

## HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* – PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES

### IN SITU HYBRIDIZATION – PRINCIPLES AND APPLICATIONS

<sup>1</sup>MELLO, Maria Luiza de Almeida; <sup>2</sup>RASMUSSEN, Lucas Trevizani

<sup>1e2</sup>Departamento de Biomedicina – Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos –Unifio/FEMM Ourinhos, SP, Brasil

#### RESUMO

A hibridização *in situ* foi descrita pela primeira vez sendo uma técnica utilizada para localizar e detectar DNA e RNA específico com o auxílio de sondas complementares a sequência alvo, permitindo identificar e visualizar as moléculas alvo. A técnica tem capacidade de preservar a morfologia e a estrutura tecidual, possibilitando o uso em diversas circunstâncias e contextos. O presente projeto de pesquisa tem objetivo o entendimento do princípio e as aplicações da técnica. Para a elaboração da pesquisa foi realizado uma revisão bibliográfica de forma analítica, usando como fonte de informações as bases de dados *Scielo (Scientific Electronic Library Online)* e *PubMed (U.S National Library of Medicine)*. A hibridização *in situ* é uma ferramenta poderosa e versátil, com uma ampla gama de aplicações, pois permite a visualização e localização de ácidos nucleicos específicos. A técnica se tornou indispensável para estudos genéticos, diagnóstico de doenças e pesquisas biomédicas.

**Palavras-chave:** Hibridização; Sondas; Sequência; Moléculas Alvo; ISH.

#### ABSTRACT

In situ hybridization was described for the first time as a technique used to locate and detect specific DNA and RNA with the help of probes complementary to the target sequence, allowing the identification and visualization of target molecules. The technique has the capacity to preserve tissue morphology and structure, enabling use in different circumstances and contexts. This research project aims to understand the principle and applications of the technique. To prepare the research, an analytical bibliographic review was carried out, using the Scielo (Scientific Electronic Library Online) and PubMed (U.S National Library of Medicine) databases as a source of information. In situ hybridization is a powerful and versatile tool with a wide range of applications as it allows the visualization and localization of specific nucleic acids. The technique has become indispensable for genetic studies, disease diagnosis and biomedical research.

**Keywords:** Hybridization; Probes; Sequence; Target Molecules; ISH.

#### INTRODUÇÃO

Em 1953, na Inglaterra, Francis Crick, James Watson e outros cientistas, concluíram a descoberta tridimensional da molécula de DNA (Ácido Desoxirribonucleico), a qual já havia sido evidenciada em 1869 por Johann Friedrich Miescher (Ortiz, 2003). Basicamente, o DNA apresenta uma estrutura de dupla hélice composta por fosfato, açúcares e bases nitrogenadas – Adenina (A), Guanina (G), Timina (T) e Citosina (C). (Watson; Crick, 1953)

A descoberta da dupla hélice do DNA abriu caminho para a biologia molecular, por ter grande potencial para a realização de pesquisas na área médica e assim se tornou uma área de grande interesse aos pesquisadores, levando a diversas descobertas de novas técnicas. (De Souza; Pinho; Pinho -Tsbcp, 2006).

A hibridização *in situ* (ISH - do inglês *In Situ Hybridization*) foi descrita pela primeira vez em 1969, sendo uma técnica utilizada para localizar e detectar DNA e RNA específicos, desde então a técnica passou por diversos avanços e aperfeiçoamentos. O princípio da técnica pode ser descrito, resumidamente, com a utilização de sondas de DNA ou de RNA, complementares a sequência alvo, que se pretende detectar, marcadas com uma molécula fluorescente ou radioativo, que quando hibridizadas, permite identificar e visualizar as moléculas alvo. (Jin; Lloyd; Lloyd, 1997)

A ISH oferece vantagens significativas comparada a outras técnicas de análise molecular, devido a sua capacidade de preservar a morfologia e a estrutura tecidual, permitindo-nos assim correlacionar uma expressão gênica a fenótipos celulares, moleculares e/ou histológicos. É possível utilizar essa técnica em diversas circunstâncias devido a sua capacidade de revelar informações sobre a expressão gênica e sua organização celular, mesmo em situações caracterizadas por baixo números de cópias do alvo. Podendo ser aplicada em uma grande variedade de contextos, como em situações de mutações pontuais, infecção viral latente e baixo número de cópias que caracteriza diversos vírus e RNAm de eucariotos. (Nuovo *et al.*, 1999)

O principal objetivo do presente trabalho foi a realização de uma revisão de literatura sobre a hibridização *in situ*, visando o entendimento de seu princípio e suas aplicações.

