

Desarrollo de un protocolo de hibridación *in situ* en un lagarto placentotrófico obligado

Manuela Franco Mateus

Trabajo de Grado para Optar al Título de bióloga

Director

Martha Patricia Ramírez

Dra. en Ciencias Biológicas

Codirector

Yurany Nathaly Hernández Díaz

M Sc. en biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2023

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	9
2. Objetivos	11
2.1 Objetivo General	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Competencias desarrolladas.....	11
3.1 Competencias conceptuales	11
3.2 Competencias procedimentales.....	12
3.3 Competencias actitudinales.....	12
4. Metodología	12
4.1 Colecta de individuos.....	13
4.2 Eutanasia, disección y almacenamiento de tejidos	13
4.3 Preparación de sondas de ARN marcadas	14
4.3.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA	14
4.3.2 Diseño de Primers de β - actina	15
4.3.3 Síntesis de secuencias mediante la polimerasa en cadena	16
4.3.4 Segunda PCR	18
4.3.5 Síntesis de sonda de ARN marcada con DIG	19
4.3.6 Análisis de dot blot	20
4.4 Cortes histológicos.....	21
4.4.1 Deshidratación de tejidos, aclaramiento, inclusión en parafina y seccionamiento..	21
4.5 Tratamientos de prehibridación e hibridación	23

4.6 Lavados post-hibridación y detección de la señal.....	25
5. Resultados.....	27
5.1 Colecta de individuos.....	27
5.2 Disección y almacenamiento de tejidos.....	27
5.3 Preparación de sondas de ARN marcadas.....	28
5.4 Tratamientos de prehibridación e hibridación.....	35
6.Discusión.....	40
7.Conclusiones.....	44
Referencias Bibliográficas.....	45
Apéndices.....	51

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Lista de primer diseñados con sus respectivas secuencias	17

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Día 1: síntesis de la sonda	16
Figura 2. Día 2: síntesis de la sonda	19
Figura 3. Cortes histológicos	22
Figura 4. Día 1: pre-hibridación.....	24
Figura 5. Día 2: lavados post hibridación e interacción con anticuerpo Anti-DIG	25
Figura 6. Día 3: incubación con el sustrato de fosfato y fijación de señal	26
Figura 7 Colecta de ejemplares en campo y mantenimiento durante el transporte al laboratorio.	27
Figura 8. Disección e identificación de estructuras	29
Figura 9. Extracción de ARN.....	30
Figura 10. Amplificados de β -actina y cromatogramas	31
Figura 11. Amplificados de β -actina con cada set de primers	32
Figura 12. Dilución del cDNA.....	32
Figura 13. PCR extracción del gel	33
Figura 14. Electroforesis de la sonda.....	33
Figura 15. Prueba de dot blot.....	35
Figura 16. Histología y expresión de β -actina en hígado de <i>Marisora</i>	37
Figura 17. Histología y expresión de β -actina en ovario de <i>Marisora</i>	38
Figura 18. Histología y expresión de β -actina en músculo de <i>Marisora</i>	39

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A.Preparación de reactivos	
Apéndice B. Hibridación <i>in situ</i> no exitosa	

Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS

Resumen

Título: Desarrollo de un protocolo de hibridación *in situ* en un lagarto placentotrófico obligado*

Autor: Manuela Franco Mateus**

Palabras Clave: Hibridación *in situ*, β -actina, *Marisora sp*

Descripción:

El presente documento muestra la estandarización de un protocolo de hibridación *in situ* (HIS) para la preparación de una sonda de ARN marcada con DIG a base de amplificadores de PCR de β -actina y su implementación en cortes histológicos de hígado, ovario y músculo esquelético en una especie de lagarto vivíparo placentotrófico. Se detectó la expresión de ARNm usando la sonda de actina 1 T7 combinado con el sistema de detección de alcalina fosfatasa y el sustrato INT/BCIP. Se encontró la presencia de transcritos de ARNm de β -actina en los cortes estudiados. Para el caso del hígado su presencia fue homogénea, mientras que para el ovario y músculo fue diferencial dando mayor señal en las estructuras de sostén de los diferentes cortes, como lo es la teca en el ovario y los fibroblastos en el músculo. Se estandarizo de manera exitosa y por primera vez un protocolo de hibridación *in situ* en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados que puede ser implementado en futuros estudios.

* Pasantía de investigación

** Facultad de ciencias. Escuela de biología. Biología. Director: Martha Patricia Ramírez. Dra. en

Ciencias Biológicas. Codirector: Yurany Nathaly Hernández Diaz. M Sc. en biología

Abstract

Title: Development of an in-situ hybridization protocol in an obligate placentotrophic lizard*

Author: Manuela Franco Mateus **

Keywords: In situ hybridization, β -actin, *Marisora* sp.

Description:

The present paper shows the standardization of an in-situ hybridization (ISH) protocol for the preparation of a DIG-labeled RNA probe based on PCR amplifications of β -actin and its implementation in histological sections of liver, ovary and skeletal muscle in a placentotrophic viviparous lizard species. We detected mRNA expression using the actin 1 T7 probe combined with the alkaline phosphatase detection system and the INT/BCIP substrate. The presence of β -actin mRNA transcripts was found in the studied slices. In the case of the liver, its presence was homogeneous, while for the ovary and muscle it was differential, giving a greater signal in the support structures of the different sections, such as theca in the ovary and fibroblasts in the muscle. An in-situ hybridization protocol was successfully standardized for the first time in the Vertebrate Reproductive Biology Laboratory and can be implemented in future studies.

* Pasantía de investigación

** Facultad de ciencias. Escuela de biología. Biología. Director: Martha Patricia Ramírez. Dra. en Ciencias Biológicas. Codirector: Yurany Nathaly Hernández Diaz. M Sc. en biología

Introducción

Las vitelogeninas (Vtgs) son lipoproteínas importantes para el desarrollo del embrión en especies lecitotróficas y están presentes en todos los vertebrados (Romano et al., 2004; Brawand et al., 2008). En los vertebrados ovíparos la presencia de genes de Vtgs se encuentra altamente conservada (Babin, 2008), sin embargo, en mamíferos euterios el desarrollo de la lactación y la placentación ha llevado a una pérdida de la nutrición dependiente de yema, y asociado a ello, la presencia parcial de genes o pseudogenes de Vtgs (Brawand et al., 2008). Además, estas proteínas son ideales para el estudio de procesos evolutivos relacionados con la reducción de la yema y la transición a la viviparidad placentotrófica en algunas especies de amniotas. Pese a lo anterior, son moléculas muy poco estudiadas en algunos grupos de animales como los reptiles, en donde se ha descrito de manera general su síntesis y regulación hormonal (Ho, 1987; Ho et al., 1982; Nijagal & Yajurvedi, 1999).

La implementación y aplicación de técnicas como la HIS permiten resolver preguntas importantes del macroproyecto “Expresión de genes de vitelogeninas en un lagarto placentotrófico obligado”, en especial para localizar los transcritos de Vtgs en el tejido, determinar su grado de expresión, y compararlos con otras especies lecitotróficas y placentotróficas. La hibridación *in situ* es una técnica que combina principios moleculares con la histología y la citología, localizando por medio de marcaje la presencia y expresión de secuencias o fragmentos de ADN o ARN en células y tejidos (Franco, 2013). Este método localiza la molécula de interés en la célula con alta precisión, al mismo tiempo mantiene la morfología del tejido y aporta información sobre su ubicación celular,

organización, distribución y grado de expresión (Franco, 2012). Si bien este método es similar a la inmunohistoquímica, la HIS no se encuentra limitada por la ausencia de anticuerpos específicos que dependen de la oferta del mercado, sino que se puede sintetizar una sonda marcada específica para las moléculas de interés (Nieto et al., 1996). En reptiles esta técnica ha servido para la localización de ADN ribosomal, receptores de estrógenos, andrógenos y progesterona (Young et al., 1994; Perkins et al., 2001) e incluso, en *Mabuya* ha servido para demostrar la presencia de *Mab-Env1* en la interfaz materno-fetal, transcritos relevantes en la evolución de la placentación (Cornelis et al., 2017). Relacionado a esto, cabe resaltar que las especies de lagartos como *Mabuya* presentan características reproductivas muy interesantes, como por ejemplo que son vivíparas, tienen una gestación de hasta 9 meses, y desarrollan una placenta muy especializada que cumple todos los requerimientos para que la gestación y el desarrollo embrionario y fetal se lleven a cabo exitosamente (Ramírez et al., 2002; Ramírez-Pinilla, 2006).

