



ZytoLight

SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit

REF Z-2020-5 Σ 5

REF Z-2020-20 Σ 20

Para a detecção qualitativa de amplificações do gene humano ERBB2 e alfa-satélites do cromossoma 17 por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH)



Dispositivo médico de diagnóstico *In Vitro*
de acordo com a diretiva EU 98/79/CE

1. Utilização pretendida

O ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit destina-se a ser utilizado para a detecção qualitativa de amplificações do gene humano ERBB2, assim como dos alfa-satélites do cromossoma 17 em amostras fixadas em formalina e impregnadas em parafina, nomeadamente em tecidos de carcinomas da mama ou estômago, através de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).

A interpretação dos resultados deve ser realizada no âmbito do contexto da história clínica do paciente relativamente a outros dados clínicos e patológicos por um profissional qualificado.

2. Relevância clínica

O gene ERBB2 (HER2 e NEU) está localizado na região cromossómica 17q12 e codifica uma glicoproteína transmembranar de 185-190 kDa, p185, atuando como recetor de fator de crescimento celular. A proteína p185 pertence ao subgrupo EGFR (recetor de fator de crescimento epidérmico) da superfamília RTK (recetor tirosina quinase), também incluindo EGFR (ERBB1), ERBB3 (HER3), e ERBB4 (HER4). A amplificação do proto-oncogene ERBB2, observada em aproximadamente 20% de todas as amostras de carcinoma da mama, tem sido correlacionada com pior prognóstico da doença. Resultados semelhantes têm sido obtidos para uma variedade de outras neoplasias malignas, p.e. carcinoma do ovário, carcinoma gástrico e carcinomas da glândula salivar.

3. Princípio de teste

A técnica de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) permite a detecção e visualização de sequências de ácidos nucleicos específicas em amostras de células. Os fragmentos de ADN marcados por fluorescência, designados sondas FISH, e as respetivas cadeias-alvo de ADN nas amostras, são codenaturados e subsequentemente renaturados durante a hibridação. Posteriormente, os fragmentos da sonda não específicos e não ligados são removidos através de fases de lavagem restrita. Após a coloração de contraste do ADN com DAPI, os fragmentos da sonda hibridizados são visualizados utilizando o microscópio de fluorescência equipado com filtros de excitação e emissão específicos para os fluorocromos com os quais os fragmentos da sonda FISH foram diretamente marcados.

4. Reagentes fornecidos

O ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe Kit está disponível em duas apresentações e é composto por:

Código	Componente	Quantidade		Recipiente
		5	20	
PT1	<u>Heat Pretreatment Solution Citric</u>	150 ml	500 ml	Frasco c/ tampa rosca (grande)
ES1	<u>Pepsin Solution</u>	1 ml	4 ml	Conta-gotas, tampa branca
WB1	<u>Wash Buffer SSC</u>	210 ml	560 ml	Frasco c/ tampa rosca (grande)
PL8	<u>ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe</u>	0.05 ml	0.2 ml	Tubo de reação, Tampa vermelha
WB2	<u>25x Wash Buffer A</u>	50 ml	2x50 ml	Frasco c/ tampa rosca (médio)
MT7	<u>DAPI/DuraTect-Solution</u>	0.2 ml	0.8 ml	Tubo de reação, Tampa azul
	Instruções de utilização	1	1	

Z-2020-5 (5 testes): Componentes **ES1**, **PL8**, e **MT7** são suficientes para 5 reações. Componente **WB2** é suficiente para 5x 3 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 2 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB1** é suficiente para 3 tinas de coloração de 70 ml cada.

Z-2020-20 (20 testes): Componentes **ES1**, **PL8**, e **MT7** são suficientes para 20 reações. Componente **WB2** é suficiente para 11x 3 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **PT1** é suficiente para 7 tinas de coloração de 70 ml cada. Componente **WB1** é suficiente para 8 tinas de coloração de 70 ml cada.

O ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8) é composto por:

- Polinucleótidos (~10.0 ng/ μ l) com marcação ZyGreen (excitação 503 nm/emissão 528 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 17q12-q21.1* (chr17:37,572,531-38,181,308) contendo o gene ERBB2 (ver Fig. 1).
- Polinucleótidos (~1.5 ng/ μ l) com marcação ZyOrange (excitação 547 nm/emissão 572 nm), dirigidos ao mapeamento de sequências alvo em 17p11.1-q11.1 específicas para a região centromérica alfa satélite D17Z1 do cromossoma 17.
- Tampão de hibridação baseado em formamida

*De acordo com o Conjunto do Genoma Humano GRCh37/hg19

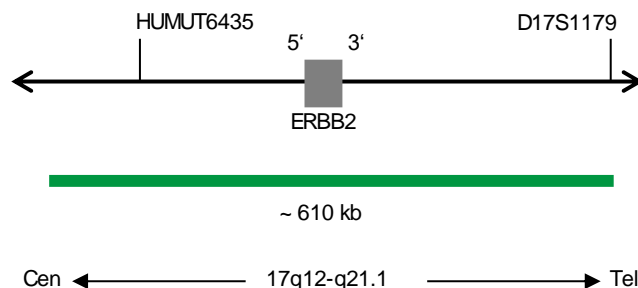


Fig. 1: SPEC ERBB2 Mapa da sonda (sem escala)

5. Materiais necessários mas não fornecidos

- Amostras de controlo positivo e negativo
- Lâminas de microscópio, com carregamento positivo
- Banho-Maria (37°C, 98°C)
- Hibridador ou placa quente
- Hibridador ou câmara de humidade na estufa de hibridação
- Pipetas ajustáveis (10 µl, 25 µl)
- Frascos ou banhos de coloração
- Temporizador
- Termómetro calibrado
- Etanol ou álcool
- Xilol
- Água desionizada ou destilada
- Lamelas (22 mm x 22 mm, 24 mm x 60 mm)
- Cola, por ex.: Fixogum Rubber Cement (Prod. N.º. E-4005-50/-125) ou similar
- Microscópio de fluorescência devidamente calibrado (400-1000x)
- Óleo de imersão aprovado para microscopia de fluorescência
- Conjuntos de filtros adequados

6. Armazenamento e manuseamento

Os componentes do kit devem ser armazenados entre 2 e 8°C. Adicionalmente, o DAPI/DuraTect-Solution (MT7) e a sonda (**PL8**) devem ser armazenados protegidos da luz. Repor as condições de armazenamento imediatamente após a utilização. Se as condições de armazenamento forem respeitadas, o kit irá funcionar sem perdas no seu desempenho, pelo menos até à data de validade impressa no rótulo. Não utilizar reagentes após terminar a data de validade indicada.

7. Avisos e precauções

- Ler as instruções antes de utilizar!
- Não utilizar reagentes após terminar a data de validade!
- Este produto contém substâncias (em concentrações e volume reduzidos) que são nocivas para a saúde e potencialmente infecciosas. Evitar qualquer contacto direto com os reagentes. Tomar as medidas de proteção adequadas (utilizar luvas descartáveis, óculos de proteção e vestuário de laboratório)!
- Caso os reagentes entrem em contacto com a pele, lavar imediatamente com água abundante!
- Está disponível a ficha de dados de segurança, se solicitada, para utilização profissional.
- Não reutilizar os reagentes.
- Evitar a contaminação cruzada das amostras dado que poderá conduzir a resultados incorretos.
- A sonda não deve ser exposta à luz, especialmente luz forte, por um período prolongado de tempo, ou seja, todos os passos devem ser realizados, quando possível, numa sala escura e/ou utilizando recipientes resistentes à luz!

Frases de risco e de aviso para PL8:

O componente que determina o risco é a formamida.



