

Hibridación *in situ*

El significado del agua ultrapura para tecnologías de RNA*

Dr. Frauke Nitzki; Dr. Elmar Herbig.

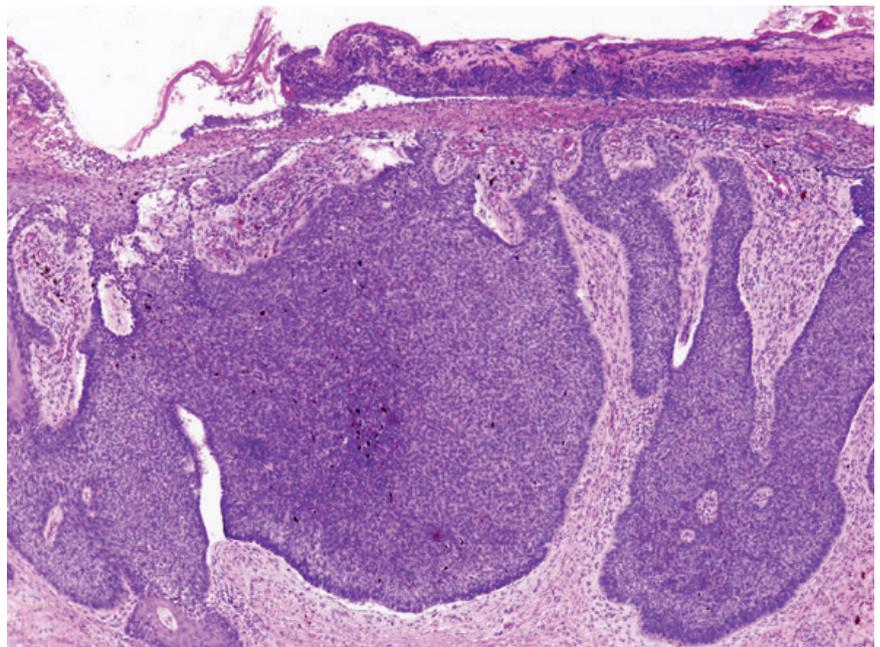
Gall y Pardue describieron en 1969 la primera hibridación in situ (ISH) para la localización de híbridos de DNA/RNA en preparaciones citológicas [1]. Este método permite la detección de transcritos de RNA mensajero en secciones de tejido. Al contrario de lo que ocurre en los análisis de expresión mediante métodos basados en una reacción en cadena de polimerasas (PCR), es posible identificar la localización precisa de los transcritos en el tejido.

Principio de la hibridación *in situ*

La ISH constituye una alternativa a los análisis inmunohistoquímicos si no se dispone de ningún anticuerpo adecuado y puede utilizarse en los más diferentes ámbitos de investigación. Para la detección de los



Carcinoma basocelular. © Klaus D. Peter.



Histopatología de un carcinoma basocelular humano tras la operación de extirpación (tinción hematoxilina-eosina). © KGH.

*Artículo publicado en GIT Labor-Fachzeitschrift, 3/2013

hibridación *in situ* (ISH)