Hasta el momento no se ha implementado esta metodología en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados adscrito a la Universidad Industrial de Santander, y por tanto se debe inicialmente estandarizar su uso y elaborar un protocolo de HIS para su aplicación. Para esto se utilizará una molécula modelo como la actina, que está presente en todos los organismos eucariotas conformando el citoesqueleto, por lo que hay una amplia cantidad de información recogida en las bases de datos moleculares, además de que ya se ha implementado su uso en la HIS (Singer & Ward, 1982; Bentley & Singer, 1985). Una vez logrado este proceso en el laboratorio, se tendría una metodología probada para aplicar en el análisis posterior de las Vtgs, al mismo tiempo que contribuiría con la investigación local y el desarrollo de futuros proyectos investigativos en reptiles y otras especies

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Estandarizar un protocolo de hibridación *in situ* para implementar su uso en el desarrollo de actividades investigativas en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander.

2.2 Objetivos Específicos

Sintetizar sondas específicas de hibridación *in situ* para localizar transcritos de β -actina.

Evaluar la efectividad de las sondas diseñadas para hibridación *in situ* en tejidos de hígado, ovario y músculo de *Mabuya*.

Localizar la presencia de transcritos de actina en muestras de hígado, ovario y músculo esquelético provenientes de hembras de *Mabuya*.

3. Competencias desarrolladas

3.1 Competencias conceptuales

Comprende el problema del macroproyecto y cómo aportará la metodología de hibridación *in situ* a su desarrollo.

Conoce los fundamentos de la metodología de hibridación *in situ* y los factores relevantes para su implementación en el laboratorio.

3.2 Competencias procedimentales

Aprende la anatomía interna de *Mabuya*, identificando sistemas y órganos, además, hace disecciones de los órganos y tejidos que se requieren para el trabajo.

Desarrolla habilidades en histotecnia para la realización de cortes histológicos de calidad.

Prepara correctamente las soluciones de trabajo identificando las cantidades y tiempos de acción de los reactivos usados que le permiten obtener resultados claros.

Crea estrategias de trabajo en el laboratorio que optimizan el tiempo y recursos utilizados.

Analiza los datos obtenidos y escribe un informe describiendo los detalles procedimentales estandarizados.

3.3 Competencias actitudinales

Toma conciencia de la importancia de las muestras biológicas utilizadas en el desarrollo del protocolo.

Se esfuerza por mejorar constantemente durante el desarrollo del proyecto.

4. Metodología

Para el desarrollo del protocolo de HIS, se tomó como referencia los protocolos realizados en la literatura (Nieto & Pate, 1996; Furusawa & Bustin, 2009; Lee et al., 2013; Kasai et al., 2016; Hua et al., 2018) sujetos a modificaciones usando la β -actina como molécula modelo. Adicionalmente, la preparación de las soluciones y especificaciones de los reactivos usados se encuentran en apéndice A.

Por último, se renomina a *Mabuya sp* candidata IV (Pinto-Sánchez et al., 2015) con la cual se trabajó durante el macroproyecto como *Marisora sp* (Hedges & Conn, 2012; Uetz et al., 2023). Por lo tanto, en el presente documento se referirá esta especie como *Marisora sp*.

4.1 Colecta de individuos

Los individuos para el macroproyecto fueron colectados manualmente en los municipios de Piedecuesta, Curití, Guapotá y San Gil en el departamento de Santander, Colombia bajo el Permiso de recolección de especímenes silvestres de la diversidad biológica para investigación científica no comercial, resolución 47 del 22 de enero de 2015 de la Autoridad Nacional Ambiental otorgado a la Universidad Industrial de Santander. Siendo ingresados y registrados en la colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad: UIS-MNH-R-4853-4856, 4894-4916, 4918-4919.

El manejo de los especímenes se ajustó a las directrices gubernamentales sobre el tratamiento ético de los animales y a toda la normativa aplicable, siguiendo las consideraciones del Comité de Cuidado y Uso de Animales Herpetológicos de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos (HACC) (Beaupre et al., 2004).

4.2 Eutanasia, Disección y almacenamiento de tejidos

Con el propósito de adquirir un entendimiento exhaustivo de las estructuras anatómicas esenciales se realizó inicialmente la disección de una hembra de *Anolis tropidogaster* colectada en el municipio de San Vicente de Chucurí, vereda Chanchón e ingresada al museo con el UIS- MHN-R 4918.

Teniendo como referencia anatómica a la hembra de *A. tropidogaster*, se diseccionaron los ejemplares recolectados. Todos los procesos desarrollados a continuación se llevaron a cabo bajo condiciones estériles y libres de RNAsas para evitar la contaminación de las muestras.

La eutanasia se realizó con una inyección de roxicaina al 2 % v/v en la médula espinal entre el atlas y el axis. Posteriormente, a través de una incisión ventral se tomaron muestras de 2mm de grosor de tejido ovárico, hígado y músculo esquelético, además de otros tejidos para estudios posteriores. Las muestras fueron almacenadas y fijadas de acuerdo con: 1. Tejidos para extracción de ARN (almacenamiento inmediato en crioviales estériles con RNAlater a -20 grados centígrados para evitar la degradación del ARN). 2. Los tejidos utilizados para histotecnica. Aquí se verificó que el diámetro de los tejidos no fuera mayor a 2 mm de grosor para su correcto procesamiento, siendo fijados en paraformaldehído tamponado al 4% v/v (PFA) por 12 horas, luego se conservaron en alcohol al 70% grado molecular hasta su posterior uso.

Para las hembras encontradas en etapa de preñez, se determinaron los estados de desarrollo de los embriones/fetos localizados en las cámaras embrionarias, de acuerdo con la tabla propuesta por Dufaure & Hubert (1961) siendo almacenadas en RNAlater y PFA al 4%.

4.3 Preparación de sondas de ARN marcadas

La preparación de la sonda se desarrolló de acuerdo con la literatura (Kidner & Timmermans, 2006; Furusawa & Bustin, 2009; Lee et al., 2013; Zimmerman et al., 2013; Hua et al., 2018; Narayanan & Oates, 2019). La figura 1 muestra el procedimiento del primer día y la figura 2 el correspondiente al segundo día de la síntesis.

4.3.1 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

Debido a la inestabilidad del ARN se hicieron todos los procesos mencionados a continuación en el menor tiempo posible y bajo cabina de extracción para evitar su degradación o contaminación.

La extracción de ARN de hígado se realizó usando el *kit direct-zol™ RNA miniprep* de la empresa Zymo research, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para determinar la pureza y concentración del ARN extraído, se midieron las muestras en un implem Nanofotometro® NP80, el cual nos arrojó valores de concentración (ng/μl) y la proporción de absorbancia (Abs) 260/280 y 260/230; valores usados posteriormente para calcular la cantidad de muestra necesaria en la síntesis de cDNA, para una concentración final de 1000 ng por muestra. Adicionalmente, se observó la integridad del ARN por medio de electroforesis al 1.5% en gel de agarosa-TAE usando el tinte *SafeView™ classic* a 120 voltios por 20 minutos.

La síntesis del cDNA se hizo con el *Kit verso cDNA synthesis* de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los productos finales fueron almacenados bajo refrigeración a -20 °C.