Perigo

H351	Suspeito de provocar cancro.
H360FD	Pode afetar a fertilidade. Pode afetar o nascituro.
H373	Pode afetar os órgãos após exposição prolongada.
P201	Solicitar instruções específicas antes da utilização.
P202	Não manusear o produto antes de ter lido e percebido todas as precauções de segurança.
P260	Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção
P308+P313	Em caso de exposição: Consulte um médico.
P405	Armazenar em local fechado à chave

Frases de risco e de aviso para PT1, WB1 e WB2:

O componente que determina o risco é a mistura de: 5-cloro-2-metil-4-isotiazolina-3-um [EC no. 247-500-7] e 2-metil-2H-isotiazol-3-um [EC no. 220-239-6] (3:1).



Atenção

H317	Pode provocar uma reação alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis.
P272	A roupa de trabalho contaminada não pode sair do local de trabalho.
P280	Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água/...
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

8. Limitações

- Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*.
- Apenas para utilização profissional.
- A interpretação clínica de qualquer coloração positiva, ou a ausência desta, deve ser efetuada no contexto da história clínica, morfologia e outros critérios histopatológicos, assim como outros testes de diagnóstico. É da responsabilidade do patologista qualificado estar familiarizado com as sondas FISH, reagentes, painéis de diagnóstico e métodos utilizados para produzir a preparação da coloração. A coloração deve ser realizada num laboratório certificado e licenciado, sob a supervisão de um patologista responsável pela revisão das lâminas de coloração e que garanta a adequação dos controlos positivos e negativos.
- A coloração de amostras, especialmente, a intensidade do sinal e a coloração de fundo, depende do manuseamento e do processamento da amostra antes da coloração. A fixação, congelamento, descongelamento, lavagem, secagem, aquecimento ou microtomia inadequada ou a contaminação com outras amostras ou fluidos pode produzir perturbações ou falsos resultados. Os resultados inconsistentes podem resultar de variações nos métodos de fixação e inclusão, assim como de irregularidades inerentes à amostra.
- A sonda deve ser utilizada apenas para deteção dos loci descritos em 4 "Reagentes fornecidos"
- O desempenho foi validado utilizando os procedimentos descritos nestas instruções de utilização. As alterações a estes procedimentos podem afetar o desempenho e devem ser validadas pelo utilizador.

9. Substâncias que podem interferir

Os eritrócitos presentes na amostra podem apresentar autofluorescência, o que afeta o reconhecimento do sinal.

Os seguintes fixadores são incompatíveis com o equipamento FISH:

- Fixador de Bouin
- Fixador B5
- Fixadores ácidos (ex.: ácido pírco)
- Fixador de Zenker
- Álcoois (quando utilizados individualmente)
- Cloreto de mercúrio
- Fixador de formaldeído/zinco
- Fixador de Hollande
- Formalina não tamponada

10. Preparação de amostras

Recomendações:

- Fixação em formalina tamponada neutra a 10% durante 24 h à temperatura ambiente (18-25°C).
- Dimensão da amostra $\leq 0,5 \text{ cm}^3$.
- Utilizar parafina de qualidade Premium.
- A impregnação deve ser efetuada a temperaturas inferiores a 65°C.
- Preparar secções de micrótomo de 2-4 μm .
- Utilizar lâminas de microscópio com carregamento positivo.
- Adesão dos cortes durante 2-16 h a 50-60°C.

11. Tratamento de preparação do dispositivo

25x Wash Buffer (WB2) deve ser preparado de acordo com as instruções em 12. "Procedimento do teste". Todos os restantes reagentes do kit são prontos-a-usar. Não é necessária reconstituição, mistura ou diluição. Trazer a sonda até à temperatura ambiente (18-25°C) antes de utilizar e proteger da luz. Antes de abrir o frasco, homogeneizar com vortex e centrifugar ligeiramente.

12. Procedimento do teste

12.1 Dia 1

Passos preparatórios

- (1) Preparação de series de etanol: (70%, 90%, e 100%): Diluir 7, 9 e 10 partes de etanol 100% com 3, 1 e 0 partes água destilada ou desionizada, respetivamente. Estas soluções podem ser armazenadas em recipientes apropriados e reutilizadas.
- (2) *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)*: pré-aquecer a 98°C.
- (3) *Wash Buffer SSC (WB1)*: trazer para temperatura ambiente (TA).
- (4) *ZytoLight FISH Probe*: trazer para TA antes de utilizar e proteger da luz.

Opcional, quando efetuado passo de pós-fixação:

(altamente recomendado quando a fixação do tecido não é adequada) Prepare uma Solução de Formaldeído 1% utilizando o Formaldehyde Dilution Buffer Set (PT-0006-100)

Pré-tratamento (desparafinação/proteólise)

- (1) Incubar lâminas 10 min. a 70°C (p.e., numa placa quente).
- (2) Incubar lâminas 2x 10 min in xilol.
- (3) Hidratar: etanol a 100%, 100%, 90%, e 70% ethanol, 5 min. cada
- (4) Lavar 2x 2 min. em água destilada ou desionizada
- (5) Incubar 15 min. em *Heat Pretreatment Solution Citric (PT1)*, pré-aquecida a 98°C.

Recomendamos a utilização de menos de 8 lâminas por tina.

- (6) Transferir lâminas rapidamente para água destilada ou desionizada, lavar 2x 2 min. e retirar da água.
- (7) Aplicar (conta-gotas) *Pepsin Solution (ES1)* diretamente na lâmina e incubar durante 15 min. a 37°C em câmara húmida.

Dependendo de múltiplos fatores, p.e., tipo e duração da fixação, espessura dos cortes, assim como o tipo de tecidos/células, podem ser necessários tempos diferentes de incubação. Recomendamos, como referência, tempos de incubação entre 2 a 30 min. para tecidos e 2 a 15 min. para amostras citológicas. O tempo de incubação deve ser otimizado em testes prévios.

- (8) Lavar 5 min. em *Wash Buffer SSC (WB1)*.

Opcional, quando efetuado passo de pós-fixação:

Incubar lâminas 15 min. em Solução de Formaldeído 1% e lavar de seguida 5 min. em Wash Buffer SSC (WB1)

- (9) Lavar 1 min. em água destilada ou desionizada.
- (10) Desidratação: etanol a 70%, 90%, e 100%, 1 min. cada
- (11) Secar lâminas ao ar.

Nota: Assegurar que os cortes secam completamente antes da aplicação da sonda, uma vez que a existência de resíduos podem reduzir a intensidade dos sinais e/ou afetar a morfologia do tecido.

Desnaturação e hibridação

- (1) Pipetar 10 μl de *ZytoLight SPEC ERBB2/CEN 17 Dual Color Probe (PL8)* em cada lâmina.

Evitar exposição prolongada da sonda à luz.

- (2) Cobrir as amostras com lamela 22 mm x 22 mm (evitar bolhas) e selar.

Recomendamos a utilização de cola (p.e., Fixogum Rubber Cement) para selar.

- (3) Colocar as lâminas em placa quente ou hibridador para desnaturar, durante 10 min. a 75°C.
- (4) Transferir as lâminas para câmara húmida e hibridar *overnight* a 37°C (p.e., num hibridador).

É fundamental que as amostras não sequem durante a hibridação.

12.2 Dia 2

Passos preparatórios

- (1) Preparar *1x Wash Buffer A*: Diluir 1 parte *25x Wash Buffer A (WB2)* em 24 partes de água destilada ou desionizada. Encher três finas de coloração com *1x Wash Buffer A* e pré-aquecer a 37°C.
- (2) *DAPI/DuraTect-Solution (MT7)*: trazer para temperatura ambiente antes de utilizar e proteger da luz.

Pós-hibridação e deteção

- (1) Remover cuidadosamente a cola.
- (2) Retirar a lamela em *1x Wash Buffer A* a 37°C durante 1-3 min.
- (3) Lavar em *1x Wash Buffer A* a 37°C, 2x 5 min.

O 1x Wash Buffer A deve estar pré-aquecido. Verificar temperatura com termómetro, se necessário.

- (4) Incubar lâminas em etanol a 70%, 90% e 100%, 1 min. cada
- (5) Secar lâminas ao ar, protegidas da luz.
- (6) Pipetar 25 μl *DAPI/DuraTect-Solution (MT7)* por lâmina. Cobrir a amostra com lamela (24 mm x 60 mm), evitando a formação de bolhas. Incubar no escuro durante 15 min.

A utilização de uma ponta de pipeta cortada para aumentar o diâmetro da mesma, antes de pipetar, facilita a aplicação do reagente. Evitar a exposição do reagente à luz.

- (7) Arquivar a lâmina no escuro. Para arquivo de longa duração guardar a lâmina entre 2-8°C.
- (8) A avaliação das amostras deve ser efetuada num microscópio de fluorescência. São necessários conjuntos de filtros com as seguintes características:

Fluorocromo	Excitação	Emissão
ZyGreen	503 nm	528 nm
ZyOrange	547 nm	572 nm

13. Interpretação dos resultados

Com a utilização dos filtros adequados, os sinais de hibridação da sonda surgem a verde (região gene ERBB2) e laranja (CEN 17).

Situação normal: Em interfaces de células normais ou em células sem amplificação envolvendo a região do gene ERBB2, são visíveis dois sinais verdes e dois sinais laranja (ver Fig. 2).

Situação anormal: Em células com amplificação da região do gene ERBB2 é visível um aumento dos sinais específicos verdes ou aglomerados de sinais verdes (ver Fig. 2).

Sinais sobrepostos podem surgir como sinais amarelos.

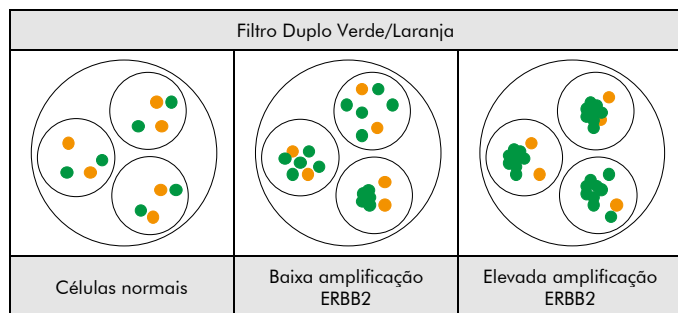


Fig. 2: Resultados esperados em núcleos normais e anormais

Poderá ser observada outra distribuição de sinal em algumas amostras anormais, que poderá resultar num padrão de sinal diferente do referido acima, indicando reorganizações variantes. Os padrões de sinal inesperados devem ser investigados.

Nota:

- Devido à cromatina descondensada, os sinais FISH individuais podem surgir como pequenos conjuntos de sinais. Assim, dois ou três sinais da mesma dimensão, separados por uma distância ≤ 1 ao diâmetro de um sinal, deverão ser considerados como um sinal.
- Não avaliar núcleos sobrepostos.
- Não contabilizar núcleos sobre-digeridos (reconhecidos pelas áreas escuras visíveis no interior dos núcleos)
- Não contabilizar núcleos com autofluorescência forte, o que afeta o reconhecimento de sinais.
- Um resultado negativo ou não específico pode ser causado por vários fatores (ver Capítulo 17).
- De forma a interpretar corretamente os resultados, o utilizador deve validar este produto antes da utilização em procedimentos de diagnóstico, de acordo com as diretivas nacionais e/ou internacionais.

14. Procedimentos do controlo da qualidade recomendados

De forma a monitorizar o desempenho correto das amostras processadas e dos reagentes, cada teste deve ser acompanhado de controlos internos e externos. Caso os controlos internos e/ou externos não demonstrem uma coloração adequada, os resultados das amostras dos pacientes devem ser considerados inválidos.

Controlo interno: células não neoplásicas na amostra que apresentem um padrão de sinal normal, por ex.: fibroblastos.

Controlo externo: amostras de controlo positivo e negativo validadas.

15. Características de desempenho

Precisão: a localização de hibridação da sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de um indivíduo do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas a sonda hibridou somente nos loci esperados. Não foram observados sinais adicionais ou hibridações cruzadas. Assim, a precisão foi calculada como sendo de 100%.

Sensibilidade analítica: para avaliação da sensibilidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Todos os núcleos mostraram o padrão de sinais esperado em todas as amostras testadas. Assim, a sensibilidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

Especificidade analítica: para avaliação da especificidade analítica, a sonda foi avaliada em proliferações de metáfase de indivíduos do género masculino de cariótipo normal. Em todas as amostras testadas, todos os sinais hibridaram apenas nos loci alvo esperados e em nenhum outro loci. Assim, a especificidade analítica foi calculada como sendo de 100%.

16. Eliminação

A eliminação de reagentes deve ser realizada de acordo com as normas locais.

17. Resolução de problemas

Qualquer desvio relativamente às instruções de utilização pode conduzir a resultados de coloração inferiores ou a ausência total de coloração.

Sinais fracos ou ausência de sinais

Causa possível	Ação
Sem sequências-alvo disponíveis	Utilizar os controlos adequados
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixador ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual do ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit
Pré-tratamento de calor, proteólise, desnaturação, hibridação ou temperatura de lavagem de estringência incorretas	Verificar a temperatura de todos os dispositivos técnicos utilizados com um termómetro calibrado
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Evaporação da sonda	Quando utiliza um hibridador, a utilização de faixas húmidas/tanques com água é obrigatória. Quando utiliza uma estufa de hibridação, é necessária a utilização de uma câmara de humidade. Adicionalmente, as lamelas devem estar perfeitamente seladas, por ex.: com Fixogum, para evitar a secagem da amostra durante a hibridação
Tampão de lavagem de estringência com concentração demasiado baixa	Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência
Soluções de desidratação antigas	Preparar soluções de desidratação novas
Microscópio de fluorescência incorretamente ajustado	Ajustar corretamente
Conjuntos de filtros inadequados	Utilizar conjuntos de filtros adequados para os fluorocromos da sonda. <i>Os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla permitem menos luz, comparados com os conjuntos de filtros de passagem de banda dupla ou passagem simples. Consequentemente, os sinais podem surgir mais fracos utilizando os conjuntos de filtros de passagem de banda tripla</i>
Dano causado por exposição das sondas/fluoróforos	Realizar a hibridação e as fases de lavagem numa sala escura

Sinais de hibridação cruzada; perturbações de fundo

Causa possível	Ação
Desparafinação incompleta	Utilizar soluções novas; verificar a duração da desparafinação
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina
Volume da sonda por área demasiado elevado	Reduzir o volume da sonda por secção/área, distribuir a sonda por gotas para evitar a concentração local
Lâminas arrefecidas à temperatura ambiente antes da hibridação	Transferir rapidamente as lâminas para 37°C

Tampão de lavagem de estringência demasiado concentrado	Verificar a concentração do tampão de lavagem de estringência
Temperatura de lavagem após a hibridação demasiado baixa	Verificar a temperatura; aumentar se necessário
Desidratação das amostras entre as fases de incubação individual	Evitar a desidratação selando as lâminas e realizando a incubação num ambiente húmido

Morfologia do tecido degradada

Causa possível	Ação
Amostra de tecido ou de células indevidamente fixada	Otimizar o tempo de fixação e o fixativo ou aplicar uma fase de pós-fixação conforme descrito no "procedimento de teste" do manual do <u>ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit</u>
Pré-tratamento proteolítico executado de forma incorreta	Otimizar o tempo de incubação da pepsina, aumentar ou reduzir conforme necessário
Secagem insuficiente antes da aplicação da sonda	Prolongar a secagem ao ar

Núcleos sobrepostos

Causa possível	Ação
Espessura inadequada das secções de tecido	Efetuar secções de micrótomo de 2-4 μm .

