

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

EVALUACIÓN FINAL CURSO DE MÉTODOS

COORDINADOR DEL CURSO: DR. ROBERTO STOCK

ALUMNA: BLANCA RAMOS CERRILLO

TEMA: HIBRIDACIÓN *in situ*

ÍNDICE

I. Introducción	1
II. Breve historia	1
III. Pasos y consideraciones de la hibridación <i>in situ</i>	2
IV. Preparación de la sonda	4
a) Diseño de sondas	5
b) Tipo de sonda y método de síntesis	5
c) Elección de la sonda	6
d) Tamaño de la sonda	6
e) Estabilidad de la sonda	7
f) Sondas de doble cadena contra las de cadena sencilla	7
V. Marcaje	7
a) (³ H) Tritio	7
b) ³⁵ S	8
c) ³² P	8
d) ³³ P	8
e) Marcaje con digoxigenina	8
f) Marcaje con biotina	9
g) Marcaje fluorescente de ácidos nucleicos	11
h) Métodos de marcaje para:	
i) DNA	12
ii) RNA	13
iii) Oligonucleótidos	13
VI. Preparación de tejidos	14
a) Fijación	14
b) Tejido embebido y su seccionamiento	15
VII. Tratamiento de la laminilla	15
VIII. Pretratamiento del tejido	16
a) Tratamiento con solventes orgánicos	16
b) Tratamiento con proteasas para facilitar la accesibilidad al RNA de interés	16
c) Inactivación endógena enzimática	17
d) Tratamiento con RNasas	17
e) Tratamiento con HCL	17
f) Tratamiento con detergentes	17

g) Impedimento de enlaces	17
h) Pre-hibridación	17
i) Blancos del DNA	17
IX. Pre-hibridación y desnaturalización de la sonda y su blanco	18
X. Hibridación	18
a) Largo de la sonda	20
b) Composición de la sonda	20
c) Identidad	20
d) Composición de la solución de lavados de la hibridación	20
e) Desnaturalización del DNA	21
f) pH	21
g) Temperatura	21
XI. Lavados post-hibridación	23
XII. Detección	23
a) Sondas radioactivas	23
<i>i)</i> Grados de la emulsión	24
<i>ii)</i> Espesor de la emulsión	24
<i>iii)</i> Almacenamiento y vida media de la emulsión	24
<i>iv)</i> Condiciones de exposición	24
<i>v)</i> Tiempo de exposición	24
<i>vi)</i> Condiciones para revelarla	24
b) Sondas marcadas con haptenos	24
XIII. Técnicas de doble tinción	25
XIV. Controles	26
a) Hibridación cruzada con secuencias de ácidos nucleicos inespecíficos	26
b) Enlaces inespecíficos	26
c) Generación inespecífica de la señal	27
d) Ruido de fondo sobre tejidos específicos	27
e) Ruido de fondo de sondas marcadas con haptenos	27
XV. Fotografía	28
XVI. Microscopía	28
a) De campo claro	28
b) De campo oscuro	29
c) De contraste de fases	29
d) Microscopía de contraste de reflexión	29
e) De fluorescencia	29

f) Imágenes digitales	29
g) Microscopía electrónica	29
h) Flujo citométrico	29
XVII. Algunas otra técnicas: PRINS	30
a) Principios y métodos de <i>in situ</i> PCR	30
b) Amplificación <i>in situ</i>	30
c) Detección de productos de PCR en la célula	30
d) Eficiencia de PCR <i>in situ</i>	31
e) PCR <i>in situ</i> tiene una gran número de aplicaciones en diagnóstico	31
f) Controles para PCR <i>in situ</i>	32
XIX. Comparación de las técnicas de hibridación <i>in situ</i>	34

Abreviaturas

A	Adenina
AP	Fosfatasa alcalina
BCIP	5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato
Bio	biotina
BrdU	5-bromo-4-cloro-3-indolid fosfato
C	citosa
cDNA	DNA complementario
DAB	diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindole
DEPC	dietilpirocarbonato
DIG	digoxigenina
DMSO	dimetilsufóxido
DNasa	deoxiribonucleasa
dsDNA	doble cadena de DNA
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenoaminotretacético
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluorescencia <i>in situ</i>
FLU	Fluoresceína
G	Guanina
mRNA	mRNA
NTB	4-nitroblue-tetrazolium chloride
PBS	buffer fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldeído
RNasa	ribonucleasa
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
ssDNA	cadena sencilla de DNA
STS	sitio de pegado de la secuencia
T	timina
TBE	tris-borato-EDTA
TBS	tris buffer salino
TE	tris-EDTA
TEMED	tetrametilenediamina
TESPA	3-aminopropiltriétoxissilina
T _m	Temperatura de fusión
T _r	Temperatura de reasociación
tRNA	RNA de transferencia
U	uracilo
UV	luz ultravioleta

Índice de tablas y figuras

	Pág.
Figura 1. Principios de la hibridación <i>in situ</i>	1
Figura 2. Diagrama de flujo de la hibridación <i>in situ</i>	3
Figura 3. Estructura química de la digoxigenina	8
Figura 4. Estructura química de la biotina	9
Tabla 1. Ventajas y desventajas de sistemas de marcaje	11
Figura 5. Estructura química de la fluoresceína	12
Tabla 2. Ventajas y desventajas entre las sondas de hibridación	20
Tabla 3. Aplicaciones de la hibridación <i>in situ</i>	32
Tabla 4. Controles requeridos para experimentos de hibridación	33

I. Introducción.

Hibridación *in situ* es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados.

La detección *in situ* provee una visualización directa de la localización espacial de secuencias específicas que es crucial para dilucidar la organización y función génica, por lo que el método de hibridación *in situ* se ha convertido en una técnica importante en diversos campos, incluyendo diagnóstico de rearrreglos cromosomales, detección de infecciones virales y análisis de la función génica durante el desarrollo embrionario.

La hibridación *in situ* toma como fundamento la complementariedad de los ácidos nucleicos, la cual puede ser DNA y/o RNA, a través de puentes de hidrógeno formados entre las bases: adenina-timina (DNA) o uracilo (RNA) y citosina-guanina (DNA y RNA). Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una cadena, tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5' a 3'.

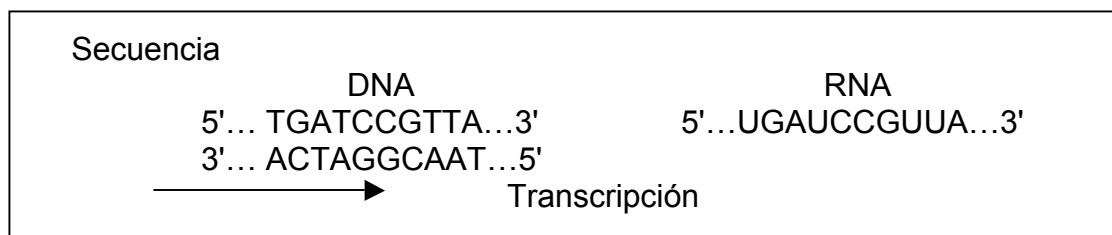


Figura 1. Principios de la hibridación *in situ*. La relación entre la doble cadena de DNA y su transcrito a RNA. El DNA genómico consiste de dos cadenas complementarias, A aparea con T y G con C en orientación opuesta (5' a 3' y 3' a 5'). La transcripción usa la cadena líder como templado y genera una secuencia idéntica de RNA.

II. Breve historia

La técnica fue desarrollada en 1969 por Gall y Pardue e independientemente por Jonh et al., en el mismo año. Gall y colaboradores describieron una técnica que formaba híbridos moleculares entre RNA y DNA. La técnica se llevó a cabo en ovocitos de *Xenopus laevis*, hibridando rRNA con rDNA extracromosomal. Detectaron la localización diferencial en las células, de los híbridos de ácidos nucleicos ha distintos estadíos. En ese momento la única forma de marcaje eran los radioisótopos, por lo que se usó tritio para el experimento y la forma de detección fue por autoradiografía. Demostraron que en ciertas partes como tejido conectivo, la técnica no era suficientemente sensible para mostrar las cantidades pequeñas de rDNA en un genoma. Esto lo llevaron a cabo exponiendo las preparaciones por periodos más allá de dos meses. Evaluaron variables de la técnica que afectan el rendimiento de la hibridación, haciendo hincapié en un paso fundamental que se debe llevar a cabo para realizar la técnica: la desnaturalización.

Plantearon que el híbrido puede reabsorberse en el soporte que utilizaron (agar) y esto puede fungir como impedimento para que se lleve a cabo la reacción. Finalmente propusieron mejorar la técnica, pese a las limitaciones

de ese momento, incrementando el rendimiento con el uso de RNA sintetizado *in vitro*, es decir preparándolo enzimáticamente, usando como templado el rDNA satélite de *Xenopus*.

Además el clonaje molecular no era posible en ese tiempo y la hibridación *in situ* se restringió a aquellas secuencias que pudieran ser purificadas y aisladas por métodos bioquímicos y resolver problemas como localización citológica del DNA.

Vale la pena resaltar que estos experimentos arrojaron información valiosa que contribuyó a perfeccionar la técnica y poderla aplicar en varios campos.

El clonaje molecular de ácidos nucleicos y el mejoramiento de las técnicas de marcaje radioactivo han cambiado el panorama dramáticamente. Por ejemplo Harper et al., en 1981 detectó en cromosomas metafásicos el gen de la insulina. El método de detección fue la autorradiografía. En 1985 Coghlan sintetizó oligonucleótidos marcados radioactivamente para detección. Este mismo investigador en 1986 detectó citológicamente un bajo número de copias de mRNAs.

La alta sensibilidad que provee la prueba (de 20 a 50 copias de secuencias blanco/célula), así como el rango tan grande de aplicaciones dió pie a que muchos laboratorios adoptaran la técnica; aunque uno de los principales

problemas que enfrentaba la hibridación *in situ* era el tipo de marcaje (radioactivo) y el tiempo requerido para la detección (autorradiografía). Con el tiempo ésto fue cambiando, desarrollando otro tipo de marcaje de los ácidos nucleicos dejando de lado al mayor impedimento para la aplicación general de la hibridación *in situ*, lo cual abrió nuevas oportunidades para emplear distintos marcajes en un experimento. La estrategia actual es utilizar un sistema de detección con anticuerpos aumentando la accesibilidad de la prueba.

III. Pasos y consideraciones para la hibridación *in situ*.

La técnica involucra:

- a) Generación de ácidos nucleicos marcados para una detección subsecuente.
- b) Fijación de tejidos (seccionados), preparación de cromosomas.
- c) Preparación del tejido para incrementar el acceso del ácido nucleico marcado.
- d) Hibridación de la sonda marcada en cromosomas o tejidos.
- e) Lavados selectivos que remuevan las sondas que no hibridan.

f) Detección de la sonda marcada, revelando la localización celular de los ácidos nucleicos.