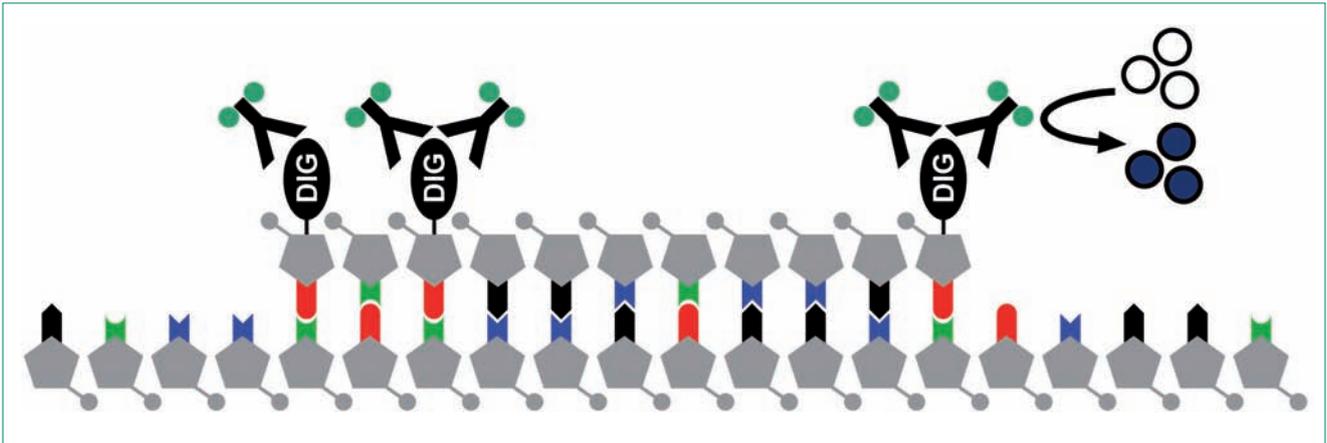


Figura 1. Desarrollo esquemático de la ISH. El RNA mensajero (hebra inferior) es detectado por la sonda complementaria (hebra superior) que se une al RNA mensajero de forma específica. Las moléculas Dig (DIG) unidas a la sonda son reconocidas por un anticuerpo anti-Dig (Y). La enzima fosfatasa alcalina (puntos verdes) está unida al anticuerpo y provoca la transformación de un sustrato incoloro (círculos blancos) en un producto azul insoluble en agua (círculos azules).

Producción de agua ultrapura

El sistema Arium pro VF (Figura 3, página siguiente) se ha diseñado para producir agua ultrapura a partir de agua potable sometida a un tratamiento previo y elimina de esta las impurezas que aún pueda contener.

La producción de agua ultrapura requiere la recirculación continuada y un caudal de agua constante, lo que se consigue mediante un sistema de bombeo con regulación de la presión. La conductividad del agua se mide en la entrada del agua de alimentación y en el agua de producto (directamente en la salida de agua).

El sistema Arium pro VF (aparato predecesor con las mismas especificaciones técnicas como el aquí representado y rediseñado sistema) utilizado en las investigaciones aquí descritas, funciona con dos cartuchos diferentes. Estos cartuchos están llenos de un absorbente especial de carbón activo y de resinas de intercambio de iones en lecho mezclado para suministrar agua de alta pureza con un reducido contenido de TOC (total organic carbon = carbono orgánico total). Asimismo se ha integrado una lámpara de UV, que a unas longitudes de onda de 185 nm y 254 nm actúa como oxidante y elimina los gérmenes.

Este sistema incorpora además un módulo de ultrafiltración que se emplea como filtro de flujo cruzado. La membrana de ultrafiltración utilizada mantiene alejados los coloides, microorganismos, las endotoxinas, el RNA y el DNA y elimina las RNasas, lo que es esencial para la ISH.

En la salida de agua se ha instalado un filtro final de 0,2 µm que sirve para la eliminación de partículas y bacterias durante la dosificación del agua ultrapura elaborada. El proceso de limpieza específico del aparato está representado en la Figura 2 (diagrama de flujo).

tránscrios se utilizan fragmentos de ácidos nucleicos específicos (sondas) que son complementarios a la secuencia buscada. Estas sondas pueden constar de DNA o de RNA. En la actualidad se utilizan frecuentemente sondas de RNA. A menudo, las sondas llevan unida una molécula de dioxigenina (Dig) que suele encontrarse en la planta *Digitalis purpurea*. Con ayuda de este marcaje es posible hacer visibles las sondas específicas dentro de la sección de tejido por medio de anticuerpos anti Dig conjugados enzimáticamente.

Para ello, tras la incubación con el anticuerpo, el sustrato se añade a la sección de tejido y la enzima lo transforma en un colorante (Figura 1). Con ayuda de este método puede analizarse la actividad de diferentes genes con fines de investigación o de diagnóstico.

En el artículo sinóptico de Wilcox [2] puede encontrarse información práctica adicional sobre la ISH.

En este artículo se representan los resultados de una ISH realizada en el marco de la investigación contra el cáncer.