Amostra desliza da lâmina

Causa possível	Ação
Revestimento inadequado da lâmina	Utilizar lâminas adequadas
Pré-tratamento proteolítico demasiado forte	Reduzir o tempo de incubação da pepsina

Coloração de contraste fraca

Causa possível	Ação
Solução DAPI de baixa concentração	Utilizar <u>DAPI/DuraTect-Solution (ultra)</u> (Prod. No. MT-0008-0.8)
Tempo de incubação da solução DAPI demasiado curto	Ajustar o tempo de incubação da solução DAPI

18. Literatura

- Baselga J, et al. (1999) *Semin Oncol* 26: 78-83.
- Brunello E, et al. (2012) *Histopathology* 60: 482-8.
- Brunner K, et al. (2010) *Anal Quant Cytol Histol* 32: 78-89.
- Cochet A, et al. (2012) *J Nucl Med* 53: 512-20.
- Coussens L, et al. (1985) *Science* 230: 1132-9.
- Ettl T, et al. (2012) *Hum Pathol* 43: 921-31.
- Ettl T, et al. (2012) *Br J Cancer* 106: 719-26.
- Fasching P, et al. (2011) *BMC Cancer* 11: 486.
- Haas M, et al. (2011) *Virchows Arch* 458: 403-11.
- Hillig T, et al. (2012) *APMIS* 120: 1000-7.
- Humbert O, et al. (2012) *Ann Oncol* 23: 2572-7.
- Hwang CC, et al. (2011) *Histopathology* 59: 984-92.
- Hynes NE & Stern DF (1994) *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-84.
- Jäger M, et al. (2009) *Cancer Res* 69: 4270-6.
- Kievits T, et al. (1990) *Cytogenet Cell Genet* 53: 134-6.
- Lang D, et al. (2008) *Diagn Pathol* 3: 49ff.
- Lehmann-Che L, et al. (2011) *Br J Cancer* 104: 1739-46.
- Ly M, et al. (2012) *Oncology* 83: 257-63.
- Moelans CB, et al. (2011) *Crit Rev Oncol Hematol* 80: 380-92.
- Oliveira-Costa JP, et al. (2011) *Diagn Pathol* 6: 73.
- Park JB, et al. (1989) *Cancer Res* 49: 6605-9.
- Parris TZ, et al. (2010) *Clin Cancer Res* 16: 3860-74.
- Perrone G, et al. (2012) *PLoS One* 7: e43110.
- Popescu NC, et al. (1989) *Genomics* 4: 362-6.
- Sassen A, et al. (2008) *Breast Cancer Res* 10: R2.
- Sassen A, et al. (2009) *Breast Cancer Res* 11: R50.
- Schindlbeck C, et al. (2010) *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 1029-37.
- Slamon DJ, et al. (1987) *Science* 235: 177-82.
- Vollmann-Zwerenz A, et al. (2010) *Cytometry Part A* 77: 387-99.
- Voutsas IF, et al. (2013) *Int J Radiat Biol* 89: 319-25.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, *Oxford University Press* (1992) ISBN 0 19 963327 4.

Os nossos especialistas estão disponíveis para responder às suas questões.

Contacte helptech@zytovision.com



ZytoVision GmbH
Fischkai 1
27572 Bremerhaven/ Alemanha
Telefone: +49 471 4832-300
Fax: +49 471 4832-509
www.zytovision.com
E-mail: info@zytovision.com

Marcas registadas:

ZytoVision® e ZytoLight® são marcas registadas da ZytoVision GmbH.