

Validação das reações de hibridização *in situ* cromogênica para detecção de DNA e RNA em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina

Validation of chromogenic in situ hybridization reactions for DNA and RNA detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue

Raquel L. Monteiro; Daniela S. Damaceno; Lidia M. Kimura; Cinthya S. Cirqueira; Juliana M. Guerra; Leonardo José T. Araújo

Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) é uma alternativa aos métodos tradicionais imuno-histoquímicos para diagnóstico de doenças infecciosas em amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina, visto que apresenta grande sensibilidade e especificidade. Esse tipo de amostra sofre diversas modificações químicas durante o processamento histológico, e tanto a má fixação quanto a fixação em excesso podem prejudicar a qualidade das amostras, inviabilizando bons resultados. Na CISH, é comum a utilização de amostras positivas como controle de qualidade das reações; entretanto essa prática não fornece nenhuma informação a respeito da preservação do material genético, nem evita resultados falso-negativos nas amostras testadas. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi realizar a validação das sondas comerciais para ácido desoxirribonucleico (DNA) (+) e (-) e ácido ribonucleico (RNA) (+) e (-), para serem utilizadas como controle de qualidade, avaliando a preservação do material genético nas amostras testadas. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 12 cortes histológicos (em quadruplicata, $n = 48$), confeccionados a partir de um pool de tecidos sem alterações microscópicas relacionadas com processos infecciosos e/ou inflamatórios. O protocolo de CISH foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante e padronizado conforme as condições do nosso laboratório, utilizando sondas comerciais de DNA e RNA quimicamente ligadas à digoxigenina. **Resultados e conclusão:** Nossos resultados foram muito satisfatórios, demonstrando alta reprodutibilidade, acurácia, sensibilidade e especificidade analítica, bem como altos valores preditivos para ensaios positivos e negativos e com proporção nula de resultados falso-negativos e falso-positivos, o que possibilitou a validação dessa reação.

Unitermos: hibridização *in situ*; controle de qualidade; patologia molecular.

ABSTRACT

Introduction: Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) is used alternatively to the traditional immunohistochemical methods for the diagnosis of infectious diseases in formalin-fixed paraffin-embedded samples, since it presents high sensitivity and specificity. This type of sample undergoes several chemical modifications during histological processing, and both poor and excessive fixation can impair sample quality, making it difficult to obtain good results. In CISH, it is common to use positive samples as quality control for the reactions; however, this practice does not provide any information regarding the preservation of the genetic material, nor does it avoid false-negative results. **Objective:** The objective of this study was to validate the deoxyribonucleic acid (DNA) (+) and (-), and ribonucleic acid (RNA) (+) and (-) control probes to be used as quality control for the samples, evaluating preservation of the genetic material. **Materials and methods:** Twelve histological sections were used (in quadruplicate, $n = 48$), prepared from a pool of tissues without microscopic changes related to infectious and/or inflammatory processes. The CISH protocol was conducted according to the manufacturer's instructions, standardized under the conditions of our laboratory, using commercial DNA and RNA probes chemically linked to digoxigenin. **Results and conclusion:**

Our results were very satisfactory, showing high reproducibility, accuracy, sensitivity and analytical specificity, high predictive values for positive and negative assays and with zero ratio of false-positive and false-negative results, allowing the validation of this reaction.

Key words: *in situ* hybridization; quality control; molecular diagnostic techniques.

