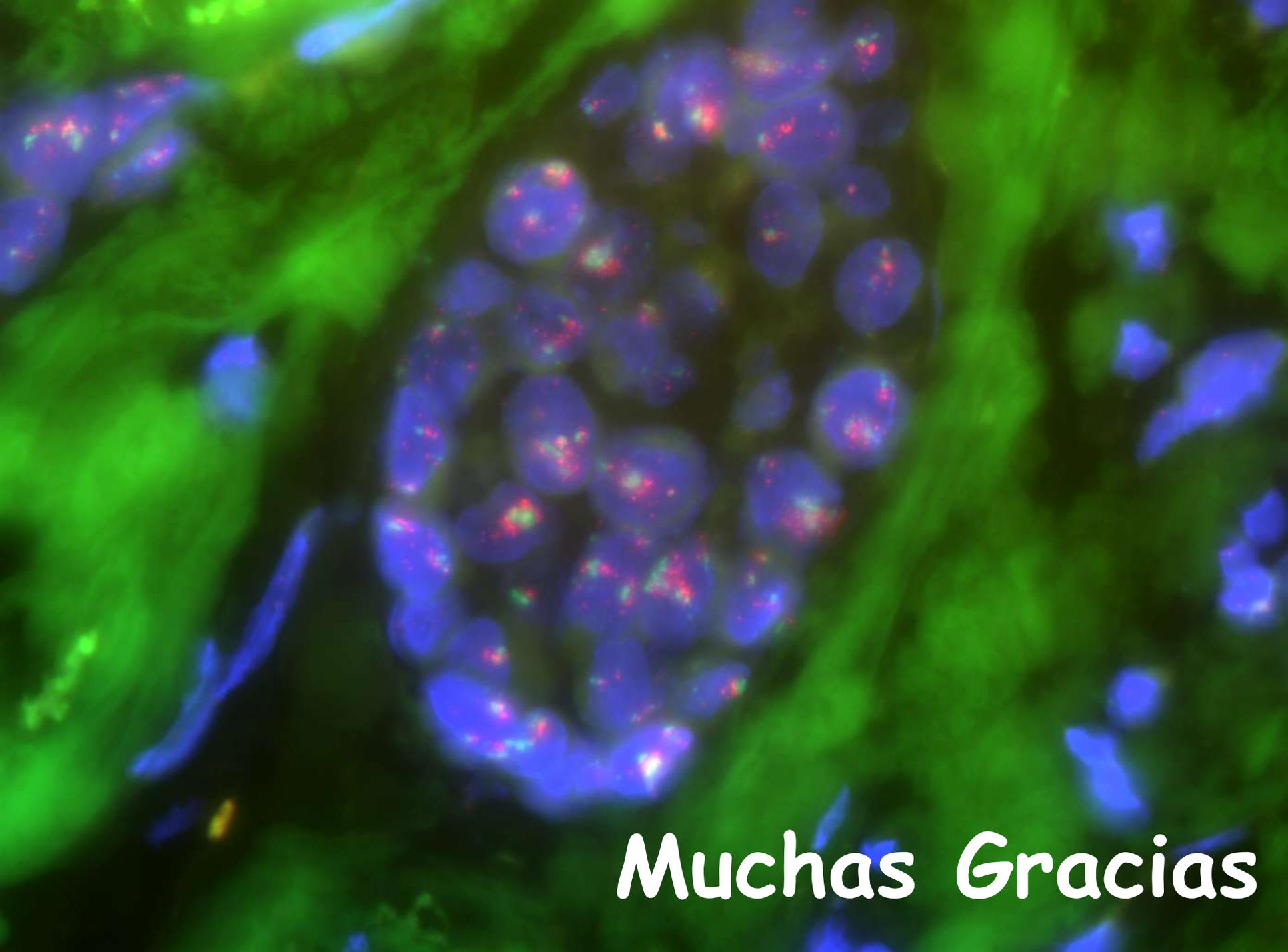












Muchas Gracias