## **METODOLOGIA**

Foi realizada uma revisão bibliográfica de forma analítica, utilizando como fonte de informações artigos científicos publicados nas bases de dados *Scielo* (*Scientific Electronic Library Online*) e *PubMed* (*U.S National Library of Medicine*). Foram selecionados artigos em português e inglês entre os anos de 1953 a 2016. Durante a pesquisa foram utilizadas como palavras-chaves os termos “hibridização”, “*hybridization*”, “hibridização *in situ*”, “*in situ hybridization*” e “ISH”, no total foram lidos

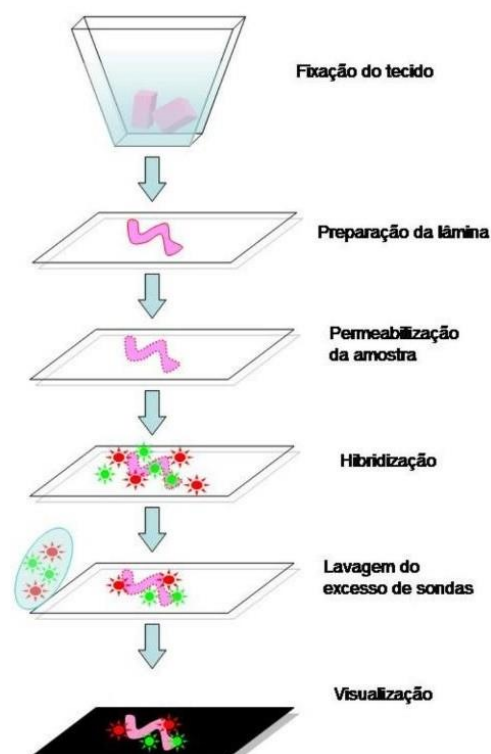
e utilizados 15 artigos. Foram excluídos artigos que não se encaixaram no objetivo principal da pesquisa.

## DESENVOLVIMENTO

### CARACTERÍSTICAS GERAIS DA HIBRIDIZAÇÃO *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* consiste basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA com uma sequência de nucleotídeos complementares encontradas dentro da célula, selecionando então uma sequência específica, chamada de sequência-alvo. Para que seja possível visualizar e identificar a sequência hibridizada é necessário marcá-la com uma sonda, a qual detecta a sequência-alvo desejada tornando assim possível sua visualização em microscópio de fluorescência. (GUERRA, 2004) A figura 1 ilustra as etapas descritas acima.

**Figura 1** – Principais etapas da hibridização *in situ*



**Fonte:** disponível em: [https://www.researchgate.net/figure/Principais-etapas-da-hibridizacao-fluorescente-in-situ\\_fig1\\_288516378](https://www.researchgate.net/figure/Principais-etapas-da-hibridizacao-fluorescente-in-situ_fig1_288516378)

## **HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*: DA TÉCNICA A APLICAÇÃO**

### **Sondas**

Em biologia molecular o termo sonda é designado a uma molécula marcada, a qual é utilizada para se ligar e detectar uma molécula alvo, qual está sendo pesquisada. Considerando a técnica de Hibridização *in situ*, o tamanho ideal para uma sonda é de 50 á 300 bases. (Mcnicol; Farquharson, 1997).

Existem diversos tipos diferentes de sondas que podem ser utilizadas para a ISH, sendo elas de cDNA, cRNA e sondas oligonucleotídicas sintéticas. A diferença entre elas é a sensibilidade, especificidade, sua produção, facilidade da penetração no tecido, estabilidade dos híbridos, a aplicação e reprodutividade do método. (Jensen, 2014)

As sondas complementares de DNA são geralmente clivadas por enzimas de restrição do plasmídeo de DNA clonado. Essas devem ser desnaturalizadas aquecendo a 95°C antes da hibridização. (Jin; Lloyd; Lloyd, 1997)

Sondas de cRNA são preparadas por transcrição *in vitro* utilizando as sequências de cDNA como modelo. Essas sondas são mais sensíveis, pois podem ser marcadas de modo mais específico e são utilizadas para detecção de baixa atividade específica. (Jin; Lloyd; Lloyd, 1997)

Sondas oligonucleotídicas sintéticas que consistem em uma fita simples de DNA pode ser gerado com um sintetizador de DNA automatizado. As oligo-sondas penetram nas células mais facilmente e gerem excelentes sinais de hibridização. (Jin; Lloyd; Lloyd, 1997)

### **Fixação e permeabilização**

Nessa etapa o tecido destinado a ISH deve passar por um tratamento prévio e específico de fixação para garantir uma melhor preservação da morfologia da sequência-alvo. Existem diversos tipos de fixadores, porém o mais utilizado é o paraformaldeído 4%, pois com ele há uma maior preservação sem causar alteração a estrutura morfológica. (Das Graças Da Silva-Valenzuela *et al.*, 2006)

O tecido obtido deve ser fixado imediatamente por imersão em solução estéril de paraformaldeído 4%. Após a fixação, deve ser feito um tratamento com sacarose 30% para evitar a desidratação. (Das Graças Da Silva-Valenzuela *et al.*, 2006)

## Hibridização

Na etapa de hibridização as sondas e os cromossomos são desnaturados e hibridizados sob condições controladas. Comumente a desnaturação é feita através de aquecimento da sonda e das lâminas, em temperaturas próximas de 70 a 80° C. A lâmina com cromossomos desnaturados é coberta com uma solução de hibridização contendo a sonda, é recoberta por uma lamínula e deixada à temperatura de 37°C por 18 horas ou mais, período onde ocorre a hibridização. (Sociedade Brasileira de Genética, 2004)

Posteriormente é retirada a lamínula e leva-se a lâmina para a lavagem pós-hibridização, onde é retirado o excesso de sonda, as parcialmente pareadas e as mais instáveis. A lavagem é realizada mergulhando as lâminas em uma cubeta com solução salina-citrato (SSC) e formamida, a salina colabora para a estabilização da dupla hélice e a formamida para romper as pontes de hidrogênio. (Sociedade Brasileira de Genética, 2004)

## Rotulagem da sonda

Existem dois métodos principais para rotular uma sonda: marcação com radioisótopos e marcação sem radioisótopos. A marcação com radioisótopos é considerada mais sensível, podendo ser facilmente quantificados ou semiquantificados usando uma contagem por densitometria. (Jensen, 2014)

Na marcação não isotópica são utilizados componentes como a biotina, fluoresceína, digoxigenina, fosfatase alcalina ou bromodesoxiuridina, podem ser visualizados por histoquímica ou imuno-histoquímica. (Jensen, 2014)

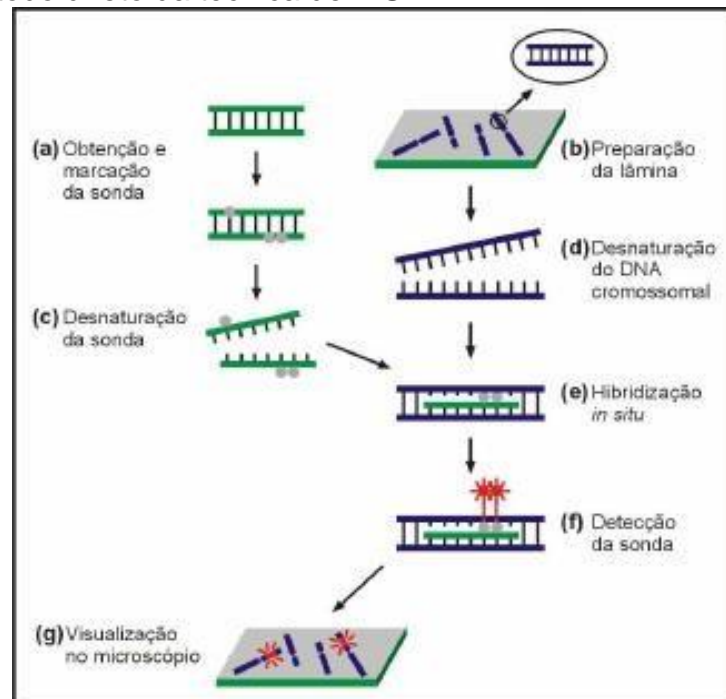
## Tipos de hibridização

Ao longo dos anos diversos tipos de ISH foram desenvolvidos, cada um tendo suas características e aplicações específicas. Hoje temos como principais variações as técnicas de FISH, CISH, GISH e PCR *in situ*.