RESUMEN

Introducción: La hibridación *in situ* cromogénica (CISH) es una alternativa a los métodos tradicionales inmunohistoquímicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas en muestras fijadas en formol y embebidas en parafina, puesto que tiene alta sensibilidad y especificidad. Este tipo de muestra sufre diversas modificaciones químicas durante el procesamiento histológico, y tanto la mala fijación cuanto la fijación excesiva pueden perjudicar la calidad de las muestras, impidiendo buenos resultados. En la CISH, es común el empleo de muestras positivas para control de calidad de reacciones; sin embargo, esta práctica no proporciona ninguna información acerca de la preservación del material genético. **Objetivo:** El propósito de este estudio ha sido realizar la validación de las sondas comerciales para ácido desoxirribonucleico (ADN) (+) y (-) y ácido ribonucleico (ARN) (+) y (-), para que sean utilizadas como control de calidad, evaluando la preservación del material genético en las muestras testadas. **Material y métodos:** Se incluyen en el estudio 12 cortes histológicos (en cuadruplicado, n = 48), confeccionados a partir de un pool de tejidos sin alteraciones microscópicas relacionadas con procesos infecciosos y/o inflamatorios. El protocolo de CISH se desarrolló de acuerdo a las instrucciones del fabricante y bajo las condiciones del nuestro laboratorio, haciendo uso de sondas comerciales de ADN y ARN químicamente ligadas a digoxigenina. **Resultados y conclusión:** Nuestros resultados han sido muy satisfactorios, demostrando alta reproducibilidad, exactitud, sensibilidad, y especificidad analítica, así como altos valores predictivos para ensayos positivos y negativos, y con proporción nula de falsos negativos y falsos positivos, lo que ha permitido la validación de esa reacción.

Palabras clave: hibridación *in situ*; control de calidad; patología molecular.

INTRODUÇÃO

A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) é capaz de localizar seqüências específicas de ácidos nucleicos em seções histológicas por ligar-se a uma seqüência de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA) acoplada a uma molécula repórter.

Essa ferramenta metodológica permite obter informações espaciais e temporais sobre a expressão gênica e os loci genéticos, com base em fases nas quais uma sonda é sintetizada, marcada, purificada e hibridizada para a seqüência-alvo específica. A grande vantagem em relação aos resultados obtidos é a quantidade de informações adquiridas pela visualização dos resultados diretamente no tecido. A CISH em biópsia de tecidos tornou-se procedimento de rotina em laboratórios de anatomia patológica: a técnica é aplicada ao estudo de estrutura, expressão e caracterização genética⁽¹⁻⁶⁾. Nesse contexto, o Núcleo de Patologia Quantitativa do

Centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) é responsável pela condução de testes moleculares para diagnosticar doenças de interesse da saúde pública (Decreto Estadual número 55.601, de 22 de março de 2010) e atualmente usa a CISH no estudo de doenças infecciosas como as causadas pelos vírus Epstein-Barr, citomegalovírus e papilomavírus humano.

Tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina passam por várias modificações durante o processamento histológico, e tanto a má fixação quanto a fixação em excesso podem prejudicar a qualidade da amostra e os resultados gerais dos estudos moleculares⁽⁷⁾. Na CISH é comum o uso de amostras positivas como indicadores de qualidade das reações; entretanto, elas não são capazes de determinar a qualidade das amostras, revelada pela preservação do material genético, a fim de evitar resultados falso-negativos.

Por isso, o objetivo deste estudo foi validar a técnica da CISH para as sondas de DNA (+), DNA (-), RNA (+) e RNA (-) para

serem usadas como controle de qualidade, com o intuito de analisar a preservação do material genético das amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Para este estudo, foram usados 12 cortes histológicos (em quadruplicata, n total = 48) em lâminas histológicas silanizadas de 3 μ m, obtidos de um *pool* de tecidos (cérebro, baço, pulmão e fígado) sem alterações microscópicas relacionadas a processos infecciosos e/ou inflamatórios, fixados em formalina tamponada 10%. Essas eram amostras de reposição, que foram processadas para rotina anatomopatológica e incluídas neste estudo após o fim do período de guarda do material de acordo com os critérios de temporalidade estabelecidos pelo Instituto. Estas amostras são provenientes de diferentes pacientes falecidos e por isso justificou a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido [(CTC) IAL 11J-2017; CEP 2.439.900)].

