

PADRONIZAÇÃO DA SONDA MYC BREAKAPART POR FISH EM TECIDO FIXADO EM FORMALINA E EMBLOCADO EM PARAFINA (FFPE)

Lemes CC, Germano A, Taccani AM, Lucon DR

Indaiatuba – São Paulo

Palavras chave: Hibridização *in situ* por fluorescência, FISH, tecido FFPE, MYC

INTRODUÇÃO: As aplicações da técnica FISH são inúmeras, sendo considerada uma ferramenta de diagnóstico e subclassificação das neoplasias¹. O protocolo padrão da FISH realizado em tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (FFPE) começa com a seleção da população representativa de células de interesse pelo patologista que marca a seção em corte histológico (CH) corado com hematoxilina e eosina¹. O gene MYC é um proto-oncogene cuja função é a regulação do ciclo celular: proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose e a regulação da estrutura da cromatina², sendo importante na formação, manutenção e progressão de vários tipos de câncer³. As dificuldades em otimizar protocolos FISH incluem os fatores pré-analíticos, analíticos e expertise técnica. **OBJETIVO:** Padronizar sistematicamente o protocolo da sonda MYC em tecido FFPE. **MÉTODO:** As biópsias de tecido cerebral fixadas em formalina tamponada a 10% e os cortes histológicos de 3µm em lâminas sinalizadas. Kit prétratamento, sonda MYC breakapart e DAPI foram utilizados segundo o fabricante Master Diagnóstica/Grupo Erviegas (Brasil). A análise foi realizada seguindo os critérios do Colégio Americano de Patologistas (CAP) e da Sociedade de Clínica Oncológica Americana (ASCO). **RESULTADOS:** No teste 1, não houve marcação com a digestão enzimática no tempo menor de 20min. Nos testes 2, 4 e 5 foi observado background, sinais fracos e os núcleos foram digeridos por maior tempo de pepsina (25min). Teste apresentou ser o melhor teste com sinais nítidos e sem background. **DISCUSSÃO:** As dificuldades da técnica FISH em FFPE incluem: tempo de fixação, processamento do tecido, qualidade da sonda, acessibilidade e preservação do DNA⁴. CH espessos causam sobreposição celular. A FISH com amostras FFPE pode ser especialmente desafiador, principalmente porque a fixação e a parafina afetam o DNA alvo e é necessária uma otimização adicional das etapas de pré-tratamento e hibridização utilizando kit de prétratamento adequado e validado. Os reagentes de pré-tratamento aumentam a eficiência da hibridização da sonda e reduz a autofluorescência de fundo⁵. A digestão enzimática e a lavagem pós hibridização é crucial para o sucesso da FISH⁶, pois interferem diretamente na visibilidade dos sinais. Apesar de observar um sinal fraco nos testes 2, 4 e 5, a literatura⁶ recomenda que os resultados de FISH não devem ser analisados se houver fluorescência de fundo que pode mascarar o sinal em mais de 10% das células e sinais fracos e não uniformes em mais de 25% das células⁶. Diversas modificações nessas etapas críticas foram realizadas para otimizar e garantir a visualização de sinais brilhantes, morfologia nuclear preservada e sem background, que resultou na otimização da sonda MYC breakapart juntamente com o Kit de prétratamento e DAPI. As lâminas foram analisadas por 2 profissionais experientes. Os nossos achados não demonstraram o rearranjo MYC, o que não interfere na otimização do protocolo. **CONCLUSÃO:** A sonda MYC, o kit pré-tratamento e o DAPI (Master Diagnóstica/Grupo Erviegas, Brasil) foram padronizados por FISH em tecido FFPE, apresentando melhor sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade.