

## Desarrollo de un dispositivo para realizar microarreglo en un laboratorio convencional

Rómulo Luis Cabrini,\*,\*\* Daniel Brandizzi,\*\* Graciela Schlegel,\* Stella Maris Vidal,\* Eduardo Santini Araujo\*,\*\*

### RESUMEN

Este artículo describe la técnica de tipo microarreglo con materiales de bajo costo y con excelente calidad técnica, que es fácil de ejecutar en un laboratorio convencional de anatomía patológica.

**Palabras clave:** microarreglo, laboratorio de patología quirúrgica.

### ABSTRACT

This paper describes a microarray technique that employs low cost materials, exhibits excellent technical quality and is accessible to a conventional histopathology laboratory.

**Key words:** microarray, surgical pathology laboratory.

**E**l rápido avance de las técnicas de inmunohistoquímica ha hecho posible la detección de un número de moléculas, en especial proteicas, con una técnica sencilla y con escasa instrumentación.<sup>1</sup>

La técnica de microarreglos permite colocar fragmentos (cilindros de 3-6 mm) en un mismo bloque de parafina, varias muestras de tejidos de diferentes orígenes. Estos bloques de microarreglos de tejidos se aplican en estudios de hibridación *in situ* para evaluar la expresión de genes múltiples de ADN y ARN o en técnicas de inmunohistoquímica. Dicha técnica es ampliamente utilizada en series de estudios de diferentes tumores humanos, así como también

en diferentes modelos de investigación en animales de experimentación.<sup>2-10</sup>

En los laboratorios de patología las reacciones inmunohistoquímicas se hacen para casos problemáticos con la utilización del corte histológico completo del tejido. Sin embargo, en algunos casos individuales, y para la utilización de series, es ventajoso el uso de métodos que puedan procesar un número grande de reacciones.<sup>1,8-10</sup>

En los equipos del mercado esta toma se hace con complejos sistemas automáticos con un visor microscópico que permite introducir mecánicamente un cilindro hueco de acero.<sup>1,8</sup> El costo de estos equipos supera los 15 mil dólares.

En el Servicio de Patología del Hospital Militar Central (SPHMC) y en la División de Patología, Departamento de Radiobiología, de la Comisión Nacional de Energía Atómica (DVDR-CNEA) desarrollamos una metodología sencilla con materiales fáciles de obtener, que permiten procesar en una operación un número significativo de muestras con excelente nivel técnico en sus resultados.

El objetivo de este trabajo es presentar los detalles técnicos de su ejecución.

### MATERIAL Y MÉTODO

#### Técnica

Las tomas para microarreglo de cada caso se basan en los equipos desarrollados hasta el presente, en la extracción de

\* Hospital General 601-Hospital Militar Central CIR MY Cosme Argerich.

\*\* División de Patología, Departamento de Radiobiología de la Comisión Nacional de Energía Atómica.

Correspondencia: Dr. Daniel Brandizzi. División Patología, Departamento de Radiobiología. Centro Atómico Constituyentes. Avenida General Paz 1499, CP 1650, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

Correo electrónico: brandizzi@cnea.gov.ar

Recibido: agosto, 2011. Aceptado: septiembre, 2011.

Este artículo debe citarse como: Cabrini RL, Brandizzi D, Schlegel G, Vidal SM, Santini-Araujo E. Desarrollo de un dispositivo para realizar microarreglo en un laboratorio convencional. Patología Rev Latinoam 2011;49(4):239-242.

cilindros de los tacos de parafina utilizados en forma convencional en los laboratorios de patología. Estos cilindros deben contener en su interior una muestra representativa de la lesión a estudiar. La técnica permite realizar cilindros de diferentes diámetros de acuerdo con las necesidades de la lesión a considerar.

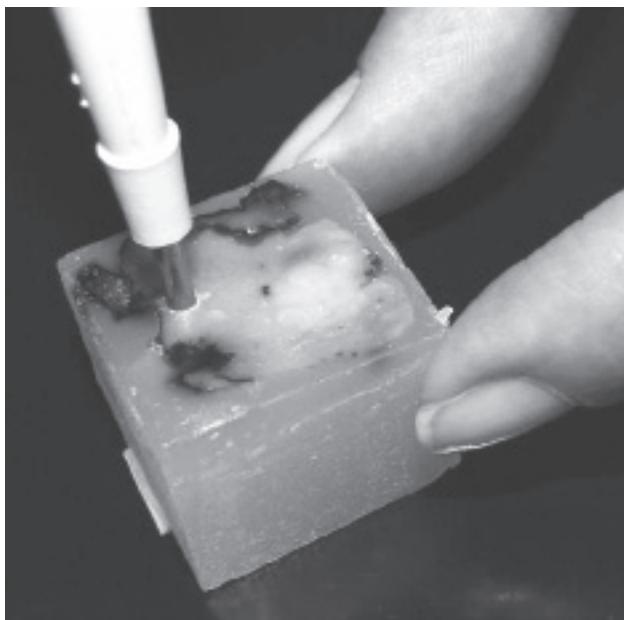
El patólogo selecciona las áreas más representativas de la toma biópsica para cada caso en el que se implantará inmunomarcación. Dicho paso se realiza en un corte coloreado con hematoxilina y eosina, con un marcador indeleble se identifican las zonas elegidas. Es importante aclarar que el plano de corte del preparado analizado por el patólogo debe coincidir con la superficie del tajo de parafina donde está incluida la toma biópsica en estudio. El técnico seleccionará en el tajo de parafina el sector marcado por el patólogo. En este zona se procederá a introducir el sacabocados –con leves movimientos circulares– que corta de una manera muy nítida y que es fácil de comprobar ulteriormente (Figura 1). En nuestro caso para extraer la muestra utilizamos el sacabocados para tomas de biopsias dermatológicas que se obtiene en el mercado local. Los diámetros de los sacabocados seleccionados fueron 1, 2 y 3 mm con mango de plástico. Se confeccionará un cursor (varilla metálica de diámetro menor al diámetro interno del sacabocados para extraer tal cilindro del mismo) [Figuras 2 y 3].

Una vez realizada esta operación, con el cursor que tiene cada sacabocados se extrae muy fácilmente el cilindro de parafina del interior del mismo, que deberá ser cuidadosamente identificado con un sistema de numeración *ad hoc*.

#### Preparación del bloque de parafina muestra

Para realizar la comparación de casos hay que preparar un bloque de parafina muestra de un espesor no superior a la longitud activa del sacabocados (Figura 3). Este bloque será perforado con el mismo diámetro de sacabocados con el que se realizan las tomas de los cilindros de los tacos de parafina con la muestras de tejido a estudiar. Estas perforaciones se realizarán ordenadamente de manera que nos permita individualizar cada caso del estudio. Nosotros confeccionamos una plantilla guía de perforación que nos permite estandarizar y reconocer cada uno de los casos.

Una vez perforado el bloque de parafina muestra se procede a introducir cada uno de los cilindros obtenidos



**Figura 1.** Maniobra en la que el técnico introduce el sacabocados con leves movimientos circulares en el tajo de parafina. En un mismo plano el patólogo seleccionó la zona de la toma biópsica más representativa para realizar la inmunomarcación.

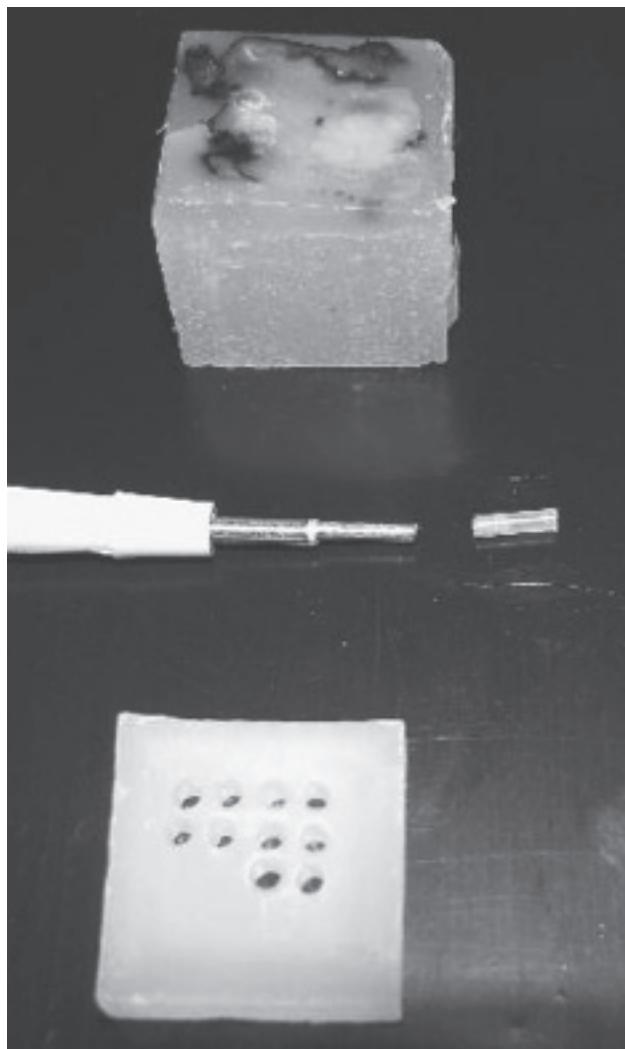
de los tacos de parafina que contiene las biopsias en las perforaciones previamente realizadas (Figura 2). Para asegurar esta operación puede calentarse sin que el bloque de parafina muestra llegue a fusión. Se completa el sellado con una gota de parafina. De esta forma se asegura muy efectivamente el cilindro dentro del bloque.

Cuando están colocados cada uno de los cilindros y sellados con parafina líquida (Figura 4) se procede al corte convencional con microtomo, el correspondiente montaje en portaobjetos siliconados (Figura 5).

Con este tipo de muestras se realizan las técnicas de demostración que se hayan programado; es conveniente el control del material con cortes coloreados con hematoxilina-eosina.

#### RESULTADOS

Nuestro método es sencillo, rápido, económico, utiliza tecnología que se usa en los laboratorios de Patología Quirúrgica y sacabocados tipo dermatológicos que son fáciles de conseguir en el mercado de instrumentos de medicina.

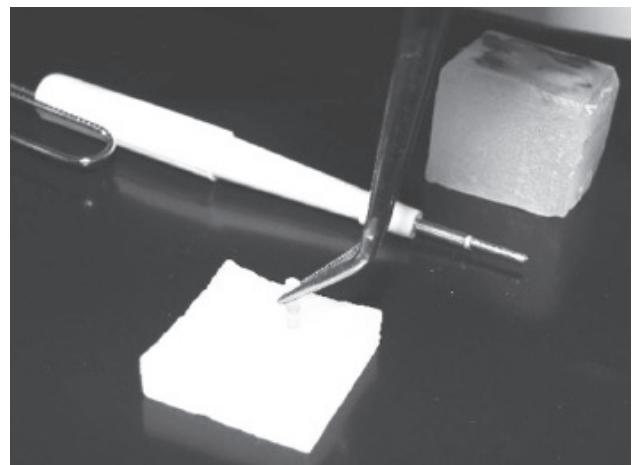


**Figura 2.** Taco de parafina que incluye la toma biópsica a estudiar (sector superior de la foto). Sacabocados utilizado, en el interior del mismo se observa una varilla metálica de diámetro menor y el cilindro obtenido de la punción del tajo (sector medio de la foto). Bloque de parafina muestra (sector inferior de la foto).

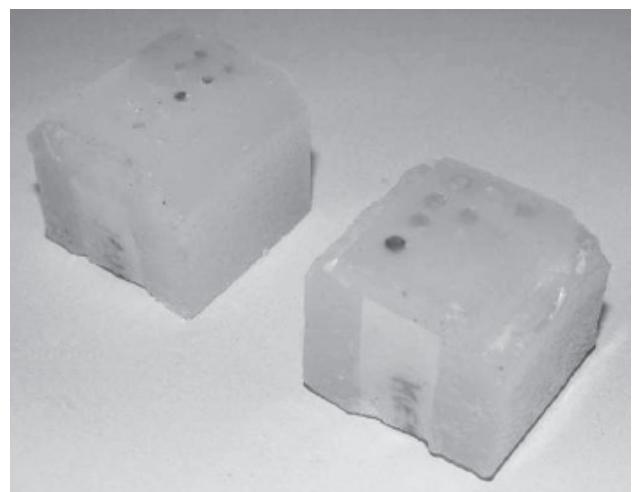
## DISCUSIÓN

El método de microarreglo permite la exploración simultánea de un número grande de muestras biópsicas de diferentes orígenes.<sup>1-8</sup> Como todas las muestras están sometidas a inmunomarcación en forma paralela por estar montadas en un mismo portaobjeto, los resultados son comparables.<sup>8-10</sup>

Si bien algunos laboratorios de anatomía patológica utilizan metodologías similares, presentamos detalles



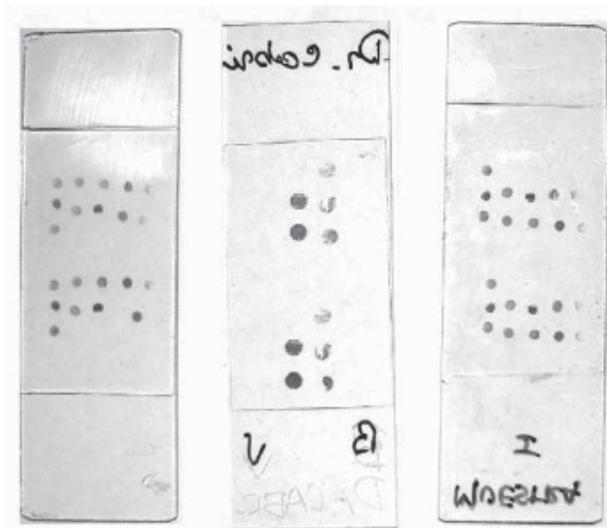
**Figura 3.** Maniobra en la que el técnico introduce en cada una de las perforaciones de los bloques de parafina muestra los cilindros obtenidos de los tacos de parafina.



**Figura 4.** Dos ejemplos de tacos de parafina que incluyen bloques de parafina muestra listos para ser cortados con el micromotomo.

técnicos propios de nuestro grupo que simplifican algunos aspectos. Ha sido un procedimiento que no tiene inconvenientes en su realización, el material para su realización es de simple obtención y en áreas de fácil interpretación histopatológica, para medidas subjetivas y cuando utilizamos métodos microespectrofotométricos.

Con respecto a los instrumentos utilizados, la incorporación del sacabocados dermatológico es un detalle importante dado que éste es un elemento médico sencillo de obtener en el mercado y de gran afinidad a la especialidad.



**Figura 5.** Montaje en portaobjetos siliconados coloreados con hematoxilina y eosina.

Sin embargo, es importante considerar algunas situaciones que pueden determinar errores que no son despreciables.

La manipulación de múltiples muestras puede dar origen a errores de identificación, aun en los laboratorios más sofisticados.

La localización de la lesión a investigar depende, en última instancia, del observador del microscopio que decide la zona de toma.

Es importante verificar que el área seleccionada por el patólogo coincida con el cilindro ubicado en el portaobjetos.

Para el caso de lesiones de tipo tumoral es relativamente frecuente una densidad de coloración variable y a veces un sector no es el mejor para la identificación de una respuesta inmunitaria.

Hemos utilizado este método en estudios microespectrofotométricos, en series de algunos tumores donde la

calidad de las muestras ha sido muy satisfactoria. Por este motivo la técnica de microarreglos se presenta especialmente para analizar el comportamiento de series, más que para análisis individual de casos.<sup>2</sup>

Es importante considerar estos inconvenientes antes de sacar conclusiones definitivas.

Presentamos un método sencillo, rápido, económico, con tecnología que se utiliza en los laboratorios de Patología Quirúrgica.

## REFERENCIAS

1. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4(7):844-847.
2. Fournier G, Latil A, Amet Y, Abalain JH, et al. Gene amplifications in advanced-stage human prostate cancer. *Urol Res* 1995;22:343-347.
3. Latil A, Baron JC, Cussenot O, Fournier G, et al. Oncogene amplifications in early-stage human prostate carcinomas. *Int J Cancer* 1994;59:637-638.
4. Han EK, Lim JT, Arber N, Rubin MA, et al. Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. *Prostate* 1998;35:95-101.
5. Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG. Detection of *c-myc* oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Res* 1997;57:524-531.
6. Visakorpi T, Hytytinen E, Koivisto P, Tanner M, et al. *In vivo* amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet* 1995;9:401-406.
7. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammeila T, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res* 1997;57:314-319.
8. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence *in situ* hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res* 1999;59(4):803-806.
9. Totowa NJ. Methods in molecular biology. In: Fung E. Protein arrays. Humana Press Inc.
10. Paizs M, Engelhardt JI, Siklós L. Quantitative assessment of relative changes of immunohistochemical staining by light microscopy in specified anatomical regions. *J Microsc* 2009;234(1):103-112.