Sondas

Foram usadas sondas positivas conjugadas com digoxigenina para detecção de DNA (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha – Ref. T-1022-100), que miram as sequências repetitivas Alu humanas, e para detecção de RNA (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha – Ref. T-1020-100), cujo alvo é o RNA ribossômico 28S. Além disso, sondas negativas de DNA (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha – Ref. T-1023-100) e RNA (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha – Ref. T-1119-400), que contêm uma sequência de nucleotídeos com 40%-70% de guanina-citosina (GC), sem consenso para alguma sequência natural, foram usadas a fim de verificar a presença de ligações não específicas, que causariam coloração de fundo.

Kit CISH

Para essa padronização, o kit de implementação Zytofast Plus CISH HRP-DAB (Zytovision, Bremerhaven, Alemanha – Ref. T-1063-40) foi utilizado.

Pré-hibridização

Os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em etanol. Procedeu-se ao bloqueio de peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 6% (Quimesp Química, Guarulhos, Brasil) em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) (v/v)

por 10 min, seguido de digestão enzimática por pepsina em câmara úmida a 37° por 10 min e pré-tratamento por imersão em solução pré-tratamento a 95° por 15 min, em banho-maria.

Desnaturação e hibridização

Sondas RNA e DNA positivas (+) e negativas (-) de 10 μ m foram aplicadas aos cortes, que foram recobertos com lamínulas seladas. A desnaturação ocorreu a 75° por 5 min; a hibridização, a 37° por 21 h no hibridizador automático (Dako, Glostrup, Dinamarca).

Detecção e revelação

Após o período de hibridização, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas foram lavadas em solução salina Tris tamponada (TBS). Após a lavagem, foram aplicados 20 μ m de anticorpo murino antidigoxigenina a cada lâmina, que então foi incubada a 37° por 60 min em câmara úmida. Três lavagens foram feitas em TBS, que precederam a aplicação de 20 μ l do anticorpo antimurino, ligado a um polímero com peroxidase de rábano (HRP), e as lâminas foram incubadas a 37° por 90 min em câmara úmida. Em seguida foram feitas três lavagens em TBS e revelação com 50 μ l de solução de diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram incubadas a 37° por 10 min, lavadas em água destilada e contracoradas com hematoxilina.

Padronização do método de análise

Depois de terminada a reação, as lâminas foram analisadas por três patologistas e um analista. O critério de positividade foi a visualização de um precipitado marrom no núcleo para marcação de DNA, e no núcleo e no citoplasma das células teciduais para marcação de RNA. As amostras sem descrição de precipitado marrom nos componentes celulares por algum dos profissionais foram consideradas negativas.

Para efeito de análise, as reações foram divididas em dois grupos, de acordo com o alvo (DNA ou RNA), que foram analisados separadamente. Esses grupos, por sua vez, foram subdivididos em amostras positivas e negativas, de acordo com a sonda utilizada.

Acurácia intermediária (intraensaio) ou repetibilidade

As reações foram conduzidas em dias diferentes, e para calcular a acurácia intermediária (repetibilidade) foi usada somente a análise descritiva dos resultados observados.

Sensibilidade analítica (Se [%])

Com o objetivo de avaliar a habilidade da reação em detectar a sequência específica de ácidos nucleicos, quando usando uma sonda positiva, a seguinte fórmula foi usada: $Se = VP/(VP + FN)$, onde VP (verdadeiro positivo) é o número de resultados positivos nas amostras onde sondas positivas foram usadas, e FN (falso negativo) é o número de resultados negativos onde sondas positivas foram usadas.

Especificidade analítica (E [%])

Com o objetivo de avaliar a habilidade de a reação não detectar a sequência específica de ácidos nucleicos, quando usando uma sonda negativa, a seguinte fórmula foi usada: $E = VN/(VN + FP)$, onde VN (verdadeiro negativo) é o número de resultados negativos em amostras onde sondas negativas foram usadas, e FP (falso-positivo) é o número de resultados positivos em amostras onde sondas negativas foram usadas.