A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é um método histoquímico que utiliza sondas marcadas com fluoróforos e em um microscópio ótico epifluorescentes é realizada uma visualização direta das sequências alvos. A FISH pode ser feita por método direto ou indireto.

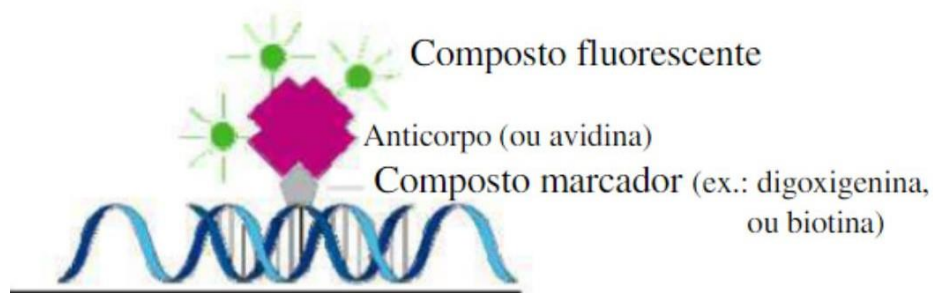
O método mais utilizado é o direto, por ser rápido e de fácil execução, nele umou mais fluorocromos são conjugados diretamente as sondas que se ligam nas regiões 5' ou 3' do alvo, a figura 2 ilustra as etapas para a realização. No método indireto, a sensibilidade é maior ao ligar uma molécula de digoxigenina á sonda, a qualse liga posteriormente a ligação de anticorpo conjugado com fluorocromo a esta digoxigenina, a figura 3 ilustra as etapas para a realização. (Neves; Guedes, 2012)

**Figura 2** – Método direto da técnica de FISH



**Fonte:** disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/4565551/capitulo-fish>.

**Figura 3** – Método indireto da técnica de FISH

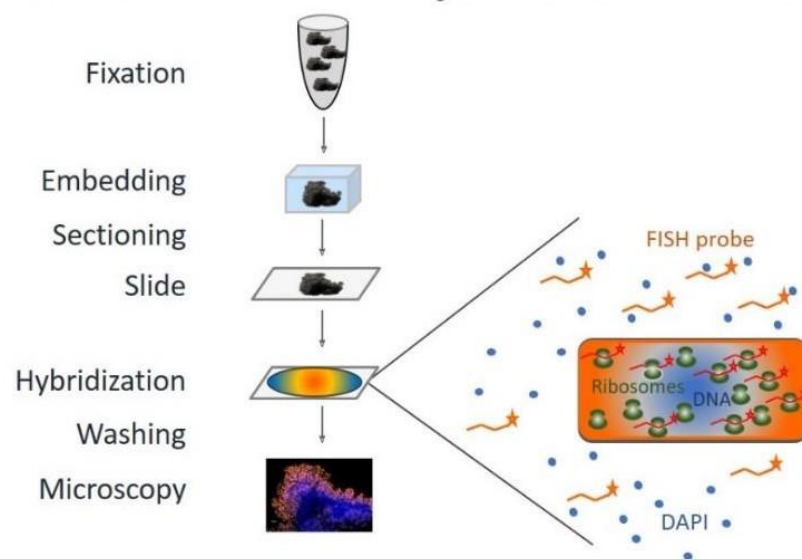


**Fonte:** disponível em: <https://www.passeidireto.com/arquivo/1855392/aula-4-fish>.

Ainda na FISH, temos uma variação chamada de FISH multicolorido, a qual é utilizada para buscar anomalias cromossômicas. Nessa técnica duas ou mais sondas são especificadamente rotuladas, combinadas e identificadas com diferentes cores fluorescentes, a figura 4 ilustra as etapas para a realização, podendo assim avaliar múltiplos cromossomos. (Jensen, 2014)