Las muestras analizadas se extraen de ratones manipulados genéticamente.

hibridación *in situ* (ISH)

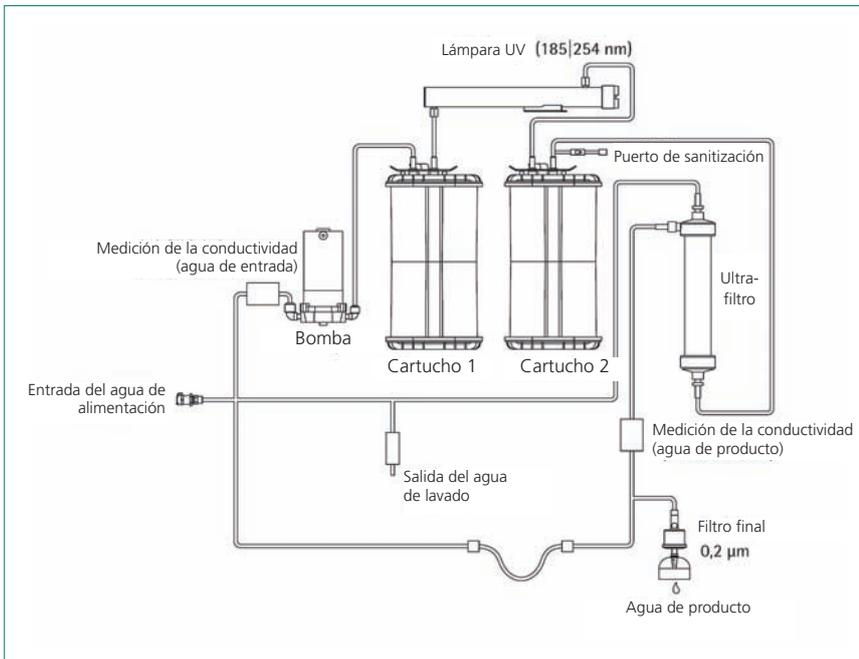


Figura 2. Representación esquemática del diagrama de flujo del sistema de agua ultrapura. Para obtener una visión más clara no se han incluido las válvulas y su control.

La manipulación controlada (bloqueo o knockout genético) del gen supresor de tumores provoca en estos animales la aparición de carcinomas basocelulares [3].



Figura 3. Sistema de agua ultrapura artium pro VF (Foto: Sartorius).

Estos tumores de piel son los tumores más habituales en el ser humano. A menudo presentan una actividad aumentada del recorrido de señal controlado mediante patched (proteína PTCH). Mediante la inactivación de este importante componente, se activa en el modelo ratón el recorrido de la señal de

hibridación *in situ* (ISH)

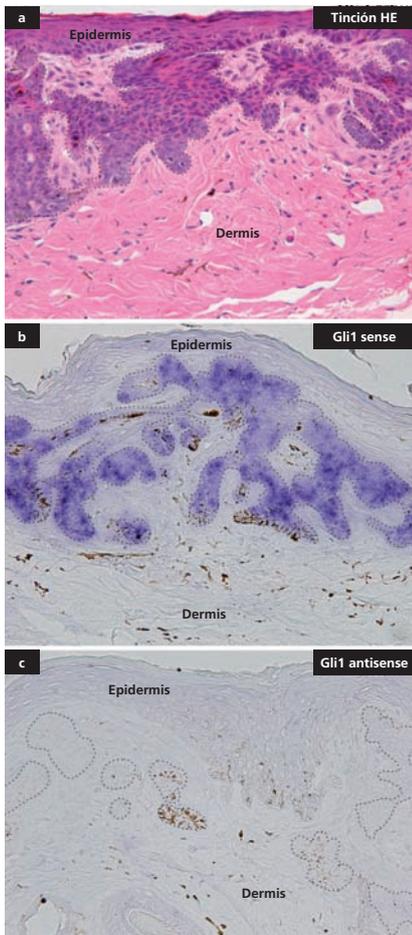


Figura 4. Tinción HE e ISH de carcinomas basocelulares. Se representan la tinción HE (a) así como los resultados de una ISH de Gli1 (b: antisense) y el control negativo (c: sense) en un carcinoma basocelular. Las células cancerosas están marcadas con una línea de puntos, la figura muestra la correspondiente disposición de la epidermis y la dermis.

forma patógena. De ello resulta una expresión aumentada del gen objetivo Gli 1 (codificado para un factor de transcripción que activa diferentes genes adicionales) en las células cancerosas y puede detectarse con ayuda de una ISH.