Estudo do valor preditivo para um resultado de teste positivo (VPP [%])

A fim de estudar a probabilidade de uma amostra com CISH positiva para certo ácido nucleico realmente ter a presença do ácido nucleico, a seguinte fórmula foi usada: valor preditivo positivo (VPP) = $VP/(VP + FP)$, onde VP é o número de resultados positivos em amostras onde sondas positivas foram usadas, e FP é o número de resultados positivos em amostras onde sondas negativas foram usadas. Para o cálculo de proporção de resultados falso-positivos, a seguinte fórmula foi usada: (pFP) = 1 - especificidade.

Estudo do valor preditivo para um resultado de teste negativo (VPN [%])

A fim de estudar a probabilidade que uma amostra com CISH negativa para certo ácido nucleico realmente tem de apresentar o ácido nucleico, a seguinte fórmula foi usada: valor preditivo negativo (VPN) = $VN/(VN + FN)$, onde VN é o número de resultados negativos em amostras onde sondas negativas foram usadas, e FN é o número de resultados negativos em amostras onde sondas positivas foram usadas. Para o cálculo da proporção de resultados falso-negativos, a seguinte fórmula foi usada: (pFN) = 1 - sensibilidade.

Acurácia (A [%])

Para avaliar o grau de correspondência entre os resultados obtidos pela CISH em relação aos resultados esperados, por

exemplo, positivos em presença de sondas positivas e negativas em presença de sonda negativa para ácidos nucleicos, a seguinte fórmula foi usada: $A = (VP + TN)/N$.

RESULTADOS

Em todas as lâminas onde sondas positivas para detecção de DNA (**Figura 1**) ou RNA (**Figura 2**) foram aplicadas, foi possível observar um precipitado marrom em diferentes cortes histológicos. Por outro lado, nas lâminas onde as sondas negativas para detecção de DNA ou RNA foram aplicadas, não foi observado precipitado nem contracoloração, indicando a ausência de reações cruzadas.

Os resultados obtidos para cada sonda estão descritos na **Tabela**. Tanto para sondas de DNA quanto de RNA, positivas e negativas, é possível observar 100% de concordância ($n = 24$) nos resultados entre os diferentes dias das reações, o que demonstra a repetibilidade apropriada do método.

Os resultados das reações de CISH para ambos os ácidos nucleicos demonstraram 100% de sensibilidade, especificidade analítica e acurácia. Do mesmo modo, os valores preditivos para ensaios positivos e negativos foram 100%, enquanto a proporção de ensaios falso-negativos e falso-positivos foi zero.

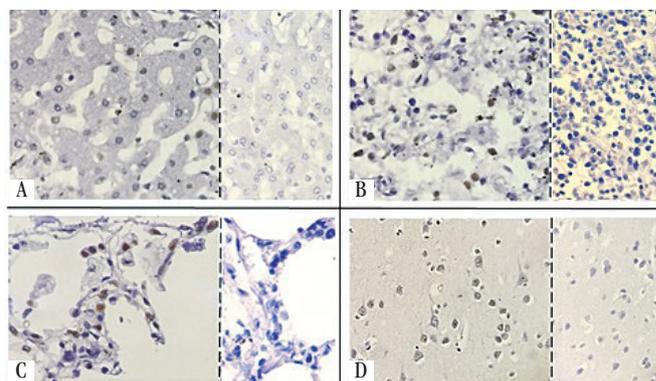


FIGURA 1 – Reações CISH para detecção de DNA. Fotomicrografia de reação CISH para DNA A) fígado; B) baço; C) pulmão; D) cérebro; ampliação 40x. É possível observar o precipitado marrom no núcleo celular resultante da reação enzimática do DAB com a peroxidase do complexo anticorpo ligado ao híbrido formado entre a sequência-alvo e a sonda nas reações com a sonda positiva (direita) em comparação com as reações com a sonda negativa (esquerda)

CISH: hibridização in situ cromogênica; DNA: ácido desoxirribonucleico; DAB: diaminobenzidina.