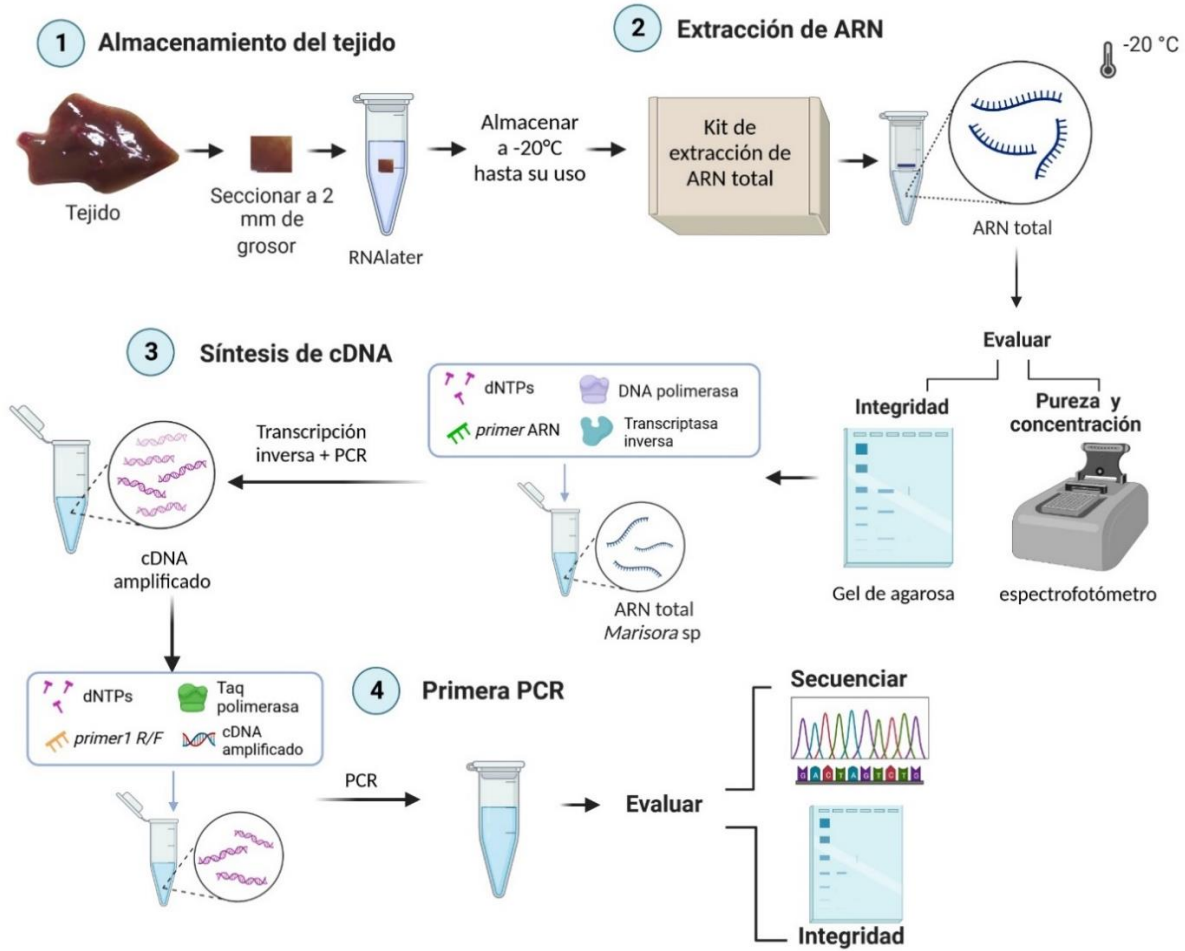
4.3.2 Diseño de Primers de β- actina

Los *primer* fueron diseñados a partir del transcriptoma de la placenta de *Marisora sp* publicada por Cornelis et al. (2017) usando el software online primer 3 (Untergasser et al., 2012) y el programa primer-blast del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) de los EE. UU (Ye et al., 2012).

Se evaluó la temperatura de fusión (Tm), el contenido de G/C y el grado de la autocomplementariedad. Finalmente, se diseñaron tres sets de *primers*, cada uno con la secuencia de estudio *forward - reverse* y adicionalmente, un set con la secuencia del transcriptoma más las secuencias promotoras de la polimerasa Sp6 y T7 respectivamente (Tabla 1).

Figura 1.

Día 1: síntesis de la sonda



Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología del primer día para la síntesis de sonda específica. Se enumeran los principales pasos a seguir y su ruta de ejecución. Creado con BioRender.com.

4.3.3 Síntesis de secuencias mediante la polimerasa en cadena (PCR)

Se realizó una primera amplificación PCR del cDNA sintetizado en el paso anterior, para corroborar su calidad con los *primer* diseñados para β -actina (Actina-1 F/R, actina-2 F/R y Actina-ex6 F/R).

Tabla 1

Lista de primers diseñados con sus respectivas secuencias

Marcador	Nombre del primer	Secuencia (5' - 3')	Amplicon	Tm	Start/stop
B-Actina	B-actina-Mabuya1F	GAGGTATCCTGACCCTGAAAGTA	618	62	329-926
B-Actina	β Act+SP6+Mabuya1F	ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGGAGGTATCCTGACCCTGAAAGTA			
B-Actina	B-actina-Mabuya1R	CCAAGAAAGAAGGCTGGAAGA	618	62	
B-Actina	β Act+T7+ Mabuya 1R	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCCAAGAAAGAAGGCTGGAAGA			
B-Actina	B-actina-Mabuya2F	CCGTGACTTGACCGACTACC	665	60	690-1335
B-Actina	β Act+SP6+Mabuya2F	ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGCCGTGACTTGACCGACTACC			
B-Actina	B-actina-Mabuya2R	ACGCGCAGTTATGGGTTTTG	665	60	
B-Actina	β Act+T7+Mabuya2R	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGACGCGCAGTTATGGGTTTTG			
B-Actina	B-actina-MabuyaEx6F	CAACCAACCAGGACTAGTTACC	580	62	1284-1864
B-Actina	β Act+SP6+MabuyaEx6F	ACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGCAACCAACCAGGACTAGTTACC			
B-Actina	B-actina-MabuyaEx6R	GACTGCAAGCCTTCACATCTA	580	62	
B-Actina	β Act+T7+MabuyaEx6R	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGGACTGCAAGCCTTCACATCTA			

Nota. Los *primers* se encuentran agrupados por colores de acuerdo con las secuencias que se usaron para su síntesis, adicional se muestra la temperatura de fusión (Tm) recomendada por el software y el amplicón. Se denota en negrilla las secuencias promotoras Sp6 y T7.

El volumen total de reacción fue de 20 μ l y contenía 2 μ l 1 x de buffer, 0.4 μ l 0.2 mM de dNTPs, 1 μ l 0.5 μ M Primer sentido y antisentido, 1 μ l 1.25 mM MgSO₄, 0.4 μ l 0.1 U/ μ l de polimerasa, 15 ng de cDNA y 13.7 μ l ddH₂O. La amplificación se realizó por 3 minutos a 94 °C, seguido de 34 ciclos en donde cada uno consiste en 32 segundos a 94 °C, 38 seg a 48°C y 38 seg a 72°C; con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos resultantes fueron corroborados con gel de agarosa-TAE al 1% a 70 voltios por 45 minutos usando el tinte *HydraGreen™ Safe DNA Dye*.

Las amplificaciones exitosas fueron enviadas a secuenciar en Macrogen, Corea. Los cromatogramas resultantes fueron analizados por medio del software Ugene. Después se comparó

las secuencias resultantes con la base de datos digital disponible en *Basic Local Alignment Search Tool* (Blast).