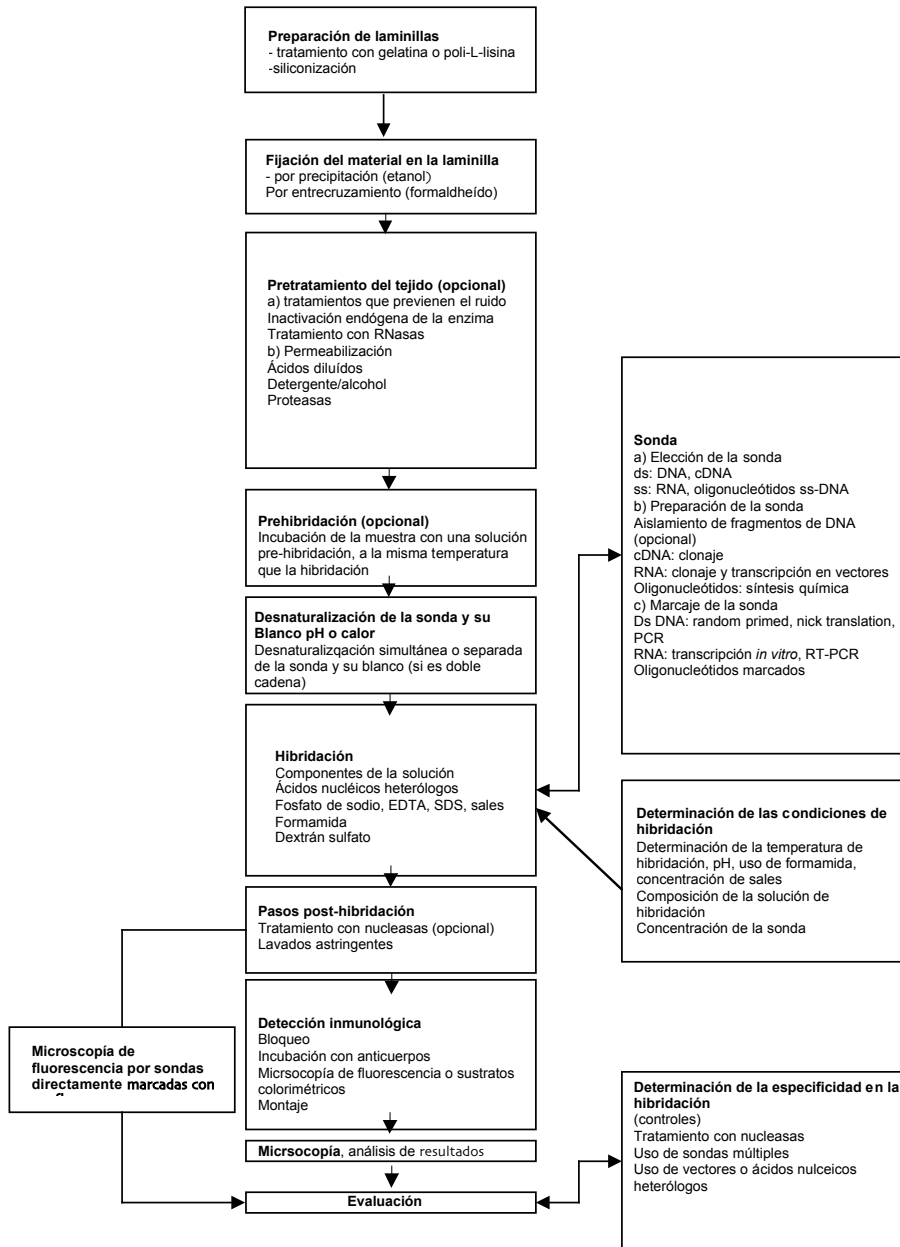


Figura 2. Diagrama de flujo de la hibridación *in situ*.

Este método puede ser combinado con PCR para amplificar las secuencias de pegado y aumentar la detección de la señal. Un aspecto crítico en éste método es que los ácidos nucleicos que están retenidos *in situ* no deben de ser degradados por nucleasas, para que sea posible la hibridación de la sonda.

Actualmente existen varias alternativas para elegir el tipo de sonda y los métodos de marcaje y detección.

Las alternativas mayormente usadas son:

- a) Sondas de RNA, sondas de DNA (cadena doble o sencillo) u oligonucleótidos
- b) Marcas radioactivas o haptenos
- c) Marcajes directos e indirectos

La detección del método depende de lo que se requiera:

a) Sensibilidad. Depende del fácil acceso que tenga la sonda marcada, la cantidad y tipo de marca incluída en la sonda y el método de detección.

b) Resolución. La resolución de la señal puede variar de sitios específicos en una célula, lo cual depende de la sonda marcada y del método de detección.

c) Especificidad. La especificidad de la señal depende de la selectividad del lavado y de secuencias similares que interfieran en el pegado de la sonda.

d) Análisis de secciones celulares o de tejidos montados en laminillas o secciones de tejidos que se encuentren en solución, tejidos enteros o embriones.

e) Detección múltiple de genes o productos génicos. La relación física entre genes o regiones cromosomales pueden ser visualizadas por el uso de distintas marcas fluorescentes para la detección simultánea de distintos productos génicos en una célula o tejido.

f) Programas computacionales. Estos pueden ayudar a la visualización de modelos espaciales de transcritos en un tejido o embrión. Se pueden llevar a cabo modelos tridimensionales.

g) Conveniencia y seguridad. Las marcas no radioactivas son más estables, seguras y rápidas.

IV. Preparación de la sonda.

Para sondas de cadena sencilla, se debe usar la secuencia reversa complementaria. Cuando las sondas son sintetizadas por transcripción, involucra generar mRNA del gen endógeno. Cuando se diseñan los oligos marcados, es importante recordar que la secuencia antisentido es la hebra complementaria reversa de la cadena líder y debe ser leída de 5' a 3'.

En general es preferible usar sondas específicas, ya que esto garantiza una buena hibridación. Existen situaciones en las cuales esto no puede llevarse a cabo, por ejemplo, si los genes todavía no están clonados de las especies

usadas para la hibridación o si la secuencia génica es muy similar entre especies. Esto puede favorecer una hibridación entrecruzada. Para evitar esto, se requiere una alta selectividad que reduzca la presencia de bases mal apareadas, aumentando de esta manera la especificidad. Si los modelos de expresión son los mismos, como se pueden ver con una sonda homóloga, es un experimento alentador, aunque no prueba la especificidad. Esto puede ser probado por un Northern o un Southern-blot. La hibridación entrecruzada provee información preliminar muy valiosa.

a) El diseño de sondas se resume en los siguientes puntos:

i) La hibridación entrecruzada utiliza sondas largas (>100 pb) usadas bajo condiciones selectivas especialmente después de la digestión con nucleasas, ya que una sonda además de homóloga, debe ser lo suficientemente amplia para llevar a cabo la hibridación.

ii) Para sondas pequeñas (oligonucleótidos de 20-30 pb) es muy probable que algún gen distinto al de interés tenga una secuencia idéntica. Alternativamente se puede hacer un screening y éste puede ser realizado por búsqueda de secuencias en bases de datos.

iii) Los mRNA poseen las secuencias poli(T) y poli(U), al transcribirse a cDNA se evita que la sonda no incluya esta cola, porque secuencias largas, ricas en GC dan una gran estabilidad a la sonda por los triples enlaces que se forman entre estas bases.

Se necesitan dos elecciones más para la preparación de la sonda: el tipo de ácidos nucleicos y la marca que se incorpora en la sonda. Algunos métodos alternativos están disponibles para la síntesis de la sonda.

b) Tipo de sonda y método de síntesis. Distintos tipos de sondas de ácidos nucleicos pueden ser utilizadas para la hibridación *in situ*:

i) Sondas de DNA doble cadena. Pueden ser preparadas utilizando técnicas como “nick translation, random priming o PCR”, en las cuales el nucleótido marcado es incorporado. PCR y random priming proporcionan una buena actividad específica. Estas sondas pueden ser desnaturalizadas antes de usar. Cuando se usan para detectar una cadena simple como mRNA, estas son menos sensibles debido a que la concentración de la sonda marcada es reducida.

ii) Sondas de DNA de cadena simple (largas). Pueden ser preparadas utilizando “primer extension” en templados de cadena simple o por PCR con un nucleótido marcado. Éste último es el más usado porque es más fácil de llevar a cabo y las marcas pueden sintetizarse con poca cantidad de material. El PCR permite una gran flexibilidad en la elección de las secuencias marcadas por el uso de primers. Estas marcas han sido ampliamente usadas.

iii) Oligonucleótidos (entre 20 y 40 bases). Son marcados incorporando oligonucleótidos modificados durante la síntesis química o adicionando una cola marcada. Una de las desventajas es que algunos oligonucleótidos marcados no se incorporan y por tanto la sensibilidad disminuye.

iv) Sondas de RNA de cadena sencilla. Pueden ser sintetizadas por el uso de una RNA polimerasa (SP6, T7 o T3 RNA polimerasa). La secuencia de la sonda es clonada en un vector que flanqueará dos sitios distintos de iniciación.

La cadena de RNA antisentido (sonda) es sintetizada en dirección opuesta al gen endógeno. Se recomienda linearizar la sonda de RNA con enzimas que dejen el extremo 5' cohesivo, por que se ha reportado, que el extremo 3' como promueve la síntesis de transcritos anormales.

c) Elección de la sonda. Las sondas largas de cadena simple (RNA o DNA) proporcionan una alta sensibilidad en la detección de cadena sencilla. Los oligonucleótidos son muy sensibles y la señal puede ser incrementada por el uso de un cocktail de sondas que flanquearán en regiones distintas.

Para estudios de mRNAs estrechamente relacionados, las sondas específicas, pueden ser obtenidas por síntesis de oligonucleótidos. Se diseñan primers que serán usados para la amplificación del fragmento deseado de DNA en el PCR. Estos fragmentos pueden ser clonados y usados para sintetizar cadenas dobles o sencillas de DNA o RNA. Alternativamente, para el caso de sondas de RNA, pueden ser marcadas directamente sin clonación incluyendo el primer marcado en el sitio de iniciación de la RNA polimerasa.

Finalmente las sondas de DNA de doble cadena son recomendadas para blancos de doble cadena y esto puede ser suficientemente sensible para detectar abundancia de cadena sencilla.

d) Tamaño de la sonda. Las sondas largas pueden emitir una señal más fuerte debido a que incorporan mayor número de nucleótidos marcados dentro de ella. Sin embargo, las sondas que son tan largas dan señales débiles, debido a que la sonda penetra menos eficientemente en el tejido. La mejor estrategia es usar una secuencia larga como templado para la síntesis de la sonda pero asegurar que la sonda generada es lo suficientemente pequeña para poder penetrar. Muchos procedimientos están basados en que la sonda de 50-150 bases porque emiten señales óptimas para la hibridación en secciones de ciertos tejidos (Cox, 1984.). Se ha encontrado que las sondas de RNA que miden por arriba de 1 kb proveen señales óptimas para la hibridación *in situ*, en embriones fijados en paraformaldeído. La penetración está influenciada por el tamaño de la sonda aunque también depende de la naturaleza del tejido, de la forma de fijación y si el pretratamiento ha sido realizado para remover las proteínas celulares.

El tamaño de la sonda puede ser controlado durante la reacción de síntesis:

i) Sondas de DNA, sintetizadas por "nick translation", el largo está determinado por la cantidad de DNasa en la reacción.

ii) Sondas marcadas por "random priming" el tamaño está determinado por la concentración del primer.

iii) Primers que puedan ser elegidos para determinar el tamaño de la sonda sintetizada por PCR.

iv) Sondas largas de DNA pueden ser cortadas parcialmente por incubación a altas temperaturas.

v) Sondas largas de RNA son parcialmente cortadas por hidrólisis alcalina limitada. Si el tamaño de la sonda es cortada por hidrólisis hay que revisar el tamaño de la sonda, porque si ésta es muy pequeña, ésta no hibridará bajo condiciones selectivas standard, dando una baja señal.

e) Estabilidad de la sonda y la interacción con su blanco. En experimentos de hibridación los puentes entre la sonda y la secuencia blanco juega un rol importante. El largo decreta la estabilidad en el siguiente orden RNA-RNA, DNA-RNA, DNA-DNA (Wetmur et al., 1986). La estabilidad de los híbridos está influenciada por las condiciones de hibridación, por la concentración de formamida, sales y la temperatura.

f) Sondas de doble cadena contra cadena sencilla. Un número de reacciones competentes ocurren durante la hibridación *in situ* con sondas de doble cadena. Las sondas de cadena sencilla proveen las siguientes ventajas:

i) La sonda no se agota porque no se autoliga.

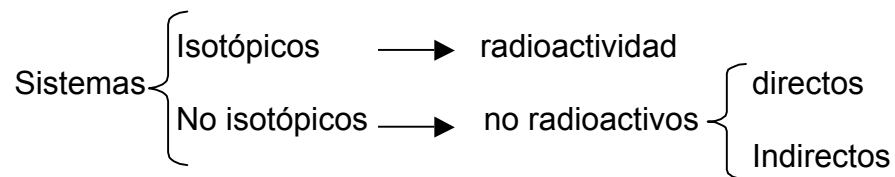
ii) No son cadenas largas porque deben penetrar en la sección de tejido o en los cromosomas.

Con DNA-DNA la renaturalización *in situ* de secuencias blanco se lleva a cabo eficientemente porque los híbridos tienen una estabilidad térmica similar. La renaturalización *in situ* de DNA puede ser impedida por el uso de sondas de RNA de cadena sencilla.

Los híbridos DNA-RNA son más estables térmicamente que los híbridos DNA-DNA. Las condiciones de hibridación pueden ser diseñadas de tal manera que la formación del híbrido DNA-DNA no sea favorecido, pero el híbrido DNA-RNA sí.

V. MARCAJE

Existen dos alternativas para que el marcaje sea incorporado dentro de la sonda: el marcaje radioactivo que es detectado por autorradiografía, o por haptenos (no radioactivo) el cual es detectado directa o indirectamente por inmunocitoquímica.