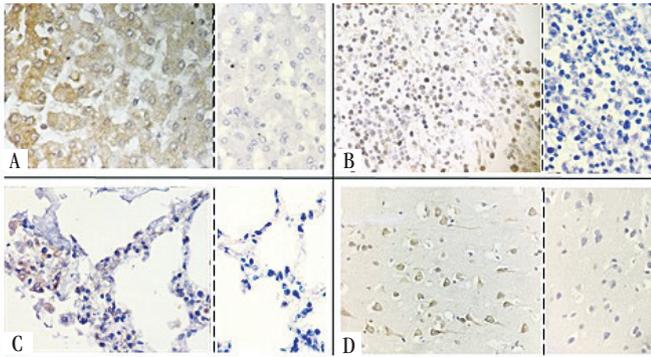


FIGURA 2 – Reações de ISH para detecção de RNA. Fotomicrografia de reação de CISH para RNA ribossômico 28S

A) fígado; B) baço; C) pulmão; D) cérebro; ampliação 40×. É possível observar o precipitado marrom em núcleo e citoplasma celulares resultante da reação enzimática do DAB com a peroxidase do complexo de anticorpos ligado ao híbrido formado entre a sequência-alvo e a sonda nas reações com a sonda positiva (direita) em comparação com as reações com a sonda negativa (esquerda).

ISH: hibridização *in situ*; CISH: hibridização *in situ* cromogênica; RNA: ácido ribonucleico; DAB: diaminobenzidina.

TABELA – Reações de hibridização *in situ* cromogênica para detecção de DNA e RNA com sondas complementares

	Resultados				
	DNA (+)	DNA (-)	RNA (+)	RNA (-)	
Sondas	DNA (+)	12	0	-	-
	DNA (-)	0	12	-	-
	RNA (+)	-	-	12	0
	RNA (-)	-	-	0	12
Total	12	12	12	12	

Por meio desses resultados, calculamos sensibilidade e especificidade analíticas, valor preditivo para resultados de teste positivos e negativos, proporção de resultados falso-negativos e falso-positivos, além de acurácia.

DNA: ácido desoxirribonucleico; RNA: ácido ribonucleico; +: resultados positivos; -: resultados negativos.

DISCUSSÃO

A CISH permite o uso de tecidos fixados em formalina incluídos em parafina para o monitoramento individual de genes em células dentro do tecido observado usando sondas de DNA ou RNA complementares à sequência de interesse⁽⁸⁻¹⁰⁾. As técnicas biomoleculares, como CISH, são usadas como alternativas aos métodos imuno-histoquímicos tradicionais e como ferramenta

complementar para diagnosticar doenças infecciosas, uma vez que apresentam maiores sensibilidade e especificidade^(9, 10). Entretanto, para o sucesso da técnica, é necessário que o tecido tenha sido apropriadamente fixado, o que permite tanto a preservação do material genético quanto de sua citoarquitetura. A fixação em formalina induz a ligação cruzada de ácido nucleico com proteínas e outros constituintes celulares, tornando difícil a ligação às sondas complementares^(11, 12). Portanto, a etapa de recuperação, que precede a ligação com a sonda, torna-se muito importante, pois permite a quebra de algumas dessas ligações.

Vários outros fatores podem afetar a qualidade dos ácidos nucleicos em tecidos parafinizados, como pH do fixador, tempo de fixação do tecido, período de tempo anterior à fixação da amostra⁽¹³⁾, já que a autólise começa assim que a amostra é removida⁽¹⁴⁾. Além disso, as condições de acondicionamento de tecidos fixados em formalina embebidos em parafina e o método usado na extração também devem ser levados em conta⁽¹³⁾.