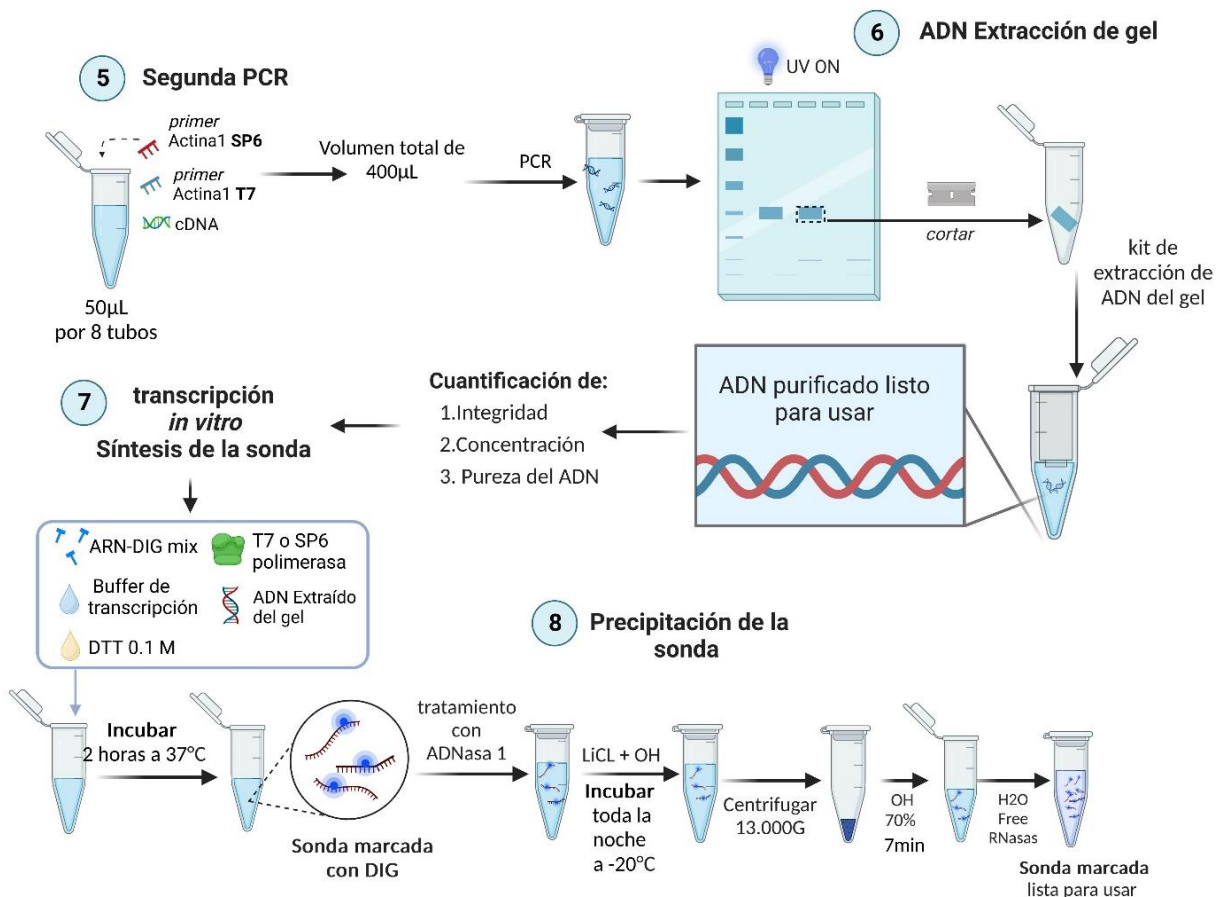
4.3.4 Segunda PCR

Una vez corroboradas los amplicones por secuenciación, se llevó a cabo una segunda PCR con los *primer* que contenían las secuencias de reconocimiento Sp6 y T7, manteniendo las mismas características de la primera PCR, pero con un volumen final de 400 µl para cada par de *primers*.

Los 400 µl de cada amplicon se montaron en dos pozos de gran profundidad de gel de agarosa-TAE al 1 % y se corrió a 70 V por 1h y 15 min. Después se hizo la extracción de la banda obtenida usando el kit *Invisorb® fragment cleanup*, como se muestra en la figura 2, el ADN resultante fue el que se usó para la síntesis de la sonda.

Figura 2

Día 2: síntesis de la sonda



Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología del segundo día para la síntesis de sonda. Creado con BioRender.com

4.3.5 Síntesis de sonda de ARN marcada con DIG

La reacción de transcripción *in vitro* para la síntesis de la sonda constó de: 2 µl 1 x de buffer de transcripción, 2 µl 1 x mix de NTPs marcados con DIG, 0.5 µl 0.05 U/µl de inhibidor de RNasas, 4 µl 2 U/µl de ARN polimerasa (SP6 o T7), 2 µl 250 ng del ADN purificado del gel, 0.4 µl 0.1 M de DTT y 11.1 µl de ddH₂O para un volumen total de 20 µl. La reacción se incubó a 37°C por 2h. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 2 µl para su posterior revisión.

La precipitación de la sonda se realizó con 10 µl de cloruro de litio al 0.3 M, 100 µl de ddH₂O y 300 µl de etanol al 100% grado molecular durante toda la noche.

Después, se centrifugó a 13.000g por 15 min y se extrajo el sobrenadante. El pellet se resuspendió con 10 µl etanol al 70% grado molecular, dejándolo evaporar bajo cabina de extracción por aproximadamente 7 minutos. Finalmente se agregó 20 µl de ddH₂O. Se tomó una alícuota de 2 µl y junto con la alícuota anterior se cuantificó y se corrieron las muestras en gel de agarosa al 1.5% por 20min.

4.3.6 Análisis de dot blot

Con el fin de estimar la concentración, eficiencia y correcta incorporación de los DIG-UTPs a la sonda se realizó un análisis de *dot blot*. Para el análisis se prepararon diferentes diluciones en serie de la sonda de 10^{-1} hasta 10^{-5} con ddH₂O. Debido a que el ARN no es estable, se realizó el análisis inmediatamente después de preparar las diluciones.

Se colocó 1 µl de cada dilución en una membrana de nailon y se fijó el ARN a la membrana mediante microondas 700W por 4 min. Después, se lavó con PBT 1X durante 30 seg. Una vez transcurrido el tiempo se incubó la membrana con el buffer de bloqueo goat serum (abcam) durante 30 min y después con una solución de Anti-dioxigenina-AP, roche (1:500) por 30 min. Se lavó la membrana dos veces con PBT 1x durante 15min. Para equilibrar la membrana se lavó con buffer de detección por 5 min (ver apéndice 1 para la preparación de las soluciones).

Para el paso siguiente fue necesario preparar el sustrato de color lo más fresco posible a una dilución 1:133 para el INT/BCIP y 1:50 para el NBT/BCIP, preparando el volumen necesario para cubrir la muestra de manera adecuada. Este paso se realizó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h.

Finalmente, se detuvo la reacción con agua desionizada y se observó bajo estereoscopio.

4.4 Cortes histológicos

Para el correcto procesamiento de los cortes histológicos se realizó la deshidratación e inclusión del tejido lo más pronto posible, una vez realizada su fijación. El procedimiento se ilustra detalladamente en la figura 3.

4.4.1 Deshidratación de tejidos, aclaramiento, inclusión en parafina y seccionamiento

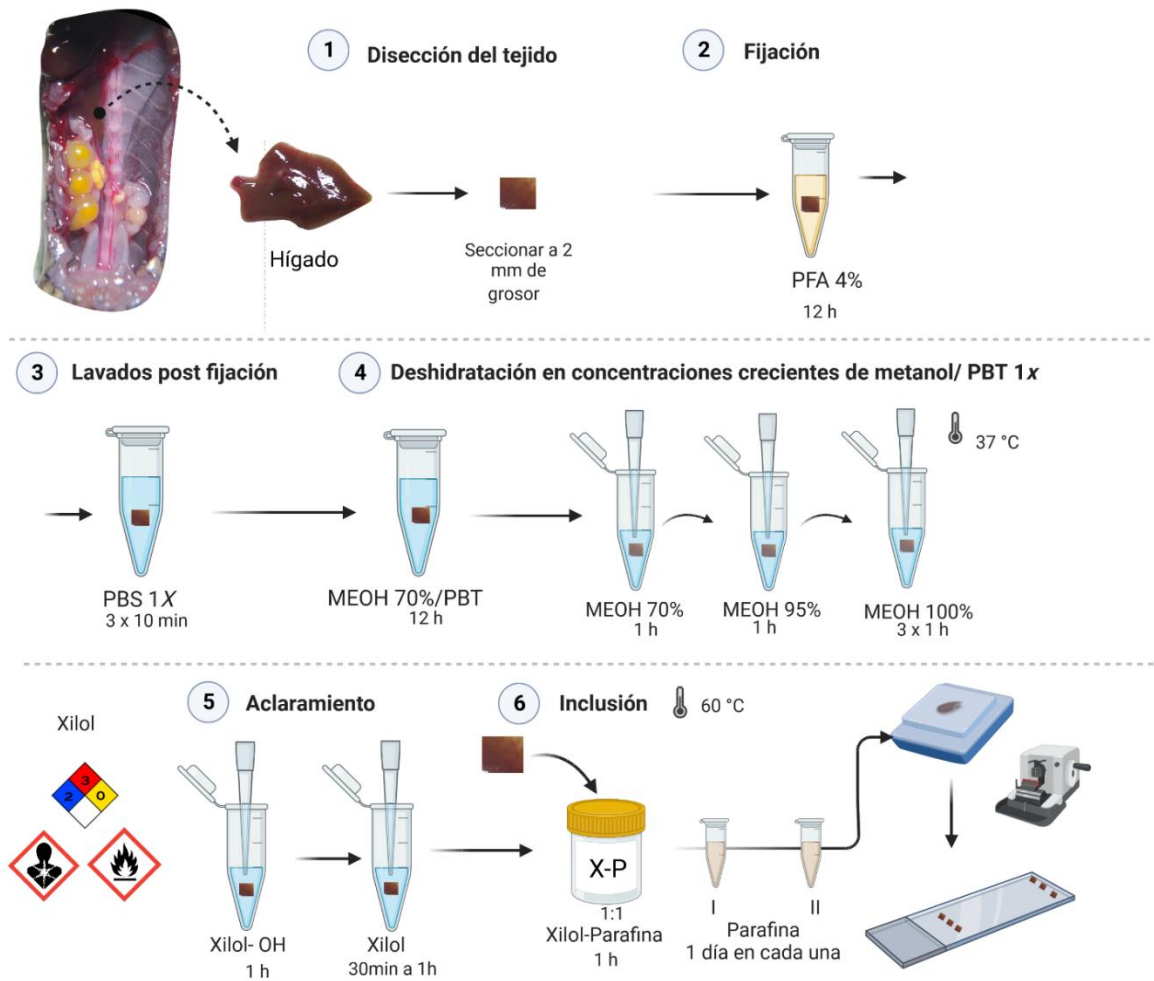
Transcurrido el tiempo de fijación, las muestras se lavaron con PBS 1x hasta eliminar residuos del fijador.