**Figura 4** – Principais etapas da FISH multicolorida

## Fluorescence *in situ* Hybridization = FISH

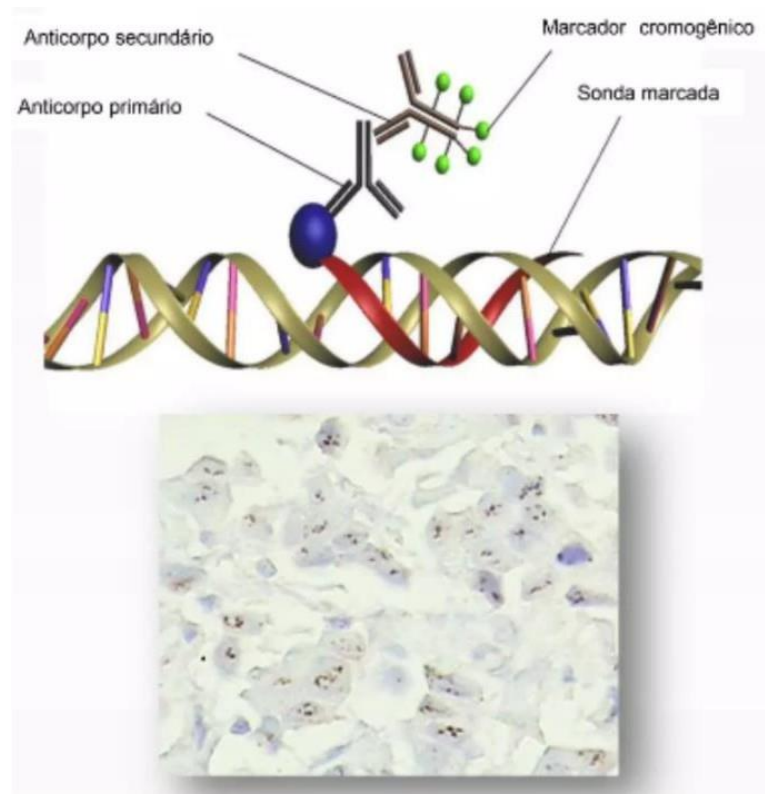


Modified from Moter and Göbel, J Microbiol Methods. 2000

**Fonte:** disponível em: <https://www.moki-analytics.com/en/methods/>

A hibridização *in situ* cromogênica (CISH) localiza sequências específicas de ácido nucleicos em secções histológicas ao se ligar a uma sequência de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos (RNA), os quais são fixados a umamolécula repórter, a figura 5 ilustra as etapas para a realização. É utilizado em amostras fixadas em formalina e incluídas, apresentando assim uma maior sensibilidade e especificidade. Na CISH é comum a utilização de amostras positivas como controle de qualidade das reações. (Monteiro et al., 2019)

**Figura 5** - Metodologia e resultado da CISH



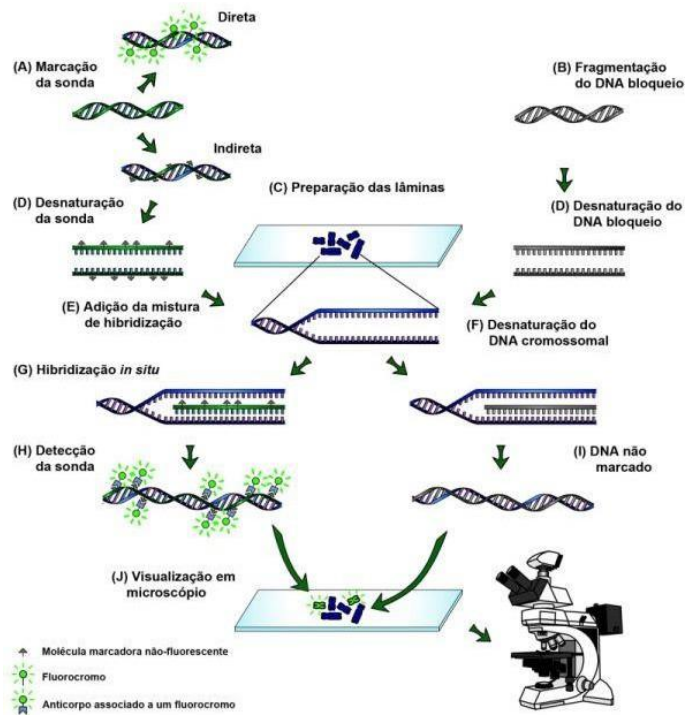
**Fonte:** disponível em: <https://pt.slideshare.net/FonteMD/aula-mastologia-mama-patologia-molecular>

A hibridização *in situ* genômica (GISH) é utilizada para distinguir cromossomos de diferentes parentais ou gemos distintos, usando sondas de DNA genômico total. (Muhay, 2005) A sonda pode ser marcada de maneira direta ou indireta, a figura 6 ilustra as etapas para a realização.

