
Aplicação da técnica de hibridização “in situ” para auxílio diagnóstico e prognóstico em amostras histológicas

Lidia Midori KIMURA, Suely NONOGAKI, Neuza Kasumi SHIRATA

Núcleo de Patologia Quantitativa, Centro de Patologia – Instituto Adolfo Lutz

A hibridização “in situ” (ISH) é uma técnica molecular que se baseia no pareamento e na ligação dos nucleotídeos de uma sonda específica complementar a uma sequência-alvo do DNA ou do RNA em amostras histológicas e citológicas. A sonda utilizada pode ser marcada por radioisótopos (mais sensíveis) ou substâncias não isotópicas como enzimas, fluoróforos, biotina ou digoxigenina (mais estáveis)^{1,2}.

O objetivo dessa técnica é determinar a presença ou a ausência de sequências específicas de DNA ou RNA nas amostras para identificar sítios cromossômicos, alguma particularidade celular do espécime estudado, a presença de vírus, parasitas e bactérias e visualizar as alterações morfológicas associadas às suas ações. A identificação da sequência dentro das células é estabelecida pelas propriedades fundamentais dos ácidos nucleicos, suas habilidades de anelamento com uma ou outra sequência específica para formação de híbridos, podendo ocorrer combinações entre DNA-DNA, DNA-RNA e RNA-RNA^{2,3}.

Antes de iniciar a reação da ISH propriamente dita, é necessária correta aquisição e preparo, a fixação e o processamento histológico adequado da amostra, que são fases pré-analíticas importantes para obtenção de resultados de qualidade, ou seja,

a garantia de boa preservação da sua morfologia e a eficiente hibridização da sonda^{1,2,3}.

A sensibilidade da ISH é considerada mais alta em amostras de tecidos congelados quando comparada com as fixadas e incluídas em parafina. A fixação deverá ser realizada de maneira a preservar de forma adequada os aspectos morfológicos das células e dos ácidos nucleicos. Podem ser utilizados blocos de parafina que foram arquivados há vários anos para estudos retrospectivos desde que os aspectos anteriormente mencionados tenham sido preservados^{1,2,3}.

A etapa inicial da ISH consiste na proteólise com o uso de enzimas como a pepsina e a proteinase K, seguida da desnaturação do ácido nucleico em temperaturas elevadas, que podem variar de 60 a 80°C. Em seguida, é realizada a hibridização com sondas de DNA ou RNA (em temperaturas que variam de 37° a 60°C). Após a hibridização, o anelamento das sondas é detectado por técnicas de autorradiografia ou reações de imuno-histoquímicas, conforme o tipo de marcador utilizado (fluoróforos, enzimas, biotina, digoxigenina)^{2,3,4}.

As sondas utilizadas para detecção de DNA ou RNA, idealmente com 50 a 300 pares de bases, devem considerar, principalmente, a especificidade, a eficiência e a facilidade de penetração no tecido.

As sondas utilizadas podem ser^{2,3,4}:

- DNA dupla fita: geradas por clonagem e amplificação de sequências específicas de DNA ou cDNA, derivados da transcriptase reversa do mRNA.
- RNA fita simples (riboprobos): geradas por transcrição do RNA a partir do DNA, utilizando a RNA polimerase. Os híbridos RNA-RNA são mais estáveis que os DNA-DNA e DNA-RNA.
- DNA fita simples: gerada através da PCR, são de alta especificidade e mais estáveis que as geradas por clonagem, não necessitam de desnaturação.
- Oligonucleotídeos sintéticos: são os mais acessíveis, possuem de 15-50 pares de bases geradas por um sintetizador automático. Por terem sequências curtas, os híbridos podem ser facilmente desligados em lavagens pós-hibridização, resultando falsos negativos.
- Oligoprobos podem ser gerados a partir de um molde de DNA ou a combinação de uma fita simples de oligonucleotídeos com um bacteriófago.

Para garantir a qualidade do procedimento, faz-se necessário o uso de controles positivo e negativo do procedimento e uma amostra positiva para a sequência em estudo. Para o controle negativo, pode-se utilizar uma sonda com uma sequência não específica e para o positivo, uma sonda que demonstre a integridade de algum componente celular na amostra estudada. Para o controle positivo da sequência em estudo, pode-se utilizar uma amostra conhecida que tenha apresentado positividade por alguma outra metodologia. A interpretação dos resultados deverá ser feita mediante a avaliação crítica do padrão de positividade associadas às alterações histológicas e às informações clínicas⁵.

Vários estudos têm aplicado essa metodologia para diagnóstico e prognóstico de neoplasias cervicais provocadas pelo papiloma vírus humano (HPV),

além de outros vírus DNA como citomegalovírus, herpes simplex vírus, Varicella zoster, Epstein-Barr vírus, adenovírus etc. Muitos desses vírus citados podem ser detectados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), mas a ISH pode demonstrar a localização precisa nos tecidos estudados^{4,6}.

Concluimos que com os modernos refinamentos técnicos e a disponibilidade de várias sondas comerciais, a hibridização “in situ” torna-se uma prática rotineira, tanto na pesquisa como nos diagnósticos laboratoriais. É um método poderoso para a localização de DNA ou RNA em células ou micro-organismos, podendo contribuir na elucidação de vários diagnósticos, na compreensão dos processos patológicos e estudos epidemiológicos de muitas doenças.

REFERÊNCIAS

1. Segalés J, Ramos-Vara JA, Duran O C, Porter A, Domingo M. Diagnosing infectious disease using in situ hybridization. *Swine Health Prod.* 1999; 7(3):125-8.
2. Henriksen U, Müller S, Schonau A. Dual color CISH and FISH to CISH conversion. *In: Education Guide. Immunohistochemical (IHC) staining methods.* 5ª ed. Dako North America, Inc. Carpinteria, CA USA. 2009; p.97-101.
3. Silva MG, Almeida FCA, Antonio LFM, Libório TN, Acquafreda T, Casal C, Ferraz A, Nunes FD. Hibridização “in situ” com sonda não radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2006; 42(3):207-13.
4. Gulley ML, Glaser SL, Craig FE et al. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2002; 117-259-67.
5. Torlabovic EE, Riddell R, Banerjee D et al. Canadian Association of pathologists – Association Canadienne des Pathologistes National Standards Committee/immunohistochemistry. Best Recommendations for Standardization of Immunohistochemistry Tests. *Am Clin Pathol* 2010; 133-354-65.