La deshidratación se realizó con soluciones de metanol en PBT 1x a concentraciones crecientes hasta metanol puro. Los tiempos y concentraciones se ilustran detalladamente en el diagrama excepto el tiempo en xilol puro (paso posterior a la deshidratación, conocido como aclaramiento), ya que este varía de acuerdo con el tipo de tejido. Para este caso se dejó 30 minutos el músculo esquelético y 60 minutos el ovario e hígado.

Punto crítico: Es recomendable hacer una prueba inicial con los tejidos para estimar el tiempo idóneo en xilol para cada uno, se recomienda realizar un ensayo general donde solo se varíe el tiempo en xilol (15 min, 30 min, 45 min y 1h).

Figura 3

Cortes histológicos



Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología para la realización de cortes histológicos en parafina. Es importante tener presente las precauciones necesarias al trabajar con xilol puro. Creado con BioRender.com.

Una vez desarrollados los pasos anteriores se realizó la inclusión en parafina, inicialmente con xilol- parafina a una proporción 1:1 y después con parafina líquida a una temperatura de 60°C. Los cortes histológicos se hicieron de 5 a 10 µm de grosor, usando un micrótopo rotatorio.

Para la correcta adherencia del tejido a la lámina de micropreparado, se trataron las láminas con (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) al 2%.

Después de hacer el montaje de la muestra a la lámina con agua libre de RNasa se incubó el tejido a 37°C por 4 h.

La tinción de los tejidos con eosina y hematoxilina se realizó de acuerdo con Cardiff et al. (2014) para evidenciar la morfología celular y corroborar el proceso de inclusión.

4.5 Tratamientos de prehibridación e hibridación

Las láminas se desparafinaron con xilol puro para luego rehidratarlas en concentraciones decrecientes de metanol en PBS. En la figura 4 se muestra el procedimiento correspondiente al primer día de prehibridación e hibridación de los cortes.

El marcador hidrófobo A-PAP PEN z377821-1EA sirvió para la delimitación del corte (dejándolo secar por 1 minuto). Después, se preparó el tejido para el tratamiento con proteinasa K a una concentración de 5µg/ml por 20min. Para finalmente deshidratar el tejido y realizar la prehibridación e hibridación.

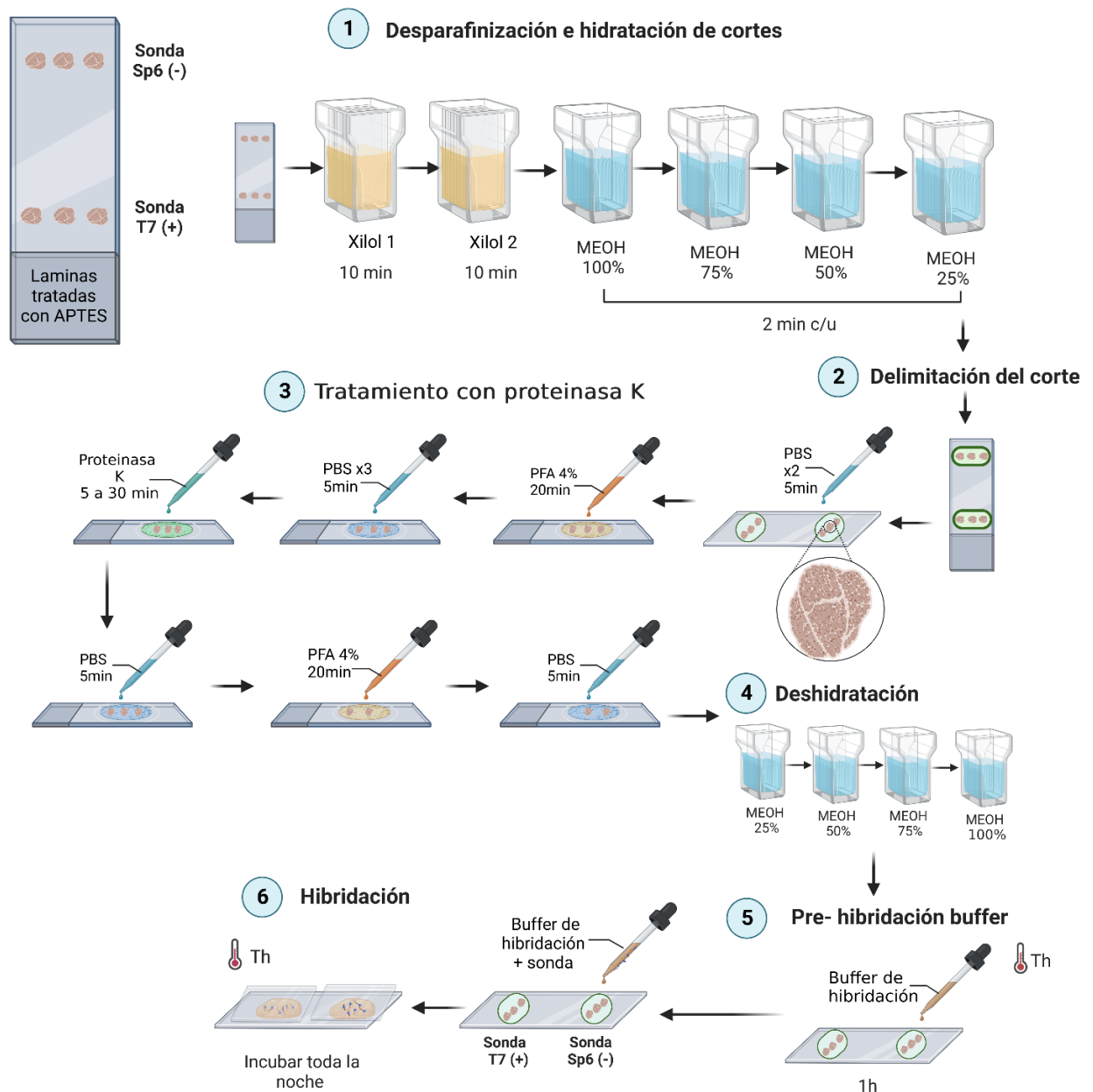
La prehibridación inició con el buffer de hibridación sin sonda y se incubó a la temperatura de hibridación (Th) por 1 h. Para la hibridación del corte, primero se realizó un paso de desnaturalización de la sonda a 80°C por 5 min y después se almacenó inmediatamente a -20°C por 5 minutos.

La incubación de las muestras se hizo toda la noche a la Th, con el buffer de hibridación más sonda a la concentración final indicada por el *dot blot* para cada sonda.

Punto crítico: Para evitar la evaporación del buffer de hibridación con la sonda se colocó una lámina de vidrio encima de la solución evitando la aparición o presencia de burbujas.