El significado del agua ultrapura

La utilización de agua limpia y sin ribonucleasa, productos químicos ni materiales es extremadamente importante en este sensible método para evitar la

degradación de la sonda de RNA. Por lo tanto, y entre otros motivos, estas investigaciones presentan exigentes requisitos al agua ultrapura, por ejemplo por lo que respecta a la ausencia de RNasas. En el trabajo aquí presentado se cumplieron los más elevados requisitos exigidos a la pureza del agua gracias a la utilización del sistema de agua ultrapura Arium pro (de Sartorius).

La calidad del agua ultrapura generada representada más arriba se utiliza entre otras para las cuestiones de mayor sensibilidad en los laboratorios de genética humana en el marco de la ISH. A continuación se describen los resultados obtenidos en las investigaciones.

Materiales y métodos

Habitualmente se mezclan los tampones y disoluciones requeridos con dietilpírocarbonato (DEPC) para inactivar las RNasas, lo que equivale a evita la excesiva (overkill) contaminación secundaria, por ejemplo de productos químicos o materiales impuros. Este tratamiento implica costes adicionales, requiere tiempo y es peligroso para la salud, además de no funcionar para todas las disoluciones (como en el caso de disoluciones con contenido de Tris).

Por lo tanto debería evitarse en la medida de lo posible el uso de DEPC y utilizar agua ultrapura sin contaminaciones.

Tal y como muestran las experiencias, todos los reactivos utilizados así como el agua para los experimentos de ISH deben tener una calidad constante, estos, por ejemplo no deben contener contaminaciones biológicas como gérmenes, DNasas, RNasas, endotoxinas, etc.

Como en el agua potable no se dan estas condiciones, ya que dependiendo de su procedencia (por ejemplo en función de la calidad del agua freática local) puede estar mezclada con contaminaciones biológicas fluctuantes y productos químicos. Para obtener información adicionales sobre la calidad de las aguas

freáticas y del agua potable en Alemania, consúltense las referencias [4] y [5].

Por norma debe excluirse la ejecución de una ISH con agua del grifo no tratada, ya que provocaría pérdidas de tiempo innecesarias y aumentaría los costes.

A los ratones se les extraen muestras de tejido de la piel que contenga tumores, se colocan en parafina y se efectúan cortes de parafina con ayuda de un microtomo.

Seguidamente se retira la parafina de las secciones, se rehidratan y el tejido se permeabiliza con proteinasa K. Para evitar los enlaces inespecíficos debidos a diferencias de cargas, se procedió a efectuar una incubación con anhídrido acético.

La sonda de RNA específica de Gli 1 y con marcaje Dig se incubó durante una noche sobre las secciones de tejido a una temperatura de 59 °C. Para eliminar las sondas enlazadas de forma inespecífica se ejecutó un riguroso protocolo de lavado. Los cortes de tejido se lavaron repetidamente a 63 °C en una disolución con formamida y las sondas no enlazadas se eliminaron mediante la incubación con RNasas. Para la detección de la sonda marcada con Dig se utilizó un anticuerpo específico para Dig (Roche). En primer lugar se trataron las rebanadas con I-Block (Tropix) para bloquear los puntos de unión no específicos de anticuerpos.

A continuación tuvo lugar la adición del anticuerpo anti-Dig y las secciones se incubaron durante una noche a una temperatura de 4 °C. Para la detección, la enzima fosfatasa alcalina está enlazada al anticuerpo. Al día siguiente se lavaron abundantemente los cortes para eliminar los anticuerpos no enlazados. Seguidamente se aplicaron gotas de sustrato NBT/BCIP sobre las secciones. La fosfatasa alcalina transforma el sustrato en un producto azul.

Los cortes se valoraron, analizaron y fotografiaron con el microscopio óptico.

Resultados

En la Figura 4 se muestra el resultado de una tinción hematoxilina-eosina (HE) (4a) así como una ISH para el transcrito de Gli1 en un carcinoma basocelular. Con ayuda de la tinción HE se reconocen fácilmente las células cancerosas que se encuentran en la dermis, bajo la epidermis.

Esta tinción representa una coloración de conjunto; los núcleos celulares presentan un color violeta azulado y el citoplasma un color rosado. Por el contrario, una ISH permite la identificación específica de un transcrito, en este caso de Gli1.