Na direta os nucleotídeos marcados estão associados ao fluorocromo e são visualizados diretamente em microscópio de fluorescência. No método indireto os nucleotídeos marcados estão associados a moléculas marcadoras e sequencialmente são passados por uma etapa de detecção, onde as moléculas marcadoras são reconhecidas por anticorpos conjugados a fluorocromos, permitindo que a sonda seja visualizada. (Guerra, 2004)



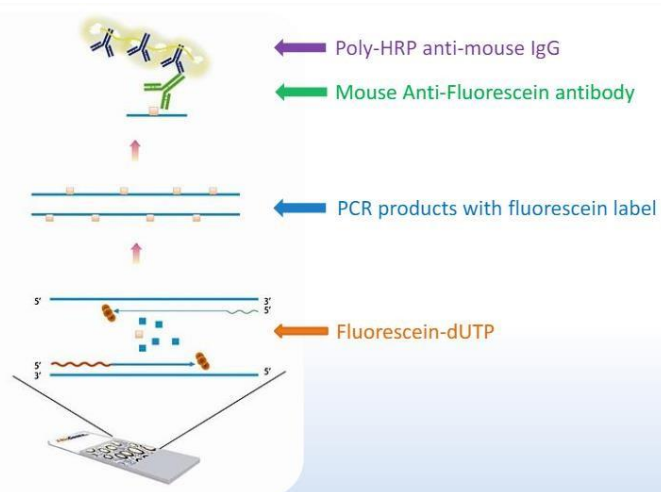
**Figura 6 - Etapas para a realização da GISH**



Fonte: disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p\\_co270\\_f1.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co270_f1.htm)

Existe ainda a PCR com hibridização *in situ* (PCR *in situ*), uma variação que aumenta a sensibilidade da técnica e amplifica sequências específicas. Em sequências curtas é utilizada para fazer cópias e aumentar a quantidade de sequências-alvo, aumentando até chegar em níveis que são detectados pela hibridização *in situ*, a figura 7 ilustra as etapas para a realização. (JENSEN, 2014)

**Figura 7 - Etapas para o PCR *in situ***



Fonte: disponível em: <https://cdn2.hubspot.net/hubfs/2491021/Presentations/In%20situ%20PCR>

Cada técnica possui suas próprias vantagens e limitações, devem ser escolhidas de acordo com os requisitos experimentais e as características do material utilizado.

### **Aplicações**

Com a hibridização *in situ* é possível identificar anomalias cromossômicas, como deleções, duplicações e translocações. Essa técnica apresenta diversas aplicações em diferentes áreas da biologia, tanto para pesquisa quanto para diagnóstico e essas aplicações podem envolver variações da mesma. (Congresso Brasileiro De Genética Médica, 2016)

Na patologia é utilizada para identificar e classificar diversas condições patológicas, como infecções virais, doenças autoimunes e lesões teciduais. Visualizando a presença e distribuição de ácidos nucleicos específicos nas amostras de tecido, oferecendo um diagnóstico mais preciso aos pacientes. (Das Graças Da Silva-Valenzuela *et al.*, 2006)

Em citogenética e genética molecular, a mais utilizada é a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), onde pode ser feito mapeamento de genes cromossômicos, caracterização de aberrações genéticas, identificação de genes, anormalidades associadas a doenças genéticas ou neoplasia e detecção de genomas virais. (Jin; Lloyd; Lloyd, 1997).