No contexto dos exames de CISH, em laboratórios de rotina, nem sempre é possível ter controle sobre a fixação do tecido a ser analisado. Portanto, é impossível saber se um resultado negativo para uma sonda em particular se deve à ausência da sequência-alvo nas células ou à degradação do tecido, o que torna impossível hibridizar a sonda. No segundo caso, material genético mal conservado pode significar resultados falso-negativos, com grande impacto no diagnóstico e na conduta clínica. Essa é a razão pela qual é importante usar sondas de controle para detecção de DNA ou RNA, a depender do alvo primário a ser atingido. Portanto, nossos resultados demonstraram que sondas positivas e negativas para DNA e RNA podem ser empregadas na rotina como controles de qualidade das amostras, validando os resultados negativos em todas as condições que têm CISH como ferramenta diagnóstica.

CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que este protocolo para CISH – DNA e RNA – obteve resultados muito satisfatórios, com alta reprodutibilidade, acurácia, sensibilidade e especificidade analíticas, valores preditivos altos para ensaios positivos e negativos, com proporção nula de resultados falso-positivos e falso-negativos, possibilitando a padronização da reação para uso na rotina.

REFERÊNCIAS

1. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, Isola J. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *American J Pathol.* 2000; 157(5): 1467-72.
2. Daniele L, Macri L, Schena M, et al. Predicting gefitinib responsiveness in lung cancer by fluorescence in situ hybridization/chromogenic in situ hybridization analysis of EGFR and HER2 in biopsy and cytology specimens. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6(4): 1223-9.
3. Gould BR, Damgaard T, Nielsen BS. Chromogenic in situ hybridization methods for microRNA biomarker monitoring of drug safety and efficacy. *Methods Mol Biol.* 2017; 1641: 399-412.
4. Wang J, Yu Y, Li G, Shen C, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients. *J Hepatol.* 2017. Pii: S0168-8278(17)32261-4.
5. Husain N, Neyaz A. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: controversies and new concepts. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2017; 7(3): 198-205.
6. Ren MW, Du Y, Ren S, Tang CY, He JF. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs in idiopathic orbital inflammatory pseudotumor tissues: a comparative case series. *Int J Ophthalmol.* 2017; 10(8): 1268-72.
7. Chung MJ, Lin W, Dong L, Li X. Tissue requirements and DNA quality control for clinical targeted next-generation sequencing of formalin-fixed, paraffin-embedded samples: a mini-review of practical issues. *J Mol Genet Med.* 2017; 11(262): 1747-0862.
8. Langdale JA. In situ hybridization. In: Freeling M, Walbot V, editors. *The Maize Handbook.* New York: Springer; 1994. pp. 165-80.
9. Mckinney MD, Moon SJ, Kulesh DA, Larsen T, Schoepp RJ. Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *J Clin Virol.* 2009; 44: 39-42.
10. Haas DJ, Torres ACD. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. *Rev Científica de Medicina Veterinária.* 2016; ano XIV(26).
11. Patel PG, Selvarajah S, Guérard KP, et al. Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. *PLoS One, Italy.* 2017; 12(6): e0179732.
12. Seiler C, Sharpe A, Barrett JC, Harrington EA, Jones EV, Marshall GB. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? *BMC Clinical Pathology, UK,* 2016. Available at: https://www.researchgate.net/publication/310543864_Nucleic_acid_extraction_from_formalin-fixed_paraffin-embedded_cancer_cell_line_samples_a_trade_off_between_quantity_and_quality. [Accessed on: 2017, Jul 24].
13. Landolt L, Marti HP, Beisland C, Flatberg A, Eikrem OS. RNA extraction for RNA sequencing of archival renal tissues. *Scand J Clin Lab Invest.* 2016; 76(5): 426-34.
14. Bostjan JK, Hosnjak L, Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenol Alp Pannonica Adriat.* 2015; 24(3): 47-53.

AUTOR CORRESPONDENTE

Leonardo José Tadeu de Araújo  0000-0002-5427-4053
e-mail: biomedleonardo@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.