El resultado de la ISH con la sonda específica de Gli1 está representado en la Figura 4b. La sonda específica, que suele denominarse sonda antisense, es complementaria al RNA mensajero de Gli1.

Como control negativo se emplea la llamada sonda sense (Figura 4c), que muestra la misma secuencia que el RNA mensajero con lo que no puede enlazarse al transcrito. Tal y como muestra la Figura 4b, Gli1 se expresa en las células cancerosas y no en la epidermis o en la dermis.

Por el contrario, al utilizar sondas sense no específicas, las células cancerosas no se colorean (Figura 4c). Partiendo de estos resultados, se asume que el recorrido de señales parcheado muestra un fuerte aumento de la actividad de las células cancerosas. La contaminación con RNAsas provocada por agua impura o por reactivos hubiera degradado las sondas e imposibilitado la detección de Gli1 con la sonda antisense.

Discusión

El método de la ISH aquí presentado sirve para diversas cuestiones, en las que deben localizarse transcritos dentro de un tejido.

Este protocolo tan amplio y que por tanto requieren tanto trabajo y costes suele requerir varios días y se ejecuta en diferentes laboratorios en distintas variantes. De este modo es posible en principio utilizar también sondas de DNA en vez de RNA para detectar los transcritos de RNA mensajero. Entre las ventajas de las sondas de DNA se cuentan la mayor estabilidad del DNA en comparación con el RNA y la consecuente mayor facilidad de manipulación, ya que las RNAsas no las degradan. Sin embargo, los híbridos RNA-RNA son más estables que los híbridos RNA-DNA [6] y es preferible su uso si se tiene experiencia con la manipulación de sondas RNA RNA.

Para evitar la degradación de la sonda de RNA por las RNAsas es necesario trabajar cuidadosamente y, dentro de lo posible, mezclar todos los tampones y disoluciones con agua ultrapura sin RNAsas.

El agua ultrapura generada por el sistema Arium Pro se caracteriza por mantener en todo momento una alta calidad por lo que respecta a los valores requeridos al agua como la conductividad/resistencia, el contenido de TOC, las RNAsas/DNAsas y las endotoxinas. Especialmente en el caso de las endotoxinas se ha podido demostrar recientemente que el agua ultrapura generada por Arium pro VF presenta unas concentraciones muy bajas < 0,001 EU/ml [7], con lo que se sitúa muy por debajo de los valores límite habituales.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer especialmente a la Dra. Anja Uhmman, Clínica de la Facultad de Medicina de la Georg-August-Universität, Goettingen, Instituto de Genética Humana, grupo de trabajo de Genética de Tumores, Sras. Stephanie Schweizer y Alexandra Scholz, Sartorius-Stedim Biotech, Goettingen, así como al Dr. Herbert Bendlin, Ransbach-Baumbach, su exhaustiva revisión del manuscrito así como la constructiva discusión con relación al tema en cuestión.

Bibliografía

1. Gall J.G. y Pardue M.L.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 63, No. 2, 378-383 (1969).
2. Wilcox J.N.: *Overview of ISH methodology*, Emory University, Winsthipe, Atlanta, GA, USA (2000).
3. Zibat A. *et al.*: *Carcinogenesis*, 30 No. 6, 918-926 (2009).
4. *Grundwasser in Deutschland: Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit* (BMU), 1ª edición (agosto 2008).
5. *Rund um das Trinkwasser: Umweltbundesamt* (2011), 2ª edición, cierre de redacción noviembre 2010.
6. Sugimoto N. *et al.*: *Biochemistry* 34, 11211-11216 (1995)
7. Schmidt K. und Herbig E.: *Laborpraxis* 5, 36.Jhg. S. 52-54 (2012).

Datos de contacto

• **Dr. Frauke Nitzki**
Universitätsmedizin
Georg-August-Universität, Goettingen
Institut für Humangenetik Arbeitsgruppe Tumorgenetik
E-mail: fnitzki@gwdg.de
www.humangenetik.gwdg.de/HG/1/index.php?i=Pe&s=PersonalH

• **Dr. Elmar Herbig**
Sartorius Weighing Technology GmbH
Göttingen
E-mail: elmar.herbig@sartorius.com