Outro grande campo de aplicação é na expressão genética, devido a sua grande capacidade visualizar a localização e quantificar a expressão de genes específicos em diferentes tipos de células e tecidos. Tendo valor nos estudos de: fatores de crescimento, mapeamento cromossômico, expressão de oncogêneses, alterações genéticas, polimorfismo e expressão gênica. (Walker, 2020)

Na oncologia é essencial para o diagnóstico, prognóstico e seleção de tratamentos em pacientes com câncer, pois é possível identificar biomarcadores tumorais específicos e alterações genéticas associadas a diferentes tipos de tumores. Permitindo selecionar tratamentos mais eficazes e personalizados. (Hicks; Tubbs, 2005)

E na neurociência a ISH é empregada na pesquisa de distúrbios neurológicos, como nas doenças de Alzheimer, esclerose múltipla e transtornos do espectro autista, podendo mapear os padrões de expressão genica no cérebro e

identificar alterações moleculares associadas, apresentando insights importantes para o desenvolvimento de novas terapias e tratamentos. (“Seção Especial Resumo”, 1997)

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hibridização *in situ* é uma ferramenta poderosa e versátil, com uma ampla gama de aplicações, pois permite a visualização e localização de ácidos nucleicos específicos.

Nesse trabalho exploramos os princípios fundamentais dessa técnica, desde suas etapas até suas aplicações em diferentes campos de pesquisa. Além disso, discutimos as diferentes abordagens de hibridização *in situ*, como a FISH (hibridização *in situ* fluorescente), CISH (hibridização *in situ* cromogênica), GISH (hibridização *in situ* genômica) e PCR *in situ* (PCR com hibridização *in situ*).

Apesar dos avanços significativos, ainda existem desafios a serem superados na hibridização *in situ*, estes incluem a otimização de protocolos para aumentar a sensibilidade e especificidade da técnica, a redução do tempo e custo associados aos experimentos.

## REFERÊNCIAS

DAS GRAÇAS DA SILVA-VALENZUELA, M. *et al.* **Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. *In situ hybridization with non-radioactive riboprobes: principles and applications in pathology.*** Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

DE SOUZA, M.; PINHO, L.; PINHO-TSBCP, L. **Pesquisa em Biologia Molecular: Como Fazer? *Molecular Biology Research-How to do it?*** Acesso em: 03 de março de 2024.

GUERRA, M. Hibridização *in situ*: Princípios básicos. In: GUERRA, M. (Org.). **FISH. Conceitos e aplicações na citogenética.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 1-33, 2004. Acesso em: 20 de março de 2024.

HICKS, D. G.; TUBBS, R. R. **Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence *in situ* hybridization: A technical review with interpretive guidelines.** *Human Pathology*, v. 36, n. 3, p. 250–261, 2005. Acesso em: 27 de fevereiro de 2024.

JENSEN, E. **Technical review: *In situ* hybridization.** *Anatomical Record*, v. 297, n. 8, p. 1349–1353, 2014. Acesso em: 07 de março de 2024.

JIN, L.; LLOYD, R. V.; LLOYD, R. ***In Situ Hybridization: Methods and Applications***. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. Acesso em: 24 de fevereiro de 2024.

MONTEIRO, R. L. *et al.* **Validação das reações de hibridização *in situ* cromogênica para detecção de DNA e RNA em tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina**. *Validation of chromogenic in situ hybridization reactions for DNA and RNA detection in formalin-fixed paraffin-embedded tissue*. Acesso em: 20 de março de 2024.

MUKAY, Y. ***Perspectives in molecular cytogenetics of wheat***. In: TSUNEWAKI, K. (Ed.). *Frontiers of wheat bioscience: the 100th memorial issue of wheat information service*. Yokohama: Kihara Memorial Foundation for the Advancement of Life Sciences, p. 17-31, 2005. Acesso em: 05 de março de 2024.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. **Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária**. Arq. Inst. Biol. Acesso em: 08 de março de 2024.

NUOVO, G. J. *et al.* **RAPID COMMUNICATION *In Situ Amplification Using Universal Energy Transfer-labeled Primers***. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. Disponível em: <http://www.jhc.org>. Acesso em: 14 de março de 2024.

ORTIZ, L. C. **A fantástica descoberta da estrutura do DNA faz 50 anos**. *Ciência e Cultura*, v. 55, n. 2, p. 22–22, 2003. Acesso em: 12 de março de 2024.

WALKER, J. M. ***Methods in Molecular Biology***. Disponível em: <http://www.springer.com/series/7651>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2024.

WATSON, J.; CRICK, F. C. ***Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid***. Acesso em: 27 de fevereiro de 2024.