Figura 4

Día 1: pre-hibridación



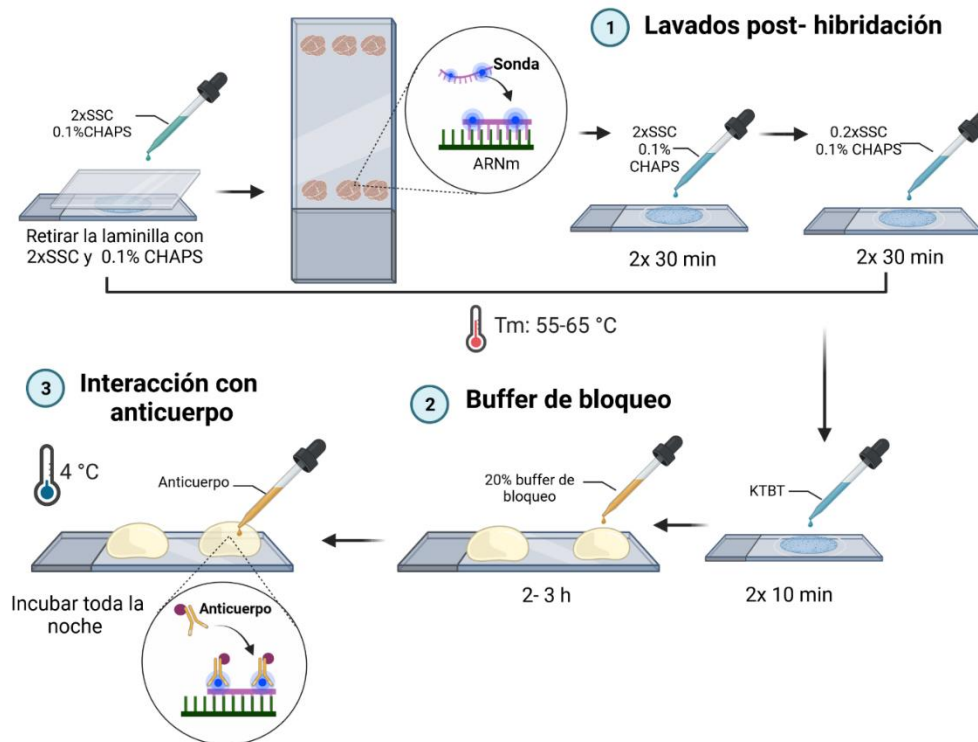
Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología de la pre-hibridación e hibridación. En el diagrama se muestra la correcta ubicación de los cortes (horizontal) y su delimitación. La incubación del corte se realizó con ayuda de laminillas de vidrio estériles encima del corte. Creado con BioRender.com.

4.6 Lavados post-hibridación y detección de la señal

Trascurrido el tiempo de incubación los cortes se lavaron a una temperatura superior de la hibridación para eliminar residuos de la sonda (Fig. 5). Luego, se incubaron las láminas con el buffer de bloqueo por 2 a 3 h, evitando que la lámina se seque. Finalmente se realizó la interacción con el anticuerpo (1:500) toda la noche a 4 °C.

Figura 5

Día 2: lavados post-hibridación e interacción con anticuerpo Anti-DIG



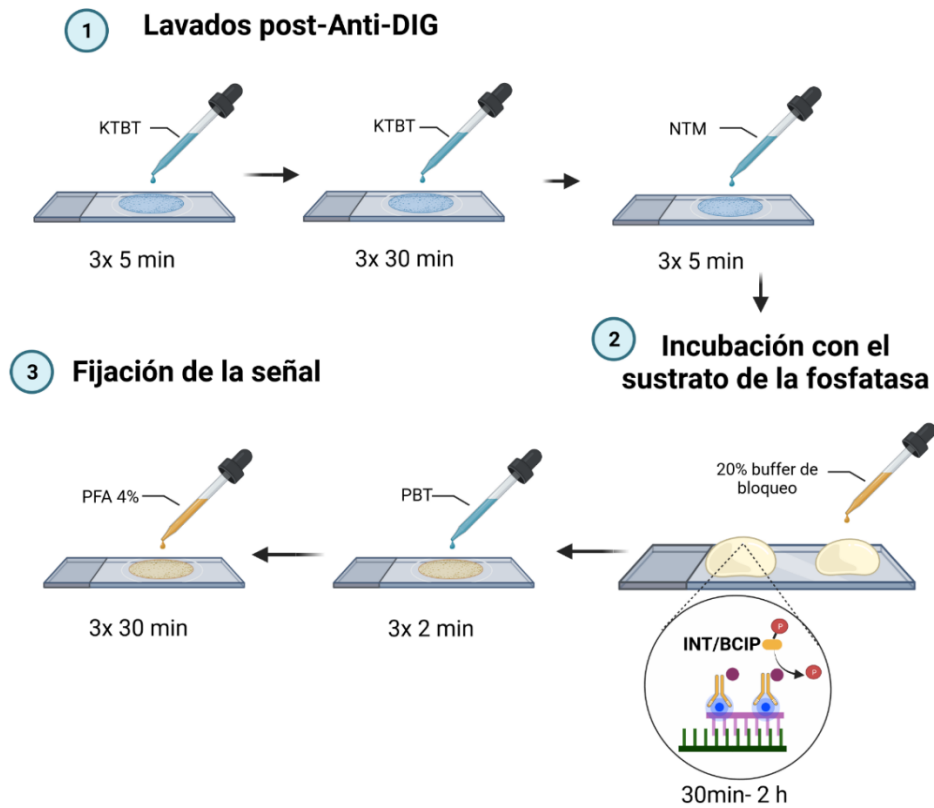
Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología de post-hibridación e interacción con anticuerpo. Creado con BioRender.com

Al día siguiente se volvió a lavar los residuos de anticuerpos no fijados con KTBT (apéndice 1) y se realizó la interacción con el sustrato de la fosfatasa INT/BCIP una dilución de 1:133 en la oscuridad, siendo monitoreado cada 30 min hasta ver señal (Fig. 6).

Punto crítico: El sustrato es fotosensible así que se debe tener precaución con la exposición de la luz y que la lámina no se seque.

Figura 6

Día 3: incubación con el sustrato de fosfato y la fijación de la señal



Nota. El gráfico representa el diagrama de flujo correspondiente a la metodología de incubación con el sustrato de fosfato y fijación de señal. Creado con BioRender.com

Finalmente, se lavaron los residuos del sustrato y se fijó la señal con PFA 4%.

El registro fotográfico se realizó bajo microscopio inmediatamente después de fijar la señal, debido a su corta duración.

5. Resultados

5.1 Colecta de individuos

Se recolectó un total de 22 hembras y 5 machos del género *Marisora sp* especie IV de Pinto et al. (2015). Además de una hembra *A. tropidogaster* del municipio de San Vicente de Chucurí, vereda Chanchón.

La colecta manual se llevó a cabo durante todo el macroproyecto (figura 7).

Figura 7

Colecta de ejemplares en campo y mantenimiento durante el transporte al laboratorio



5.2 Disección y almacenamiento de tejidos

Se logró identificar con precisión las estructuras de interés y resaltar las variaciones observadas en el sistema reproductivo de hembras de *Marisora sp* en comparación con *A. tropidogaster*.

Se muestra la gran diferencia que existe en la morfología de los huevos dentro del oviducto de las dos especies. En *Anolis* se presenta un desarrollo asincrónico y con abundante cantidad de yema (Fig. 8A), mientras que en *Marisora* los huevos oviductales son sincrónicos y con poca cantidad de yema (Fig. 8B). Además, se procedió a la identificación de los músculos que fueron objeto de estudio, todos ubicados en las extremidades inferiores. Concretamente, se usó el *sartorio*, el *aductor magno* y el *gracilis mayor*. Para una representación visual y detallada de estos músculos, consultar la figura 8, sección A.

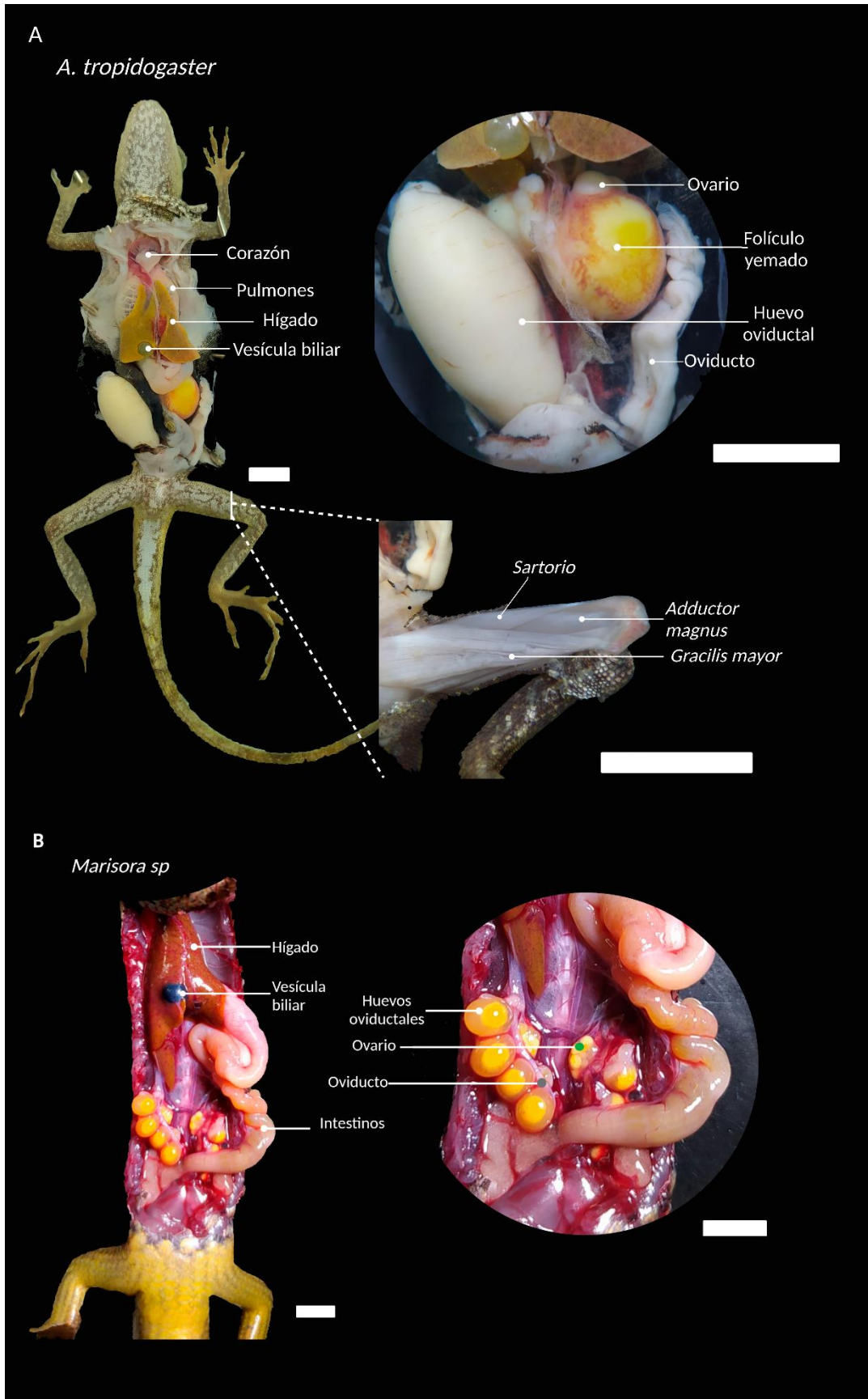
5.3 Preparación de sondas de ARN marcadas