Los sistemas isotópicos ofrecen una alta sensibilidad, particularmente con tritio, así como alta resolución. Por otro lado el empleo de radiosiótopos

requieren licencia especial. El método de detección (autorradiografía) requiere un tiempo de exposición de semanas.

Algunos isótopos han sido usado para marcajes radiocativos en la hibridación *in situ*, que difieren en cuanto a la resolución de la señal, la velocidad en obtención de resultados y la estabilidad de la sonda.

a) ^3H - proporciona una señal a nivel subcelular pero requiere largas exposiciones autorradiográficas.

b) ^{35}S – proporciona resolución de un diámetro celular, con tiempos de exposición de una semana. Agentes reductores como el ditiotreitól (DTT) pueden ser incluidos en la solución que contenga ^{35}S para proteger al azufre de la oxidación. La vida media de este isótopo es de 87 días y la marca debe ser usada en un mes aproximadamente.

c) ^{32}P – da una resolución menor que el ^{35}S y además proporciona una baja eficiencia en la autorradiografía, ofrece una pequeña ventaja en cuanto a la velocidad de obtención de resultados. Posee una vida media de 14 días.

d) ^{33}P – da una resolución similar a ^{35}S , pero éste tiene una vida media más corta (25 días) y el costo es mayor.

Con el uso de sondas radioactivas es posible hacer un método cuantitativo.

Existen dos tipos de sistemas no isotópicos para la prueba de hibridación: directo e indirecto.

En el primero, la molécula detectable (reportera) es enlazada directamente al ácido nucleico y este híbrido puede ser visualizado en el microscopio inmediatamente después de la reacción de hibridación. El paso limitante en éste método es que el híbrido subsista a las condiciones de lavado.

Lo más importante, además, es que la molécula reportera no interfiera con la hibridación. El marcaje con un fluorocromo en pruebas de RNA desarrollada por Bauman et al., 1980, 1984, y el marcaje directo de ácidos nucleicos con enzimas, descrito por Renz y Kurz, 1984, siguen este criterio.

Los métodos indirectos requieren una marca que contenga la molécula reportera, introducida química o enzimáticamente, que pueda ser detectada por afinidad citoquímica. En este método al igual que el anterior, el marcaje no debe interferir con la hibridación, ya que la molécula reportera debe estar accesible a los anticuerpos que la detecten. Se han descrito un sin número de modificaciones a haptenos (Langer et al., 1981) y uno de los sistemas más populares es el sistema DIG (digoxigenina) el cual será descrito posteriormente.

Tiempo atrás se describió la síntesis química de oligonucleótidos conteniendo grupos funcionales (grupos sulfhidrilos, aminas primarias alifáticas). Con esto se pudo hacer reaccionar haptenos, fluorocromos o enzimas que producen un marcaje estable, el cual se utilizó para la hibridación *in situ* (Agrawal et al., 1986).

e) Marcaje con digoxigenina (DIG)

El método de marcaje con DIG está basado en un esteroide aislado de las plantas *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*. Las hojas y flores de estas plantas son la única fuente natural de digoxigenina.

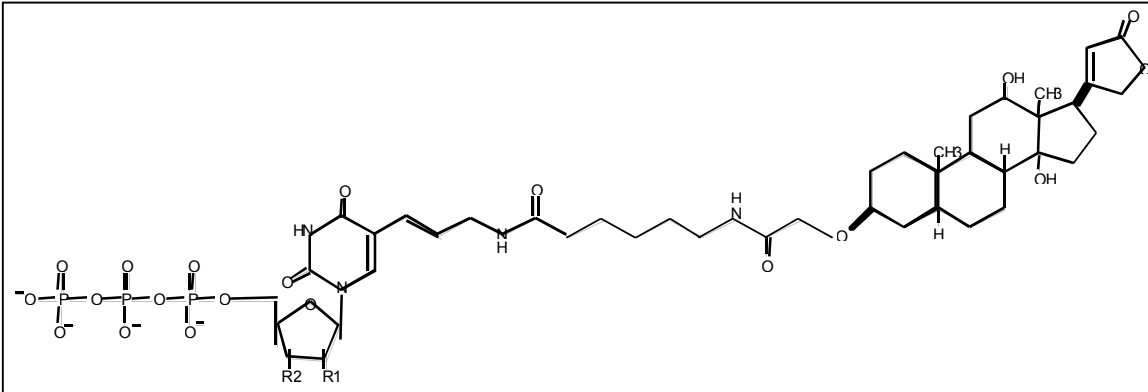


Figura 3. Digoxigenina-UTP/dUTP/DDUTP, alcali-estable. Digoxigenina-UTP (R1=OH, R2=OH). Digoxigenina-dUTP (R1=OH, R2=H) y Digoxigenina-ddUTP (R1=H, R2=H).

La digoxigenina se enlaza en la posición C5 de la uridina mediante un brazo que contiene 11 átomos de carbono. Los nucleótidos marcados con DIG pueden ser incorporados a las sondas de ácidos nucleicos por DNA polimerasas (*E. coli* DNA polimerasa I, T4 DNA polimerasa, T7 DNA polimerasa, reverso transcriptasa y Taq DNA polimerasa), al igual que RNA polimerasas (SP6, T3 O T7 RNA polimerasa) y transferencia terminal.

Los ácidos nucleicos pueden ser marcados químicamente con DIG-NHS ester o con DIG Chem-Link.

Las sondas DIG-marcadas pueden ser detectadas con una alta especificidad por anticuerpos anti-digoxigenina (Anti-DIG) que son conjugados a fosfatasa alcalina, peroxidasa, fluoresceína, rodamina u oro coloidal. Alternativamente, anticuerpos anti-digoxigenina primarios y secundarios pueden ser usados.

La sensibilidad de la detección depende del método usado para visualizar los anticuerpos anti-DIG conjugados. Cuando un anti-DIG conjugado a fosfatasa alcalina es visualizado por colorimetría (NTB y BCIP o 5 bromo, 4 cloro, 3-indolidfosfato nitro azul) o sustratos fluorescentes (HNPP), la sensibilidad de la detección es aproximadamente de 0.1 pg.

Las mezclas marcadas contenidas en los kits de marcaje con DIG relacionan a la uridina marcada con DIG a dTTP la cual produce una marca de hibridación altamente sensible. Esta relación produce una incorporación de 20 a 25 nucleótidos marcados con DIG al DNA.

f) Marcaje con biotina

El marcaje de ácidos nucleicos con biotina-dUTP (Figura 4) fue desarrollado por David Ward y colaboradores en la Universidad de Yale (Langer et al., 1981). Recientemente se han sintetizado otros nucleótidos biotinilados como adenosina biotinilado y citosín-trifosfatos (Gebeyehu et al., 1987). También se han implementado procedimientos fotoquímicos al igual que un número de

es el marcaje con haptenos. La seguridad es una consideración importante para la elección del método.

En la tabla 1 se muestran las ventajas y desventajas que tiene cada uno de los sistemas:

Tabla 1. Ventajas y desventajas de sistemas isotópicos y no isotópicos

	VENTAJAS	DESVENTAJAS
<p>Isotópicos (Marcaje con ^{35}S, ^3H, ^{33}P y ^{32}P)</p>	<p>Alta sensibilidad, fácil detección, eficiencia en el marcaje de la sonda que puede ser estimado rápidamente. Puede ser usada para cuantificación por conteo de granos de plata (^{35}S).</p>	<p>Equipo para uso de radioactividad, tiempo de exposición variable y la resolución es dependiente de marcaje. Los radioisotopos tienen una vida media relativamente corta. Se deben tener estrictos controles dentro de la prueba. Con frecuencia variabilidad en la eficiencia de la prueba.</p>
<p>No isotópicas (Biotina, digoxigenina, FITC, dinitrofenil, marcaje con fosfatasa alcalina o peroxidasa)</p>	<p>Buena sensibilidad, exposición no radiactiva, larga vida media de la sonda, reproducibilidad, buena resolución celular y morfología. Protocolos accesibles. Permanente retención del color.</p>	<p>Dificultad en detección de secuencias no repetitivas. Problemas con ruido de fondo en tejidos ricos de la molécula marcada (ej. biotina). Pasos adicionales para la detección. Dificultades en la cuantificación exacta de la molécula marcada.</p>

g) Marcaje Fluorescente de ácidos nucleicos

Los nucleótidos marcados con fluoresceína (Figura 5) son una alternativa de los marcajes radioactivos. Los análogos de nucleótidos marcados con fluoresceína pueden ser usados como sistemas directos e indirectos de la hibridación (Dirk et al., 1991; Wiegant et al., 1991).

La fluoresceína dUTP/UTP/ddUTP pueden ser incorporados enzimáticamente a los ácidos nucleicos de acuerdo a técnicas standard.

El marcaje con fluoresceína es un marcaje directo que no requiere detección inmunocitoquímica por lo que es necesario que haya un mínimo ruido de fondo. En general las desventajas de los métodos directos es que son menos sensibles que los métodos indirectos descritos anteriormente.

Alternativamente, los nucleótidos marcados con fluoresceína pueden ser detectados con un anticuerpo conjugado anti-fluoresceína o con un anticuerpo no conjugado o con un anticuerpo secundario contra fluoresceína. Otros nucleótidos marcados con fluorocromos, como tetrametil-rodamina-5-dUTP que emite en rojo están disponibles actualmente.

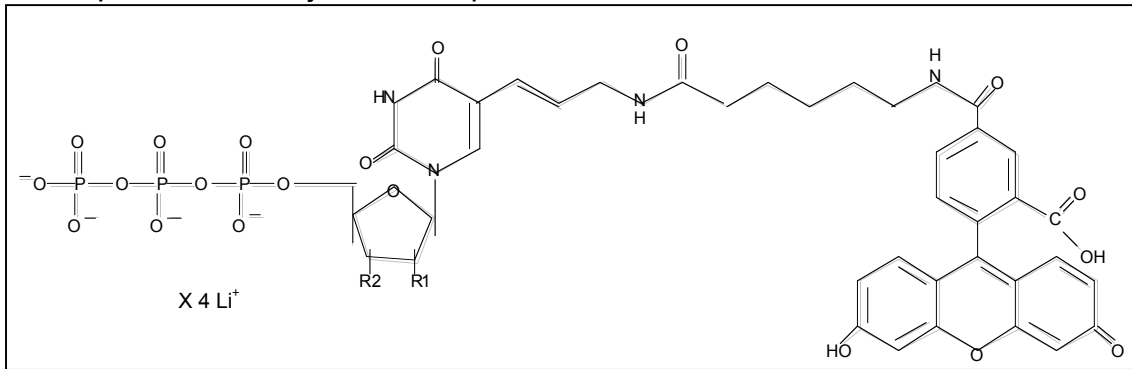


Figura 5. Estructura química de la fluoresceína dUTP

h) Métodos de marcaje para:

i) **DNA.** Las sondas preparadas por marcaje “random primed” son preferenciales para aplicaciones de blot por la alta tasa de incorporación de nucleótidos y la alta tasa de producción de sondas marcadas. En la reacción de marcaje por “random primed”, el templado de DNA es linealizado, desnaturalizado y un primer es incorporado. Inicia en el extremo 3'-OH del primer, por síntesis de Klenow. Se sintetiza una molécula de DNA a lo largo del sustrato de cadena sencilla.

El tamaño de la sonda es cerca de 200-1000 pb con la ayuda de reactivos premezclados y marcados (como DIG, biotina o fluoresceína) la reacción de “random primed” puede producir de 30-70 ng (por 10 ng de templado y una hora de incubación) de 2.10-2.65 µg (por 3 µg de templado y 20 horas de incubación) de una sonda de DNA no radioactiva.

En la reacción de “nick translation”, el templado de DNA puede ser superenrollado o linealizado. Después el DNA es cortado con DNasa I,

comienza la actividad de la exonucleasa de DNA-polimerasa I que va de 5' a 3' y se extiende desde la muesca hasta la siguiente muesca (nick-gap); entonces la polimerasa reemplaza los nucleótidos escindidos con nucleótidos marcados. La reacción produce óptimos marcajes después de 60 a 90 minutos. El tamaño de la sonda después de la reacción debe ser cerca de 200 a 500 pb.

Las sondas pueden ser preparadas por PCR. En éste, dos primers hibridan en los extremos del DNA y flanquean secuencias específicas, entonces una polimerasa termoestable (como la Taq polimerasa) elonga a los dos primers.

Una serie repetitiva de ciclos (desnaturalización, anclaje y extensión del primer) resulta en una acumulación exponencial de copias de la secuencia (cerca de millones de copias en 20 ciclos). La incorporación de nucleótidos marcados durante el PCR puede producir grandes cantidades de sonda marcada. El largo de la sonda amplificada está definida por el extremo 5' de los primers para el PCR. El PCR permite una fácil producción de sondas con tamaño óptimo.

Los tres métodos de marcaje de DNA permiten una gran flexibilidad considerando el largo de los fragmentos marcados. En las reacciones de "nick translation" el cambio en la concentración de DNasa altera la longitud del fragmento, en cambio la reacción de "random primed" es afectada por la concentración del primer y para el caso de PCR la secuencia de los primers controlan el tamaño del fragmento.

En los tres casos se produce una buena cantidad de sondas marcadas, muchas de las cuales tienen regiones complementarias sobrelapadas.

ii) RNA. Las sondas de RNA son generadas por transcripción *in vitro* de un templado linealizado. En este caso un promotor para la RNA polimerasa puede estar en el vector de DNA, SP6, T3 o T7 RNA polimerasa y son comúnmente usadas para la síntesis de la complementaria de RNA al DNA sustrato. El transcrito sintetizado es una copia exacta de la secuencia del promotor al sitio de restricción. El tamaño de la sonda puede ser ajustado mediante los sitios de restricción y de esta manera tener un control en el tamaño de todas las sonda de RNA. La cantidad de RNA marcado es cerca de 10 µg por 1µg de DNA.

iii) Oligonucleótidos. Oligonucleótidos sintéticos tienen algunas ventajas. Son sintetizados automáticamente, son pequeños y de cadena sencilla. Por su pequeño tamaño poseen una gran capacidad de penetración, la cual es considerada como uno de los factores más importantes de la hibridación *in situ*.

Por otro lado el tamaño del oligo puede ser una desventaja, porque usualmente flanquean menos blancos que las sondas de cDNA convencional. Recientes estudios han sugerido que la propiedad de penetración de la sonda compensa el número de blancos que quedan sin flanquear. Una de las

mayores ventajas que tiene este tipo de marcaje es que la cadena sencilla excluye la posibilidad de renaturalización.

Los oligonucleótidos pueden ser marcados directamente con un fluorocromo, con enzimas o con haptenos como biotina, o DIG, las cuales son visualizadas por afinidad citoquímica después de la hibridación. Algunas marcas pueden ser seguidas química o enzimáticamente.

El primer enfoque fue químico utilizando oligos sintéticos los cuales tenían aminas reactivas o grupos tioles, adicionados en el paso final de la síntesis automática. Después de la purificación, el oligonucleótido reactivo es modificado con un hapteno. Ejemplo: DIG-NHS o con moléculas reporteras.

La segunda aproximación química fue probar DIG o biotina y ver que no formaba una unión de tipo covalente coordinado.

Los protocolos enzimáticos utilizan deoxinucleotidil transferasa terminal, marcando enzimáticamente oligos sintéticos en el extremo 3'. Algunos métodos son ventajosos en cuanto a la producción de sondas a pequeña escala porque no requiere la síntesis y derivatización de oligos.

VI. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

El procedimiento para preparar tejidos está determinado por la naturaleza del mismo y los requerimientos específicos del experimento. Las células en cultivo de tejidos pueden ser crecidas directamente en soportes, en los cuales serán fijadas para posteriormente seccionarlos. Los puntos importantes para llevar a cabo la fijación del tejido son: el método de incrustación y evaluar el material de la superficie de pegado.

a) Fijación. Para preservar morfológicamente el material biológico debe ser fijado. La fijación es un paso crítico para obtener buenos resultados. Desde el punto de vista químico existen limitaciones en el tipo de fijación:

i) Los grupos funcionales involucrados en el apareamiento de las bases están protegidos por la estructura de DNA.

ii) El RNA es poco reactivo con agentes entrecruzantes

iii) La reacción es reversible con formaldheído

Para fijar cromosomas metafásicos, ésta se hace con metanol/ácido acético.

Para tejidos embebidos en parafina se usa la fijación con formalina.

Para secciones de tejido congelado (criostato) son fijadas con formaldheído 4% por 30 minutos o con solución Bovin Fix que ha dado resultados satisfactorios, al igual que la fijación por vapor de paraformaldheído.

Las fijaciones entrecruzadas, como por aldeídos, proporcionan facilidad en el acceso y retención de RNA que precipita en el fijado. Las condiciones para la fijación son un fuerte compromiso. Fijaciones fuertes permiten una buena preservación de la morfología celular, pero el incremento en el entrecruzamiento baja la accesibilidad al blanco. Lo comúnmente usado es

4% paraformaldheído, 4% formaldeído o 1% glutaraldeído, obteniendo una mayor tasa de entrecruzamiento. La solución de para formaldeído puede prepararse fresca o puede ser refrigerada a 4°C por dos semanas. El almacenaje prolongado favorece la formación de ácido fórmico, resultando en una fijación inadecuada. La fijación es llevada a cabo usualmente entre 0-4 °C inhibiendo de esta manera las endonucleasas endógenas. El tiempo de fijación depende del tamaño de la muestra; para células aisladas, 20 minutos es suficiente, para tejidos de hasta 1 mm de grosor, 2-3 horas son suficientes; para tejidos de hasta 0.5 cms, toda la noche es suficiente; para tejidos de mayor tamaño es necesaria la perfusión.

La fijación prolongada (3 ó 4 días) disminuye la intensidad de la señal.

Debe ser notado que las secuencias blanco de DNA y RNA están rodeadas de proteínas y que existe una interacción entre éstos que enmascaran los blancos buscados. Por otro lado el procedimiento de permeabilización es requerido.

Desafortunadamente un protocolo general de fijación que pueda ser usado para todos los sustratos no ha sido descrito. La fijación y el pretratamiento de tejidos debe ser optimizado para distintas aplicaciones.

b) Tejidos embebidos y su seccionamiento. El seccionamiento de los tejidos puede ser realizado en un criostato o embeber la muestra en una matriz para después cortarla con un microtomo. Excelentes resultados se han obtenido seccionando la muestra con el criostato y la ventaja de éste método es que permite la posibilidad de fijar después de seccionar. El seccionamiento de tejidos embebidos, tiene algunas ventajas, incluyendo una buena preservación en la morfología del tejido, al igual que los cortes finos de las secciones favorecen la orientación correcta y se pueden obtener rodajas seriadas al cortarlo. La parafina es el medio más popular para embeber tejidos, pudiendo obtener cortes menores a 1 µm. Posteriormente la parafina puede ser disuelta totalmente del tejido antes de la hibridación, empleando xileno e hidratando gradualmente con alcohol. Las secciones muy delgadas tienen la desventaja de que emiten poca señal. El grosor de las secciones usada comúnmente es de 6-10 µm. Ésto hace posible que las secciones puedan ser montadas en laminillas e hibridarlas en solución.

Los tejidos embebidos en plástico permiten cortar secciones delgadas como lo requiera la microscopía electrónica.

Los tejidos se congelan en nitrógeno líquido y se mantienen a -80°C, pueden ser seccionados desde 5 µm y fijados en acetona fría o 95% etanol por 30 minutos antes de la hibridación. Este método no es el más recomendable para la hibridación *in situ* porque la morfología de los tejidos no se conserva.

Todos las secciones deben ser puestas en laminillas de vidrio cubiertas con poli-L-lisina, con el fin de que la muestra tenga una adherencia adecuada y no se desprenda durante el procesamiento. De ésto de hablará más ampliamente en la siguiente sección.

Para hibridación *in situ* de RNA se deben utilizar guantes estériles al momento de cortar los bloques y cada vez que se haga un nuevo corte se

debe de cambiar la navaja por una nueva con el fin de reducir la contaminación por RNAsas.

VII. TRATAMIENTO DE LA LAMINILLA.

Las laminillas se tratan para que tengan la capacidad de adherir las células o tejidos y puedan ser retenidos durante los pasos subsecuentes de la hibridación *in situ*. Existen métodos distintos incluyendo el uso de cromo-alum gelatina, poli-L-lisina o aminopropiltriétoxissilina (TESPA). Se ha encontrado que este compuesto proporciona una fuerte adherencia. Alternativamente las laminillas se venden cargadas positivamente dando una buena adherencia.

VIII. PRE-TRATAMIENTO DEL TEJIDO.

Antes de la hibridación, el tejido debe tener un pretratamiento para que incremente la eficiencia de la hibridación y minimice los pegados inespecíficos:

a) Los tejidos o secciones son usualmente tratadas con solventes orgánicos (etanol o metanol) para permeabilizar las células removiendo las membranas lipídicas. Los tejidos que están embebidos en cualquier polímero, es necesario removerlo antes de la hibridación.

b) Tratamiento con proteasas para facilitar la accesibilidad al RNA de interés. La digestión con proteasas es un paso crítico; una digestión insuficiente o la sobredigestión puede afectar sustancialmente la intensidad de la señal así como la morfología. La digestión es seguida de una refijación, de lo contrario la desintegración del tejido ocurrirá. El tratamiento con proteasas mejora la señal obtenida de una sonda mayor a 100 pb (Wilkinson, 1999). El tiempo óptimo de tratamiento con proteasas debe ser determinado, ya que difiere entre distintos tejidos. Un problema de procesamiento de un ebrión entero es que las proteasas no penetran hasta los tejidos internos y por tanto la digestión es menos eficiente que en la superficie. Una alternativa a este problema es tratar al tejido con una mezcla de detergentes. Esto es más fácil de controlar pero es menos efectivo que el tratamiento con proteasas.

Las proteasas más utilizadas hoy en día para desenmascarar al mRNA blanco son la proteinasa K, pepsina, tripsina, pronasa E y colagenasas. Generalmente un procedimiento bueno es digerir las secciones desparafinadas por 15 a 30 minutos a 37 °C en 10 µg/ml de proteinasa K en 50 mM Tris/HCl, pH 7.5. El tiempo de digestión depende del tipo de tejido. La concentración de la enzima y la duración de la digestión debe ser ajustado empíricamente, dependiendo del tipo de tejido y duración de la fijación.

El control de la temperatura es una consideración importante. El reducir la temperatura de digestión inadvertidamente e incrementa el ruido de fondo y presenta variación dentro y entre especímenes. La digestión se puede llevar

a cabo en un baño a 37°C adicionandole la cantidad requerida de enzima, para posteriormente sumergir la laminilla donde esta fijada la muestra. El introducir la laminilla en la solución de digestión baja la temperatura del baño, entonces se tiene que esperar hasta que éste alcance 37 °C y a partir de ese momento se empieza a contar el tiempo de digestión. El proceso de digestión se para lavando la laminilla en una solución salina, la cual puede ser Tris-buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5; 150 mM NaCl).

Se ha demostrado que el uso de la pepsina ha dado excelentes resultados con secciones de tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina. La digestión con pepsina involucra la incubación de las preparaciones 30 minutos a 37°C en 200 mM HCl conteniendo 500 µg/ml de pepsina. La digestión puede pararse lavando las laminillas con Tris buffer salino (TBS) o buffer fosfato salino (PBS) a pH 7.5. El desenmascaramiento enzimático no es adecuado si se requiere una alta sensibilidad, como por ejemplo una detección de una copia simple del virus del papiloma 16 (HPV).

Algunas otras hidrolasas como la colagenasa y la dispasa pueden ser utilizadas si por ejemplo las preparaciones son de tejido conectivo o hígado pero éstas dan un alto ruido de fondo. También se han utilizado ciclos de congelamiento y descongelamiento para mejorar la penetración de la sonda en el tejido.

Algunos otros pre-tratamientos son:

c) Inactivación endógena enzimática. Cuando hay una enzima es usada como marca, la actividad enzimática endógena puede ser inactivada. Ejemplo, para el caso de peroxidasa la muestra es tratada con 1% peróxido de hidrógeno en metanol por 30 minutos. Para la fosfatasa alcalina, el levamisol puede adicionarse a la solución sustrato aunque esto no es necesario ya que la actividad residual de la fosfatasa alcalina se pierde durante la hibridación.

d) Tratamiento con RNAsas. Sirve para remover RNA endógeno y puede mejorar la señal en híbridos DNA-DNA. Este tratamiento puede ser usado como control en hibridaciones de mRNA. Se lleva a cabo incubando la preparación con RNAsa (100 µg/ml) en 2X SSC a 37°C por 1 hora. (SSC=150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio pH 7.4).

e) Tratamiento con HCl. En algunos protocolos se trata la muestra de 20 a 30 minutos con 200 mM HCl. La acción precisa que provoca el ácido es desconocida pero la extracción de proteínas y la hidrólisis parcial de las secuencias blanco puede contribuir a un mejoramiento en la señal.

f) Tratamiento con detergentes. Las preparaciones pueden ser pretratadas con tritón X-100, SDS u otro detergente si los componentes de la membrana lipídica no han sido extraídos por otros procedimientos como fijación, deshidratación, incrustación e inactivación endógena de la enzima.

g) Se pueden evitar enlaces de sondas no específicas con grupos amino cargados positivamente por acetilación de estos residuos con ácido acético anhidro o trietanolamina.

h) Para llevar a cabo la hibridación de tejidos enteros se tiene que hacer una prehibridación. Ésta contiene todos los componentes de la hibridación excepto la sonda y el dextrán sulfato. Esto se hace con el fin de bloquear sitios de enlace no específicos. Para secciones tisulares, la deshidratación es realizada gradualmente (70, 80, 95 y 100%) y la sonda es absorbida. Se han encontrado que los pasos de prehibridación no son necesarios para secciones tisulares. El problema que genera la prehibridación es que diluye la sonda, decrementando la señal.

i) Para los blancos de DNA de doble cadena, se desnaturaliza con calor.

Lo anterior es esencial para evitar la degradación de los ácidos nucleicos blancos por nucleasas durante los pasos de pre-hibridación. Esto es especialmente importante si el RNA es el blanco ya que estas moléculas tienen una alta susceptibilidad a la degradación por ribonucleasas. Las ribonucleasas deben ser inactivadas por tratamientos con DEPC, trabajando con soluciones autoclaveadas y tomando precauciones que el tejido no se contamine con RNAsas.

IX. PRE-HIBRIDACIÓN. Desnaturalización de la sonda y su blanco.

Para la hibridación *in situ* el DNA cromosomal y el DNA blanco deben ser desnaturalizados. En general algunos tratamientos pueden causar la pérdida de morfología por lo que se debe de llegar al compromiso entre la sonda de hibridación y la morfología. Las desnaturalizaciones alcalinas han sido usadas tradicionalmente. La desnaturalización por calor ha llegado a ser popular, por su simplicidad experimental y por eficacia. La variación, tiempo y temperatura debe ser evaluada encontrando las mejores condiciones para desnaturalización.

Para la desnaturalización por calor, la sonda y el DNA cromosomal blanco puede ser desnaturalizado simultáneamente. Para llevar a cabo esto, se pone la sonda en la laminillas y recubre. Sube la temperatura a 80 °C por dos minutos y después se enfría a 37°C. Para tejidos seccionados, si es necesario, se extiende el tiempo de desnaturalización a 10 minutos.

Para la hibridación competitiva, la sonda marcada compete con el DNA no marcado. Para desnaturalizar se sube la temperatura (hasta 80°C), una vez que el DNA cromosómico se ha desnaturalizado, se baja la temperatura, para que se lleve a cabo la competencia.

X. HIBRIDACIÓN.

La hibridación se realiza bajo condiciones óptimas que permiten la renaturalización de la sonda al ácido nucleico (blanco) en el tejido.

El tejido es lavado para remover las sondas que no se hibridaron.

La hibridación depende de la capacidad que el DNA desnaturalizado tenga para renaturalizarse con la cadena complementaria justo por debajo de su T_m (temperatura de fusión).

La T_m es la temperatura a la cual la mitad del DNA está presente en cadena sencilla (forma denaturalizada). La T_m puede ser calculada midiendo la absorción a 260 nm. La estabilidad del DNA es dependiente del contenido de GC. Mientras el DNA tenga mayor contenido de GC, la T_m será más alta.

La T_m está influenciada por varios factores:

a) Naturaleza de la sonda y sus blancos. Los híbridos RNA-RNA son más estables que RNA:DNA que a su vez son más estables que los híbridos DNA:DNA. Cada tipo de sonda posee distintas ventajas y desventajas, las cuales requieren consideraciones para hacer una buena prueba de hibridación *in situ*.

Por ejemplo, las sondas de oligonucleótidos tienen baja especificidad, aunque pueden ser las únicas que detectan el cambio en una base. Este tipo de sondas son poco sensibles ya que poseen pequeño tamaño, y al ser incorporadas al blanco la estabilidad del híbrido disminuye.

La sonda de doble cadena de DNA se sintetiza de manera más sencilla y es más resistente a la degradación, pero puede ser de las menos sensibles por las renaturalizaciones que ocurren con las sondas marcadas .

En general las sondas de DNA o RNA deben ser menores a 400 pb, para facilitar la penetración al tejido. Oligonucleótidos pequeños (15 a 40 nucleótidos) pueden ser usados como sondas pero es difícil amplificar la señal. Los oligonucleótidos poseen problemas adicionales desde un punto de vista cinético, porque algunas bases están comprometidas a puentes de hidrógeno para estabilizar al híbrido por lo que los oligos pueden ser fácilmente disociados durante el proceso.

Ambas reacciones de acomplamiento enzimático y directo pueden ser usadas para marcar oligos. En general los oligos pequeños son marcados por "tailing 3'" con unas series de bases: biotina, DIG o 2,4 dinitrofenil. Éste último provee de muy buena señal. Las sondas deben unir regiones únicas en el DNA o RNA blanco. Algunos programas computacionales como Oligo 5.0 (Molecular Biology Insights, Inc. Cascade Co.) son muy útiles para identificar regiones probables de pegado en una secuencia dada.

El largo de la sonda puede influenciar la calidad de los resultados. Sondas largas ofrecen la ventaja de incrementar la amplificación de la señal porque de un gran número de nucleótidos marcados y bajas tasas de disociación debido a un extenso número de residuos comprometidos a formar puentes de hidrógeno.

Tabla 2. Ventajas y desventajas entre las sondas que se pueden utilizar para la hibridación *in situ*

Sondas	Ventajas	Desventajas
ds cDNA (DNA doble cadena complementaria)	Estables, marcadas fácilmente por random priming, nick translation o PCR; alta actividad específica, buena detección por una gran número de marcas incorporadas	Necesitan secuencias subclonadas en un vector requiriendo biología molecular; puede renaturalizarse ella misma bajando la eficacia de pegado después de la desnaturalización. Solamente una cadena (antisentido) esta disponible para la hibridación a mRNA. Problemas en la penetración de sondas muy largas al tejido; el vector de la secuencia puede producir hibridación no específica
ss RNA (cadena sencilla de RNA)	Cadena sencilla, alta actividad específica, sintetizada fácilmente y marcada por transcripción <i>in vitro</i> . Gran estabilidad de híbridos RNA:RNA, alta especificidad en la hibridación, los lavados pueden ser muy astringentes. El antisentido entero es aprovechado para formar híbridos	Susceptibilidad a la degradación por contaminantes (RNasas), por tanto se requieren medidas para minimizar este tipo de problemas. Pegados muy fuertes con respecto a las sondas de doble cadena de DNA, incrementa el ruido de fondo; las sondas muy largas presentan problemas de penetración al tejido
Sondas de oligonucleótidos	Largas, definidas, cadena sencilla, sintetizada fácil y rápidamente; excelente rendimiento en cuanto a penetración; capacidad para diferenciar secuencias muy parecidas	Baja sensibilidad en la detección debido a su alta especificidad. Los híbridos son menos estables debido al tamaño pequeño, por tanto los lavados muy astringentes decrementan la intensidad de la señal

a) Largo de la sonda. Las sondas largas forman híbridos más estables como ya se habló anteriormente.

b) La composición de la sonda. Dos puentes de hidrógeno en cada par de bases A:T/U, y tres puentes de hidrógeno en cada par de base G:C. por lo tanto, el alto contenido de GC propicia una T_m alta.

c) Identidad. La identidad de la secuencia entre la sonda y el blanco. Si la sonda es divergente es la secuencia de pegado, esto formará híbridos menos estables que las sondas homólogas. El efecto en la T_m es mayor para sondas pequeñas.

d) Composición de la solución de lavados de la hibridación. Altas concentraciones de cationes monovalentes, como iones de sodio, incrementa la estabilidad de los híbridos. Los cationes monovalentes interactúan electrostáticamente con los grupos fosfaos de los ácidos nucleicos. La repulsión electrostática entre las dos cadenas del duplex disminuye con una alta concentración de sal. Bajas concentraciones de sales afectan la T_m al igual que la tasa de renaturalización. La concentración de iones de sodio por arriba de 0.4 M afectan ligeramente la tasa de renaturalización y la T_m .

e) Desnaturalización del DNA. El DNA se desnaturaliza entre 90°-100°C en 0.1-0.2M NaCl. Para la hibridación *in situ* implica que la preparación microscópica puede ser hibridada a 65°-75°C por periodos prolongados. Esto puede deteriorar la morfología. Afortunadamente los solventes orgánicos reducen la estabilidad térmica de la doble cadena, por lo que la hibridación puede ser realizada a bajas temperaturas en presencia de formamida. La formamida ha sido por años el solvente orgánico por excelencia. Ésta reduce la T_m de los duplex DNA-DNA y DNA-RNA 0.6-0.72°C por porcentaje de formamida; también reduce el ruido de fondo en la hibridación. La hibridación puede realizarse entre 30-40°C con 50% formamida presente en la mezcla de hibridación. La tasa de renaturalización decrementa en presencia de formamida. La T_m del híbrido en presencia de formamida puede ser calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

Para 0.01-0.2M NaCl

$$T_m = 16.6 \log M + 0.41 (\text{GC}) + 81.5 - 0.72 (\% \text{ de formamida})$$

Para concentraciones de NaCl por encima de 0.4M

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\text{GC}) - 0.72 (\% \text{ de formamida})$$

Para obtener un mayor incremento en la hibridación *in situ* para rDNA se utiliza 70% de formamida a 37°C. Durante el proceso de hibridación, grandes cantidades de DNA pueden perderse (Raap et al., 1986).

f) pH. Desde un rango de 5-9 la tasa de renaturalización es independiente de pH.

g) Temperatura. La tasa máxima de renaturalización de DNA es a 25°C. Se puede llevar a cabo en el rango que va desde 16°C hasta 32°C por debajo de la T_m.

Para los experimentos de hibridación, se han desarrollado fórmulas para predecir la T_m. Todo esto es aplicable a híbridos en solución, donde los híbridos formados por el entrecruzamiento de los ácidos nucleicos presentes en el tejido son menos estables, presumiblemente porque los impedimentos estéricos no permiten la renaturalización de la sonda en toda su extensión. Los híbridos RNA:RNA formados durante la hibridación *in situ* tienen una T_m cerca de 5°C menos que los híbridos formados en solución.

(a) Híbridos DNA:DNA (sondas de DNA con más de 22 bases):

$$T_m = \frac{81.5 + 16.6 \log(\text{molaridad de cationes monovalentes}) + 41(\text{fracciones G+C}) - 500}{\text{largo de la sonda en bases} - 0.62 (\% \text{ de formamida})}$$

(b) Para deoxioligonucleótidos entre 14 y 20 pares de bases, bajo condiciones standard (0.9 M NaCl), es usada para estimar la temperatura de hibridación. Ésta se lleva a cabo entre 10° y 15°C por debajo de la T_m calculada:

$$T_m = 4(\text{suma de G+C}) + 2 (\text{suma de A+T})$$

(c) RNA:RNA. Para las sondas de RNA:RNA la siguiente fórmula ha sido usada para calcular la T_m

$$T_m = \frac{79.8 + 18.5 \log(\text{molaridad de cationes monovalentes}) + 58.4(\text{fracciones G+C}) + 41.8 (\text{fracciones G+C})^2 - 820}{(\text{largo de las sondas en bases}) - 0.35(\% \text{ de formamida})}$$

Para RNA:DNA, el último término es reemplazado por 0.5% de formamida. La cinética de la hibridación *in situ* no es aún bien conocida, especialmente porque esta influenciada por la accesibilidad de la sonda, también depende del entrecruzamiento en el tejido, el tamaño de la sonda y para el mRNA, las posibles estructuras secundarias.

Los siguientes factores son importantes:

(a) Concentración de la sonda. La alta concentración de la sonda asegura una tasa alta de renaturalización, que por otro lado incrementa el ruido de fondo. La concentración ideal de la sonda y la tasa de hibridación se pueden incrementar utilizando un agente como el dextrán sulfato.

(b) Dextrán sulfato (5 al 10%). En soluciones acuosas el dextrán sulfato está fuertemente hidratado. Esto resulta en un incremento en la concentración relativa de la sonda porque el agua interactúa con el dextrán sulfato, aumentando la tasa de hibridación. El dextrán sulfato incrementa también la viscosidad de la solución de hibridación, por eso decrementan la tasa a la cual la sonda pueda difundirse hacia su secuencia blanco.

(c) Selectividad de la hibridación. Durante la hibridación se forman dúplexes entre bases correctamente apareadas y con menos frecuencia con otras bases que no corresponden a su complementaria. Esto puede ser manipulado por la selectividad de la hibridación *in situ*.

Para remover el ruido de fondo asociado de híbridos no específicos se somete a lavados con una solución con baja concentración de sal. La baja concentración de sal y la alta temperatura inducen una alta selectividad en el lavado, ya que esto desestabiliza el dúplex. Las fuerzas repulsivas de los enlaces fosfodiéster cargados negativamente están expuestos, por lo que si no hay suficiente concentración de sales, no tendrá la capacidad de neutralizar las cargas y por tanto habrá una alta selectividad. Únicamente las bases correctamente apareadas podrán contender con las fuerzas repulsivas.

(d) Bases mal apareadas. Resultan en la reducción tanto de la tasa de hibridación como en la estabilidad térmica del dúplex resultante. Para tener una fuerte discriminación entre secuencias de DNA cercanamente relacionadas, se hibrida bajo condiciones astringentes. En promedio la T_m decremanta cerca de 1°C por base mal apareada en sondas largas. El mal apareamiento de las bases en oligonucleótidos influyen fuertemente la estabilidad del híbrido.

(e) El tamaño de la sonda. La tasa de renaturalización del DNA en solución es proporcional a la raíz cuadrada del tamaño del fragmento (cadena sencilla). La tasa de máxima hibridación es obtenida con sondas largas. La siguiente fórmula relaciona a fragmentos cortos y largos con el cambio en la T_m (cadena doble):

$$\text{El cambio en la } T_m * n = 500$$

Donde n =nucleótidos.

XI. LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN.

Los lavados de las muestras hibridadas se llevan a cabo para remover sondas no específicas. Los requerimientos críticos son: usar las condiciones apropiadas de selectividad para remover únicamente las sondas inespecíficas. La astringencia (moderada a alta se lleva a cabo en los lavados post-hibridación (subiendo la temperatura por debajo de la T_m). Ésto es

importante saberlo porque sondas pequeñas o sondas ricas en AT tendrán poca señal si se lavan con una alta astringencia.

Para los sondas de RNA, los lavados pueden llevarse a cabo con ribonucleasas, degradando todas las cadenas sencillas, dejando únicamente los híbridos de doble cadena, aumentando la especificidad y bajando el ruido de fondo. Para remover las sondas que hayan hibridando con secuencias

heterólogas, es necesario aplicar un lavado altamente selectivo que asegure que la señal que estamos percibiendo es de secuencias homólogas.

XII. DETECCIÓN.

El paso final de la hibridación *in situ* es la detección de la sonda marcada en el tejido. El método para esto depende del tipo de marcaje que ha sido incorporada en la sonda.

a) Sondas radioactivas. Para las sonda radioactivas marcadas con ^{35}S se puede obtener una baja resolución en la señal, poniendo la laminilla de hibridación encima de un film de rayos-X durante toda la noche. Esto puede ser útil para obtener rápidos resultados, cuando se conocen las óptimas condiciones, pero la resolución es tan baja que no puede ser útil para otros propósitos. Una mejor resolución es obtenida sumergiendo la laminilla de una emulsión, la cual es secada y expuesta a 4°C . Algunos factores afectan la calidad de los resultados obtenidos por este método:

i) El grado de emulsión. Los grados altos son más sensibles pero dan una resolución muy pobre en la señal.

ii) El espesor de la emulsión. Para ^{35}S , una capa fina de emulsión proporciona una buena señal pero baja resolución.

iii) Almacenamiento y vida media de la emulsión. La emulsión puede ser aislada de radiación para evitar un alto ruido de fondo por granos de plata. Además los granos de plata son generados por un mal manejo (estrés mecánico) por lo que la emulsión debe ser tratada sin movimientos bruscos. El secado de las laminillas no debe ser muy rápido.

iv) Condiciones de exposición. La temperatura y las condiciones de humedad afectan la eficiencia de la autorradiografía.

v) Tiempo de exposición. Se debe evitar la sobreexposición ya que esto causa una reducción en la señal radioactiva.

vi) Condiciones para revelarla. El uso de altas temperaturas, agitación de las laminillas o un tiempo largo para desarrollar grandes campos de granos de plata, ocasiona una baja resolución.

Después el tejido es teñido, usualmente con una tinción nuclear como azul de toluidina.

Altas densidades de granos de plata pueden ser observados bajo microscopía de campo claro o en un microscopio de luz, pero la visualización más sensible para detectar los granos de plata es usar la iluminación de campo oscuro. Un problema con esto es que el tejido está teñido y puede ser difícil correlacionar la señal con células específicas. Por eso es que se sobrepone la señal del tejido, tomando una doble exposición fotográfica, en el canal rojo, de los granos de plata bajo campo oscuro, encima de una imagen de campo claro.

b) Sonda marcada con haptenos. La localización de sondas marcadas con haptenos pueden ser visualizadas por microscopía de fluorescencia, si la sonda es marcada con un fluoróforo o indirectamente con un anticuerpo conjugado. Estas técnicas funcionan muy bien para hibridación *in situ* cromosomal y ofrecen un gran flexibilidad para detecciones simultáneas de secuencias múltiples, pero sólo son suficientemente sensibles para la detección de mRNAs abundantes. Un método más sensible es amplificar la señal usando una enzima acoplada a un anticuerpo o una proteína por la cual el sustrato cromogénico esté disponible para generar un producto insoluble colorido. Los anticuerpos mayormente usados son anti-DIG o anti-fluoresceína conjugados a fosfatasa alcalina (AP), usando NTB-BCIP como sustrato. La alta estabilidad de esta enzima permite amplificar la señal. Una variedad de otros sustratos están disponibles, deteniendo productos coloridos: rojo, magenta, verde fluorescente, pero estos son menos sensibles que NTB/BCIP.

La β -galactosidasa es una enzima estable y con X-gal como sustrato es comúnmente usada además del conjugado a estreptavidina.

La peroxidasa de rábano es menos estable y puede ser usada para pequeñas reacciones cromogénicas.

Antes de la incubación con diluciones de anticuerpos conjugados anti-haptenos, los tejidos a hibridar son preincubados con una solución que contiene detergentes y otros agentes que bloquean el pegado inespecífico del anticuerpo.

El tejido es entonces incubado con el anticuerpo a una óptima concentración; si el anticuerpo está muy diluido la señal se perderá, pero si está en exceso causará un alto ruido de fondo. Lavados extensivos con buffer que contiene detergentes, como 0.1% de Tritón X-100, es entonces llevado a cabo para remover anticuerpos no unidos. Las altas concentraciones de detergentes pueden causar una baja en las interacciones específicas de anticuerpos, y por tanto decreta fuertemente la señal. Finalmente la reacción cromogénica es llevada a cabo equilibrando el tejido con el sustrato cromogénico que es convertido por la enzima en un producto colorido insoluble. Es importante saber que no hay algunas enzimas endógenas que pueden generar el producto. Para el caso de la fosfatasa alcalina, la levamisola puede ser incluida en la reacción ya que esta inhibe otras

fosfatasa distinta a la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo. En muchos tejidos ésto no es necesario, pero en otros casos, pueden existir fosfatasa endógenas que no son afectadas por este inhibidor; entonces estas pueden ser inactivadas por calor o por tratamiento con ácido antes de la incubación con un anti-hapteno. Si la peroxidasa es usada para la reacción cromogénica, la peroxidasa endógena debe ser inactivada, preincubando con peróxido de hidrógeno. Por otro lado altas temperaturas son usadas durante la hibridación y los lavados inactivan las peroxidasas endógenas y muchas fosfatasa. Algunos protocolos incluyen una incubación con H₂O₂.

XIII. TÉCNICAS DE DOBLE TINCIÓN

La detección múltiple de secuencias génicas en cromosomas es invaluable para el análisis de su organización física y esto puede ser llevada a cabo por uso de anticuerpos anti-haptenos anclados a diferentes fluorocromos. La detección de algunos productos génicos es útil para relacionar la expresión de un gene particular en un tipo celular o dominios espaciales marcados por la expresión de un gen.

La hibridación *in situ* puede ser combinada usando sondas radioactivas con otro método de detección, pero una detección múltiple puede ser realizada por sondas marcadas con diferentes haptenos que son detectados con anticuerpos conjugados a enzimas.

Dos enzimas distintas pueden ser usadas para las reacciones cromogénicas, pero debido a la alta estabilidad de la fosfatasa alcalina, el método comunmente usado es la detección de la sonda con un anticuerpo-peroxidasas usando sustratos que permitan diferenciar los productos coloridos.

Alternativamente la hibridación *in situ* puede ser combinada con inmunohistoquímica para detectar proteínas específicas u otros antígenos. La detección de un producto génico no puede comprometer la detección subsecuente del otro. Una limitación de éstos métodos es que solamente es posible detectar señal bajo condiciones óptimas. Los principales problemas son que un color puede fácilmente enmascarar a otro y/o el producto formado no permite el acceso de otro reactivo. Además, muchos de los sustratos disponibles son menos sensibles o dan mayores tinciones inespecíficas que el NTB/BCIP. Una posibilidad es usar fluorocromos conjugados a anticuerpos si son lo suficientemente sensibles. Estas limitaciones se resolverán con el desarrollo de sustratos y nuevas enzimas y/o desarrollando fluorocromos más intensos y sensibles. En el futuro, ésto será posible, generando ácidos nucleicos modificados que permitan la detección espectroscópica de híbridos en tejidos vivos.

La hibridación *in situ* puede ser combinada con técnicas que revelan aspectos de fisiología celular así como la organización y la detección de un linaje celular. También se puede detectar la proliferación celular por la incorporación *in vivo* de 5-bromodeoxiuridina dentro del DNA. El diseño de algunos protocolos están en función de la detección, por ejemplo si la

detección de un linaje celular con moléculas fluorescentes que se intercalan en la membrana lipídica, la fotoconversión de esta señal en una tinción permanente tiene que realizarse antes de la hibridación *in situ*.

XIV. CONTROLES

La señal puede surgir no sólo de los sitios de hibridación de la sonda sino también de otros lugares. Es importante que los controles apropiados estén presentes para evaluar la especificidad de la señal. Los siguientes puntos son posibles causas de señales inespecíficas:

a) Hibridación cruzada con secuencias de ácidos nucleicos inespecíficas

i) Se deben de tomar precauciones en el diseño de la sonda para minimizar la posibilidad de una hibridación con secuencias relacionadas. Evaluar si el mismo patrón es observado usando sondas con regiones distintas del transcrito.

ii) Si se está usando una selectividad moderada, la posibilidad de que la hibridación cruzada ocurra en estas condiciones puede ser evaluada observando si el mismo patrón de expresión es detectado con una mayor astringencia o si se usa una sonda de RNA después de un tratamiento con RNasa post-hibridación.

iii) Averiguar si la sonda no hibrida inespecíficamente bajo las condiciones selectivas adoptadas en el protocolo. Esto puede ser probado con un Southern-blot o Northern-blot.

b. Enlaces inespecíficos de la sonda.

i) Un control usualmente usado para la hibridación específica del mRNA es usar una cadena sencilla sentido inespecífica al RNA blanco. Una alternativa válida es usar una sonda de expresión génica distinta y en el caso de oligonucleótidos usar una secuencia tipo "scrambled" como sonda.

ii) Un tratamiento pre-hibridación del tejido con RNasa el cual removerá el RNA blanco. Si la señal es aún generada, entonces es probable que la sonda se esté pegando a otros componentess celulares. Este control es conveniente para las sondas de DNA, pero si la sonda es de RNA debe de tomarse en cuenta que las RNasas no degraden la sonda

iii) La inclusión de un exceso de sonda no marcada que decrementará drásticamente la señal específica, pero si el efecto es mínimo, seguramente existe un enlace no específico entre la sonda y otros componentes celulares.

iv) Si la señal es generada después de omitir la sonda puede ser debido a los enlaces inespecíficos de los agentes de detección.

c. Generación inespecífica de la señal.

i) Para sondas radioactivas la señal puede ser generada debido al estrés mecánico o quimiografía de la emulsión fotográfica. La señal aún estará presente después de omitir la sonda.

ii) Para sondas marcadas con haptenos detectados con anticuerpos conjugados a enzimas, la señal puede ser generada por enzimas endógenas. Esto puede evaluarse por controles en los cuales la sonda y el anticuerpo no estén presentes.

Aquí son listados algunos artefactos más comunes y sus posibles soluciones.

a) Ruido de fondo sobre la laminilla (sondas radiactivas). Éste es el más frecuente debido a la emulsión. Evaluar la emulsión sumergiendo una laminilla blanca. Un ruido de fondo muy alto, puede aparecer en las orillas de la laminilla debido al secado muy rápido de la sonda durante la hibridación, evitando tener secciones de tejido cerca de las orillas de la lámina.

b) Ruido de fondo en los límites del tejido (sondas radioactivas). Granos de plata pueden ser detectados alrededor del tejido por estrés mecánico durante el secado. El secado de la emulsión debe ser muy lento reemplazándolo por un plato fresco.

c) Ruido de fondo uniforme sobre el tejido. Éste es el mayormente causado por enlaces no específicos de la sonda, el cual puede ser debido a:

i) Para sondas de RNA, la secuencia del plásmido ha sido transcrita.

ii) La sonda es muy larga o muy pequeña.

iii) La concentración de la sonda es muy alta (o tan pequeña que el ruido de fondo llega a ser un factor imitante después de una larga exposición (reacción colorimétrica).

iv) La baja selectividad de los lavados en la hibridación

v) Si la digestión post-hibridación con ribonucleasas está actuando sobre la sonda de RNA.

vi) La sonda es enlazada a un componente celular. Esto amerita evaluar una región distinta en el mismo gene. Se evita usar sondas que sean ricas en GC.

d) Ruido de fondo sobre tejidos específicos. Ciertos tejidos parecen favorecer más el pegado de la sonda que otros. Tratando diferente a la sonda o ajustando la concentración, la hibridación y/o las condiciones de lavado puede ayudar.

e) Ruido de fondo con sondas marcadas con haptenos. Puede ser debido a:

i) Alta concentración del anticuerpo anti-haptenos.

ii) Bloqueo insuficiente de sitios de pegado inespecífico antes de la hibridación. Condiciones muy astringentes en los lavados al igual que en las de bloqueo.

iii) Presencia de enzimas endógenas que pueden catalizar la señal de detección. El uso de inhibidores a una alta temperatura o con ácidos pueden ser usados para inactivar ciertas enzimas endógenas.

iv) Sondas marcadas con biotina, la presencia de haptenos endógenos en el tejido, pueden causar un alto ruido de fondo.

v) Durante la hibridación, la sonda y el anticuerpo pueden quedarse atrapados en cavidades del tejido lo cual ocasiona un ruido de fondo, para solucionar este problema, se trata de evitar la formación de estas cavidades usando fórceps o agujas para acomodar el tejido antes de la hibridación.

f) La baja señal puede ser debida a:

i) Degradación del blanco. La contaminación con nucleasas puede ser evitada en las soluciones y recipientes usados para la pre-hibridación y los tejidos pueden ser fijados fácilmente.

ii) La fijación del tejido y/o el tratamiento con proteasas no es óptimo.

iii) Baja eficiencia en el marcaje de la sonda. Checar si ésto no es un problema de los nucleótidos marcados y que la concentración sea correcta en la reacción de marcaje.

iv) El tamaño de la sonda (muy larga o muy corta)

v) La baja concentración de la sonda

vi) La alta selectividad de los lavados en la hibridación

vii) Una abundancia baja del blanco. Los factores limitantes serán sensibles al método y al ruido inespecífico. Si es posible es recomendable una sonda larga.

XV. FOTOGRAFÍA

La fotografía de los datos de hibridación *in situ* es un paso crucial para obtener un buen registro de los datos. Las fotografías de baja calidad pueden ser tomadas usando un microscopio de disección, pero un microscopio compuesto es requerido para las fotos de buena calidad. Es fundamental tener un microscopio equipado con los filtros y lentes apropiados: por ejemplo, contraste diferencial (DIC, Nomarski) de se desea visualizar células sin tinción, iluminación epifluorescente para visualizar los granos de plata. Las secciones de tejidos son montadas en glicerol al 70% y algunas veces ésto puede ser útil para disectar parcialmente al tejido y la señal es visualizada fácilmente. La película correcta debe ser usada. Para microscopía de campo claro y oscuro, películas de alta resolución ASA de 64 o 100 son usadas. Para imágenes de baja intensidad fluorescente es preferible usar películas más sensibles. Las fotografías blanco y negro son tomadas usando películas negativas. Para fotografías de color es mejor usar "slide film" ya que estas pueden ser usadas directamente para presentaciones y es fácil obtener el balance de color correcto.

Es muy importante conocer como se usa el microscopio correctamente y como tomar fotografías con la exposición correcta en la cual la muestra es correctamente orientada, enmarcada y enfocada. Las imágenes pueden ser registradas directamente del microscopio o por "scanning" de la fotografía, y esto aumenta y realza la generación de figuras.

XVI. MICROSCOPIA

a) De campo claro. Las imágenes son obtenidas por transmisión directa de luz a través de la muestra.

La evaluación de los resultados de hibridación *in situ* por microscopía de campo claro es preferida para muchas aplicaciones rutinarias porque las preparaciones son permanentes. Por otro lado la sensibilidad demandada para muchas aplicaciones requiere de microscopía más sofisticada (ejemplo: localización de una copia de un gen, requiere la detección de atogramas de DNA).

b) De campo oscuro. La luz dispersa entra a los lentes del microscopio, por tanto el material aparece como un objeto iluminado en un fondo negro.

Esta microscopía es extensivamente usada para experimentos radioactivos porque el campo puede ser examinado a una magnificación baja. La distribución de los granos de plata pueden ser vistos con un gran contraste. Este tipo de microscopía es usada rara vez para localizar productos con marcaje radioactivo.

c) De contraste de fases. Explora los efectos de la interfase producida cuando dos sets de onda se combinan. Éste es el caso cuando la luz pasa a través de una parte delgada o densa de la célula (como el núcleo) y es retrasada. En consecuencia su fase es cambiada relativamente a la luz que pasa por una región adyacente (delgada) del citoplasma.

La microscopía de contraste de fases es usada para detección enzimática.

d) Microscopía de contraste de reflexión. Es similar a la de contraste de fases. Esta técnica mide el cambio de la longitud de onda de la luz reflejada de la muestra que de la luz emitida directamente.

Bonnet hizo la observación que con microscopía de contraste de reflexión, el producto DAB/peroxidasa producía reflexiones brillantes cuando las cantidades eran extremadamente baja. Esta propiedad hizo que esta microscopía se convirtiera en el medio para detectar una copia simple del gen sin radiactividad.

Estudios de la formación de imágenes DAB en esta microscopía han demostrado que producen mejores resultados en objetos delgados.

e) De fluorescencia. Contiene una lámpara para excitar fluoróforo y un filtro especial, el cual transmite un alto porcentaje de luz emitida por el fluoróforo.

La microscopía de fluorescencia es de gran utilidad para la hibridación *in situ* no radioactiva; ésta es altamente sensible. Además ésta puede ser usada para excitar tres inmunofluoróforos diferentes con espectros de emisión separados (lo cual permite una detección múltiple). También el uso de sistemas altamente sensibles facilita la cuantificación de la señal.

f) Imágenes digitales. Puede detectar señales que no pueden ser vistas con microscopía convencional. La tecnología de procesamiento de imágenes provee de un mejoramiento en la detección de la señal como medida de datos cuantificados. El sistema más sensible hoy en día es la cámara CCD (Charge Coupled Device), que detecta fotones con una alta eficacia sobre un rango de amplio espectro de longitud de onda. Si se quieren ver imágenes en dos

dimensiones, éste es el instrumento ideal. Para análisis en tres dimensiones la microscopia confocal es una alternativa.

g) Microscopía electrónica. La resolución de este tipo de microscopía resalta cuando los electrones en lugar de luz son usados, teniendo cortas longitudes de onda (0.004 nm). El poder de resolución de los microscopios electrónicos más modernos es de 0.01 nm. La resolución de la microscopia electrónica es de 0.1 nm resuelve las estructuras finas de la célula.

h) Flujo citométrico. La velocidad donde la cual la fluorescencia de células individuales puede ser medido con un flujo citométrico lo cual tiene muchas ventajas para la cuantificación de la señal en la hibridación *in situ*.

XVII. ALGUNAS OTRAS TÉCNICAS: PRINS

Es la técnica de marcaje de DNA con un primed *in situ*. Consiste en usar oligonucleótidos pequeños (18-22) e hibridarlos con las secuencias de interés. El oligo es renaturalizado al DNA celular. La reacción se lleva a cabo por la incorporación de precursores dUTP marcados con biotina o digoxigenina, usando una DNA polimerasa termoestable. Una base mal apareada emite el blanco y la sonda produce un híbrido menos estable a nivel térmico. Además si el nucleótido esta localizado en extremo 3', no permitirá ninguna enlongación por la DNA polimerasa.

a) Principios y métodos de *in situ* PCR

Los protocolos experimentales de esta técnica comparten varios pasos de la hibridación *in situ*, como fijación de la muestra, permeabilización durante la preparación de la muestra.

i) Preparación de la muestra. Para preservar la morfología y permitir el acceso de los componentes del PCR en la célula, las muestras necesitan ser fijadas y permeabilizadas. Para fijar la muestra se sumerge en paraformaldeído y formaldeído con etanol y ácido acético.

Los pasos de fijación son una variable crítica que determinan a PRINS. Las muestras que están embebidas en parafina poseen ciertos inconvenientes como impedimentos para acceder los componentes del PCR al DNA nuclear (o cDNA citoplásmico) y también en la preservación de DNA o RNA. La digestión con proteasas en los tejidos, después de la fijación contribuye a un buen PRINS, removiendo el DNA unido a proteínas, haciendo huecos en las membranas del núcleo y citoplasma. La sobre digestión y la digestión ineficiente pueden dar falsos positivos o negativos. Basagra *et al.*, han sugerido una estrategia para determinar la duración óptima de la proteólisis de distintas muestras que involucran la evaluación por contraste de fases.

b) Amplificación *in situ*. Puede llevarse a cabo con células o tejidos fijados en solución. En el caso de muestras en suspensión las células son recuperadas por centrifugación, después del PCR. Para el caso de las muestras en laminillas el material celular y los componentes del PCR son

mezclados y algunas medidas son tomadas para evitar la evaporación. Una ventaja de las células en suspensión es que pueden ser lisadas y analizadas por electroforesis o Southern-blot y de esta manera comprobar si se llevó a cabo el PCR. Las células fijadas parecen funcionar como “sacos de amplificación” con membranas semipermeables que permitan al primer, a los dNTPs y a la DNA polimerasa pasar a través del núcleo y citoplasma. En algunos casos la difusión es insuficiente y esto afecta la detección. Un problema recurrente con PRINS ha sido la inconsistencia de los resultados, lo cual podría deberse a las variables mecánicas (aparatos) o biológicas.

c) Detección de productos de PCR en la célula. La visualización de productos de PCR intracelulares son detectados por sondas marcadas (PCR *in situ* indirecto) o a través de detección inmunohistoquímica de nucleótidos marcados (ej. Digoxigenina-1-dUTP, fluoresceína-dUTP) que han sido incorporados en los productos de PCR durante los ciclos térmicos.

PCR *in situ* directo suele resultar en falsos positivos, especialmente cuando se trabaja con secciones de tejido. Los falsos positivos resultan de incorporación de oligonucleótidos marcados no específicos en fragmentos de DNA. Estos artefactos exhiben señales nucleares y son evidentes en células apoptóticas, donde la fragmentación del DNA es una característica clave. La fijación puede incrementar el número de muescas (nicks) en la cadena doble o sencilla. Los artefactos en la técnica, pueden ser reducidos por una exonucleasa o reparando nicks de DNA con una T4 DNA ligasa o usando ciclos con sondas no marcadas. Ésto no elimina a los falsos positivos pero es suficiente para llevar a cabo una detección específica.

Los métodos indirectos usando sondas que reconocen secuencias amplificadas proveen una máxima especificidad en la detección de productos de PCR intracelulares. Las sondas largas completas o sondas genómicas son usadas para incrementar el número de moléculas reporteras y tener una buena señal.