Se realizó un total de 18 extracciones de ARN provenientes de *Marisora* de muy buena calidad. Con valores de abs de 1.720 a 2.2 en proporción 260/280 y 1.88 a 2.31 en proporción 260/230 (Fig.9A). Con respecto a las concentraciones se obtuvo un resultado muy variable en todas las extracciones, sin embargo, el menor valor reportado fue 37.640 ng/ μ l y el mayor 926.32 ng/ μ l. Para cada extracción se evaluó la integridad, en los casos exitosos se observó las bandas correspondientes a las subunidades 18s y 28s (Fig. 9B).

En la figura 10, sección A se observa la corroboración exitosa del cDNA sintetizado a partir de ARN proveniente de *Marisora*, ya que se muestra una única banda correspondiente a los respectivos amplificados de los *primers* de actina 1 y actina 2.

Figura 8

Diseción e identificación de estructuras

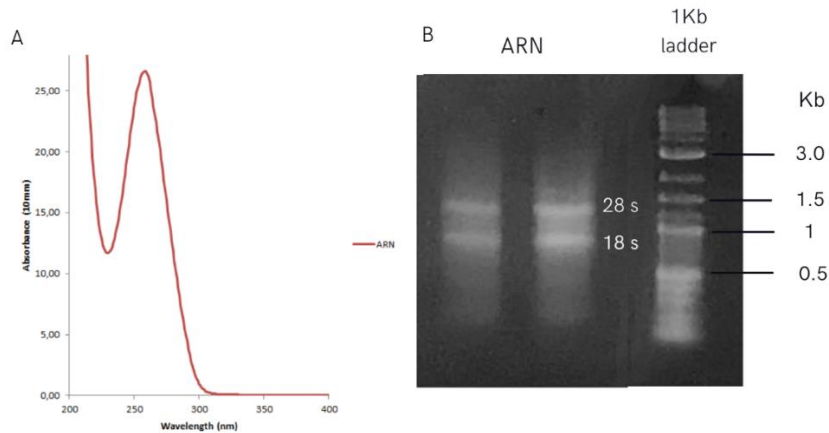


Nota. El gráfico muestra la disección de dos hembras del género *A. tropidogaster* (A) y *Marisora* sp (B). Se observa la diferencia que existe en el tamaño y estado de los huevos en el oviducto.

Escala a 0.5 cm.

Figura 9

Extracción de ARN



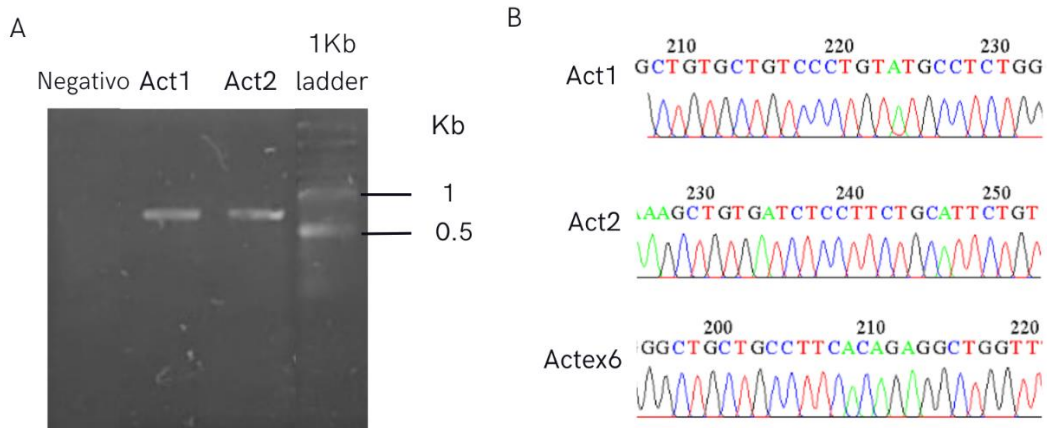
Nota. A. curva de absorbancia resultante del análisis de espectrofotometría correspondiente a muestra de ARN. B. Electroforesis en gel de agarosa de ARN proveniente de *Marisora*.

La figura 10 ítem B, corresponde a un fragmento de los cromatogramas resultantes de la secuenciación de cada amplificado de actina. Se obtuvo cromatogramas de buena calidad, con picos bien definidos para cada base nitrogenada.

El análisis de *BLAST* para cada amplicón secuenciado mostró para el *primer* act1 un porcentaje de identidad del 92% con secuencias predichas de actina de *Python bivittatus* y β - actina de *Pogona vitticeps*. Para la actina 2, el porcentaje de identidad fue del 92 % con secuencias predichas de *Mesitornis unicolor* y *Pterocles gutturalis* y en actina exón 6 un 76% de identidad para secuencias predichas de β - actina en *Pogona vitticeps*.

Figura 10

Amplificados de β-actina y cromatogramas



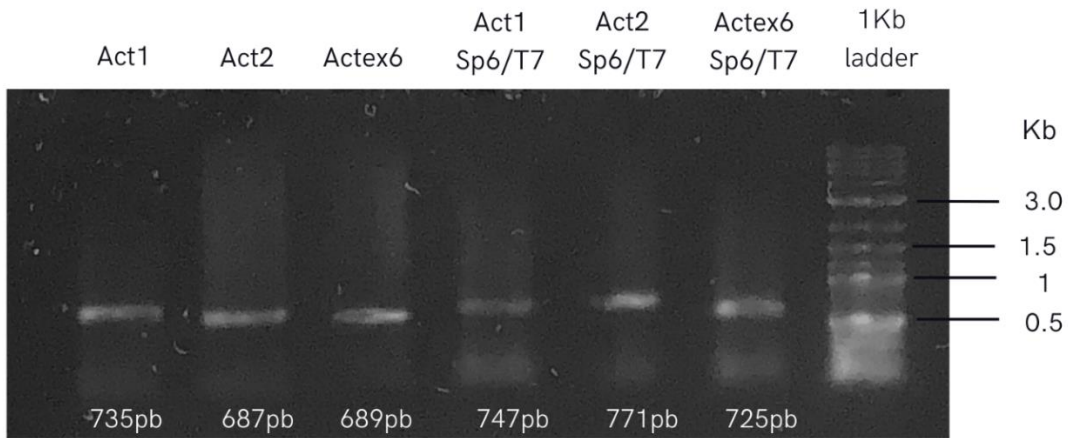
El tamaño de los amplificados resultantes de la PCR para cada set de *primers* se observan en la figura 11. Para la actina 1 es de 735 pb y 747 pb con las secuencias sp6 y T7, para la actina 2 de 687 pb y 771 pb con las secuencias de reconocimientos y para actina-ex6 689 pb y 725 pb respectivamente.