La naturaleza de los sistemas reporteros pueden influenciar la calidad en los experimentos de hibridación *in situ*. Las sondas radioactivas ofrecen una alta estabilidad, aunque también tienen sus desventajas como el costo, etc. los sistemas colorimétricos basados en fosfatasa alcalina o peroxidasa resultan en una señal pobre lo cual aparenta una baja eficiencia de la técnica. Los sistemas de detección basados en la fluorescencia han sido utilizados, pero éstos no son muy recomendables para esta técnica porque no se preserva del todo la morfología del tejido.

d) Eficiencia de PCR *in situ*. Muchos factores contribuyen a que la eficiencia sea baja en la amplificación, incluyendo ciertos efectos deletéreos de la fijación con aldeído. Para maximizar la eficiencia de los pasos de PCR, varios grupos han determinado empíricamente la temperatura de renaturalización, tiempos de extensión que son requeridos generalmente para relacionar las temperaturas imprecisas, etc. El incremento en la concentración de DNA polimerasa y iones de magnesio son requeridas por

los efectos absorbivos de las laminillas o por las enzimas contaminantes que eluyen de los tejidos o superficies de las laminillas.

e) PCR *in situ* tiene un gran número de aplicaciones en diagnóstico. Algunos grupos han reportado que esta técnica es excelente para detectar copias de secuencias de ácidos nucleicos en células y para detectar pocas copias de DNA o RNA en secciones de tejido. Muchos de los estudios se han enfocado en la detección viral o proviral de secuencias de ácidos nucleicos. Además PCR *in situ* ha sido aplicado en estudios de secuencias de DNA endógeno, incluyendo copias de genes, rearrreglos de genes y translocaciones cromosomales y para mapear un bajo número de copias en los cromosomas metafásicos. Recientemente se ha reportado la detección de un bajo número de copias de mRNA y RNA virales. En la tabla 3 se muestran las aplicaciones de la técnica PCR *in situ*.

Tabla 3. Aplicaciones de la hibridación *in situ*

DNA/RNA extraño	Blanco
	DNA lentivirus
	DNA Citomegalovirus
	DNA Papilloma virus humano
	DNA Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)
	DNA Virus de tumores mamarios de ratón (MMTV)
	RNA virus de hepatitis C (HCV)
	DNA virus de hepatitis B (HBV)
	DNA virus de herpes simplex (HSV)
	DNA virus JC
	DNA Virus humano T-linfotrópico (HTVL)
	DNA virus de inmunodeficiencia en simios (SIV)
	DNA <i>Pneumocystis carinni</i>
	DNA <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
DNA endógeno	Mutaciones fibrosis quística
	Rearreglos de genes
	Translocaciones cromosomales
	Mapeo de cromosomas
mRNA endógeno	mRNA lipoxigenasa-12
	mRNA metaloproteinasas
	mRNA Factor neural de crecimiento (NGF)
	Receptor de cator de crecimiento epidérmico mRNA (EGFR)
	mRNA granzima, mRNA perforina
	mRNA Factor de crecimiento tipo insulina (IGF).

f) Controles para PCR *in situ*. Para la interpretación correcta de los resultados, es necesario incluir controles. Estos deben ser cuantitativos y cualitativos, así como el uso de controles internos de la muestra. Controles específicos para PCR *in situ* deben ser incluidos en cada experimento:

i) Omisión de la DNA polimerasa de la reacción de PCR para detectar pegados no específicos de la sonda y/o anticuerpos.

ii) Omisión de primers para detectar artefactos relacionados con la reparación del DNA en experimentos directos RT-PCR *in situ*

iii) Pretratamiento de muestras con RNasas y la omisión de la reverso transcriptasa en experimentos que detecten secuencias de mRNA.

En la tabla 4, se mencionan los controles para los experimentos de PCR *in situ*.

Tabla 4. Controles requeridos para experimentos de PCR *in situ*.

Método	Controles	Propuesta
General	Uso de muestras control positivas y negativas.	Control para especificidad y sensibilidad del método usado.
	Muestras a evaluar quitando DNA/RNA.	Detección de falsos positivos, control para la sensibilidad.
	Amplificación de secuencias de DNA endógeno.	Detección de falsos negativos, controles para DNA/RNA.
	Omisión del anticuepo primario en detección inmunohistoquímica.	Detección de actividad enzimática endógena.
	Lisis celular después de PCR <i>in situ</i> y análisis de productos de PCR por electroforesis en gel, Southern-blot y secuenciación.	
Células en suspensión		Control en la especificidad de productos de PCR
PCR <i>in situ</i> indirecto	Omisión de DNA polimerasa	Control para la especificidad de la hibridación <i>in situ</i> .
	Uso se sondas irrelevantes para la hibridación <i>in situ</i> .	Detección de sondas no específicas y pegado de anticuerpos.
	Uso se sondas irrelevantes para la hibridación <i>in situ</i>	Detección de artefactos relacionados con el mal apareamiento del DNA y amplificación del DNA endógeno.
PCR <i>in situ</i> directo	Omisión de <i>primers</i> .	Detección de sondas no específicas y pegado de anticuerpos.
	Omisión de DNA polimerasa.	
	PCR <i>in situ</i> en mezclas celulares como controles positivos y negativos en distintas proporciones.	Control de especificidad y sensibilidad del método usado.
PCR <i>in situ</i> cuantitativo	Identificación de distintos tipos celulares por inmunohistoquímica.	

XIX. COMPARACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *in situ*

En seguida se comparan las técnicas de la detección *in situ* de DNA intracelulares y mRNA.

Hibridación *in situ*

Descripción: Hibridación de una sonda intracelular marcada de DNA o RNA

Aplicaciones: Localización de DNA y mRNA endógenos o DNA/RNA foráneos en células (embebidas en parafina, criosecciones, preparaciones celulares y cromosomales)

Ventajas: buena preservación morfológica, alta especificidad, aplicaciones a DNA o RNA, bajos costos en instrumentos e isotérmico.

Desventajas: baja sensibilidad.

PCR *in situ*

Descripción: Amplificación intracelular de PCR y detección de secuencias por hibridación de una sonda marcada o detección inmunohistoquímica de nucleótidos marcados.

Aplicaciones: localización de genes alterados y DNA extraño a la célula (embebidas en parafina, criosecciones, preparaciones celulares y cromosomales).

Ventajas: alta sensibilidad, disponibilidad para detección de un bajo número de copias.

Desventajas: requieren ciclos térmicos que requieren aparatos costosos, reproducibilidad variable en los resultados, destrucción y pérdida de tejidos, cuantificación pobre, generalmente requiere de HIS.

RT-PCR *in situ*

Descripción: cDNA o RT de mRNA seguido por detección y amplificación por PCR intracelular.

Aplicaciones: localización de mRNA específico o RNA virales en células (parafina o criosección o preparaciones celulares).

Ventajas: alta sensibilidad, detección de número bajo de copias de mensajeros. Capacidad para obtener resultados exactos por detección de nucleótidos marcados.

Desventajas: requiere de ciclos térmicos con instrumentos apropiados, reproducibilidad variable, destrucción y pérdida de tejidos, cuantificación pobre.

PRINS

Descripción: Renaturalización del DNA con oligonucleótidos marcados (oligonucleotide primed *in situ*).

Aplicaciones: identificación de cromosomas, mapeo de secuencias de DNA metafásicos y núcleos interfase, localización de DNA cromosomal en células.

Ventajas: rápido, sensible, no radioactivo e isotérmico.

Desventajas: bases mal apareadas, dependientes de la especificidad del primer incorporado. El DNA dañado puede dar señales falsas-positivas

Reverso transcripción *in situ*

Descripción: síntesis de cDNA marcado en una célula usando el sistema de RT.

Aplicaciones: identificación y localización celular de mRNA específicos dentro de la célula.

Ventajas: procedimiento isotérmico con alta sensibilidad.

Desventajas: incorporación de bases marcadas mal apareadas, pero esto es menor que con técnicas dependientes de DNA polimerasa.

RT PRINS

Descripción: similar a la anterior.

In situ 3SR

Descripción: **self-sustained sequence replication**: amplificación isotérmica de mRNA por cDNA usando tres enzimas simultáneamente (reverso transcriptasa con la actividad DNA polimerasa, RNasa y RNA polimerasa) seguida por hibridación *in situ* con sondas marcadas.

Usos: identificación y localización celular de mRNA/cDNA específicos en células (parafina, criosecciones).

Ventajas: isotérmico, alta sensibilidad.

Desventajas: altamente complejo, los primers requieren un promotor de RNA en el extremo 5, amplificación seguida de hibridación *in situ*.

Bibliografía

AGRAWAL, S., C. Christodoulou, M.J. Gait. 1969. Efficient methods for attaching nonradioactive labels to the 5'-ends of synthetic oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 14, 6227-6245.

BASAGRA, O., T. Seshamma, R. Pomerantz. 1993. Polymerase chain reaction *in situ*: intracellular amplification and detection of HIV-1 proviral DNA and other specific genes. *J. Immunol. Methods* 158, 131-145

BAUMAN, J.G., J. Wiegant, P. Borst, P. van Duijn. 1980. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequence by *in situ* hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Exp. Cell Res.* 138, 485-490.

BAUMAN, J.G., M. Van der Ploeg, P. Van Duijn. 1984. Fluorescent hybridocytochemical procedures: DNA-RNA hybridization *in situ*. In: Chayen, J.; Bitensky, L. (Eds.) *Investigative Microtechnique in medicine and Microbiology*. New York: Marcel Dekker, 41-48.

COGHLAN, J.P., P. Aldred, J. Haralambidis, H. D. Niall, J.D. Penschow, G.W. Tregear. 1985. Hybridization histochemistry. *Anal Biochem*, 149, 1-28.

COX, K. H., D.V. DeLeon, L.M. Angerer, R.C. Angerer. 1984. Detection of mRNA in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Develop. Biol* 101,485-503.

DIRKS, R.W., V. Gijlswijk, M. A. Vooijs, A.B. Smit, J. Bogerd, V. Minnen, A.K. Raap, M. Van der Ploeg. 1991. 3'-end fluorochromized and haptenized oligonucleotides as *in situ* hybridization probes for multiple simultaneous RNA detection. *Exp. Cell. Res.* 194, 310-315.

GALL, J.G., Pardue, M.L. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecule in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63, 378-383.

GEBEYEHU, G., P.Y. Rao, P. SooChan, D. Simms, L. Klevan. 1987. Novel biotinylated nucleotide analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Res.* 13, 745-761

GILLAM, I.C., G.M. Tener 1986 N4-(α -aminoethyl) cytosine and deoxycytidine nucleotides can be used to label DNA. *Anal Biochem.* 157, 199-207.

GOSDEN, J.R. 1997. PRINS and *in situ* PCR protocols. Human Press. New Jersey, USA. Colección métodos en biología molecular. 165p.

HARPER, M.E., A. Ullrich, G.F. Saunders. 1981. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11. *Chromosoma* 83, 431-439.

JONH, H., M, M. Birnstiel, K. Jones. 1969. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587.

KADKOL, S.S., W. R. Gage, G.R. Pasternack. 1999. *Molecular Diagnosis* Vol. 4 No. 3169-182.

LANGER, P.R., A.A. Waldrop, D.A. Ward. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6633-6637.

PARDUE, M.L., J.G. Gall. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 600-604.

RAAP, A. K., J.G.J. Marijnen, J. Vrolijk, M. Van der Ploeg. 1986. Denaturation, renaturation, and loss of DNA during *in situ* hybridization procedures. *Cytometry* 7, 235-242.

REISFIELD, A., J.M. Rothenberg, E.A. Bayer, M. Wilchek. 1987. Nonradioactive hybridization probes prepared by the reaction of biotin hydrazide with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 519-526.

RENZ, M., C. Kurz, 1984. A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acid Res.* 12, 3435-3444.

VISCIDI, R.P., C.J. Conelly, R.H. Yolken. 1986. Novel chemical method for the preparation of nucleic acids for non-isotopic hybridization. *J Clin Microbiol.* 23. 311-317.

WETMUR, J.G., N. Davidson. 1986 Kinetics of renaturation rates. *Biopolymers* 14, 2517-2524.

WIEGANT, J., T. Ried, P.M. Nederlof, M. Van der Ploeg, H.J. Tanke, A.K. Raap. 1991. *In situ* hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res.* 19 (12), 3237-3241.

WILKINSON, D.G. 1999. *In situ* hybridization, a practical approach. 2nd edition. Oxford University press. USA. 224 p.