La prueba de dilución del cDNA se muestra en la figura 12, de acuerdo a este resultado la dilución óptima con la que se trabajó fue de 1:5. Por otro lado, la PCR de 400 µl para cada *primer* se muestra en la figura 13. Se observa bandas intensas distribuidas en cuatro pozos.

En total se realizaron 12 extracciones de ADN en gel agarosa con concentraciones finales que iban de 6.3 ng/ µl para el menor valor y 40 ng/ µl para el mayor. Sin embargo, el valor más común de concentración final fue de 10 a 20 ng/ µl. En la figura 13 se muestra las concentraciones finales del ADN resultante de las tres extracciones con cada set de *primer*.

Figura 11

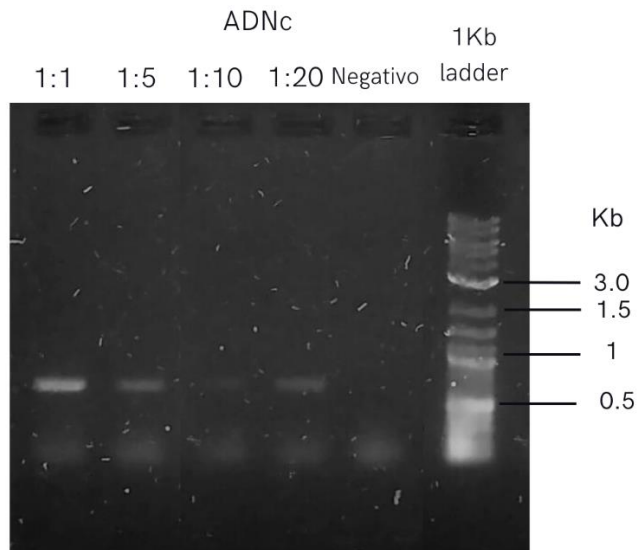
Amplificados de β- actina con cada set de primers



Nota. Se muestra comparativamente el tamaño en pares de bases de los amplificados resultantes de la PCR con sus respectivos *primers* con y sin la secuencia de reconocimiento.

Figura 12

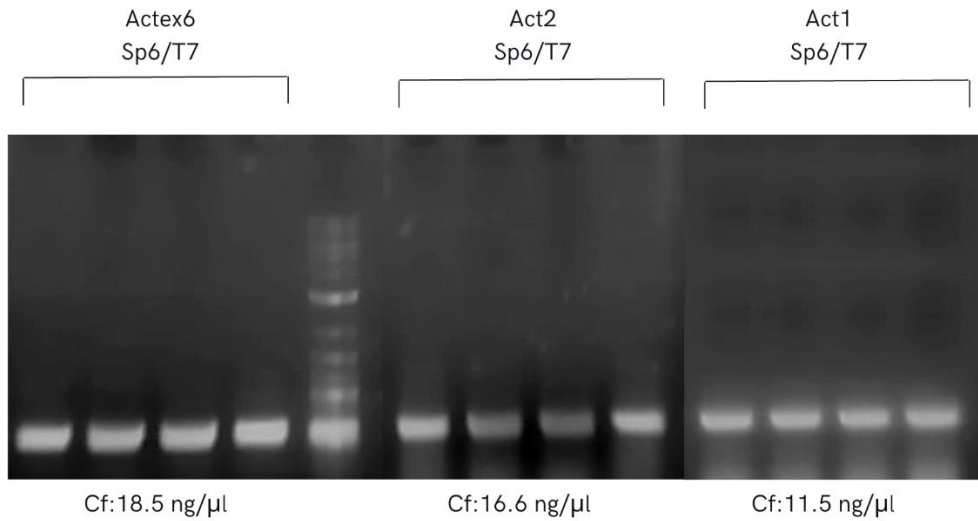
Dilución del cDNA



Nota. Se muestra de izquierda a derecha la secuencia de diluciones de menor a mayor del cDNA sintetizado. En la parte inferior se encuentra el barrido de dNTPs y residuos de la PCR no amplificadas.

Figura 13

PCR extracción de gel

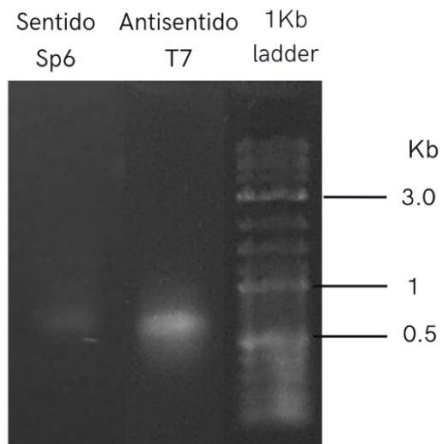


Nota. Electroforesis al 1% de amplificados para cada set de *primer* con volumen final de 400 μ l. En la parte inferior se muestra la concentración final (Cf) de cada amplificado luego de la extracción del gel.

La electroforesis correspondiente a la transcripción *in vitro* de la sonda de ARN de β - actina se muestra en la figura 14.

Figura 14

Electroforesis de la Sonda



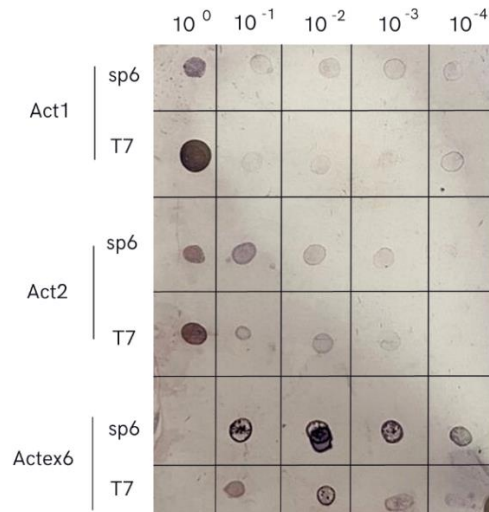
Nota. Electroforesis en gel de agarosa de la sonda de ARN Sp6 y T7 proveniente de ADN extraído amplificado con los *primers* de actina 1.

Debido a que un aspecto fundamente en la hibridación *in situ* es la evaluación precisa de las sondas empleadas, se dedicó especial atención a la pureza y concentración de las sondas sintetizadas para garantizar la confiabilidad de los resultados que obtenemos.

Con respecto a la pureza de las sondas, los valores obtenidos muestran cierta coherencia. La relación 260/280, que es un indicador importante de pureza, osciló entre 1.78 y 2.054. De manera similar, la relación 260/230, que también contribuye a evaluar la pureza, se mantuvo en un rango de 1.788 a 1.886. Estos resultados indican que las sondas tienen una pureza aceptable y que es poco probable que haya interferencias durante el proceso de hibridación.

En cuanto a la concentración, hubo diferencias notables según el tipo específico de sonda. Por ejemplo, en el caso de la sonda de actina 1 en su orientación sentido Sp6 su concentración fue en promedio de 85.840 ng/μl. En contraste, la sonda anti-sentido T7 presentó una concentración significativamente mayor, con un valor promedio de 641.200 ng/μl. En el caso de la sonda de actina 2 en orientación Sp6, la concentración fue de aproximadamente 45.520 ng/μl, mientras que en la orientación T7 estuvo alrededor de 193.720 ng/μl. Finalmente, la sonda actina-ex6 mostró concentraciones de 233.44 ng/μl y 999.6 ng/μl en las orientaciones Sp6 y T7, respectivamente.

En la figura 15, se observa los resultados de la prueba de *dot blot* específica para cada sonda. La presencia de color oscuro en la menor concentración muestra la dilución idónea con la cual la sonda interaccionará correctamente en la hibridación. Para la actina 1 se trabajó con una dilución intermedia entre la inicial 10^0 y 10^{-1} , para la actina 2 Sp6 se trabajó con una concentración de 4.5 ng/μl y 19.3 ng/μl para T7, es decir la dilución 10^{-1} . Para la actina-ex6 2.3 ng/μl para Sp6 y 9.9 ng/μl para T7.

Figura 15*Prueba dot blot*

Nota. Prueba de concentración e integridad de la sonda. Los valores en la parte superior corresponden a la dilución de cada sonda, siendo 10^0 el corresponde a la concentración inicial de cada una, por ejemplo, para la actina 1 sp6 este valor corresponde a 85.840 ng/ μ l y 10^{-4} una dilución 1: 10000.

5.4 Tratamientos de prehibridación e hibridación

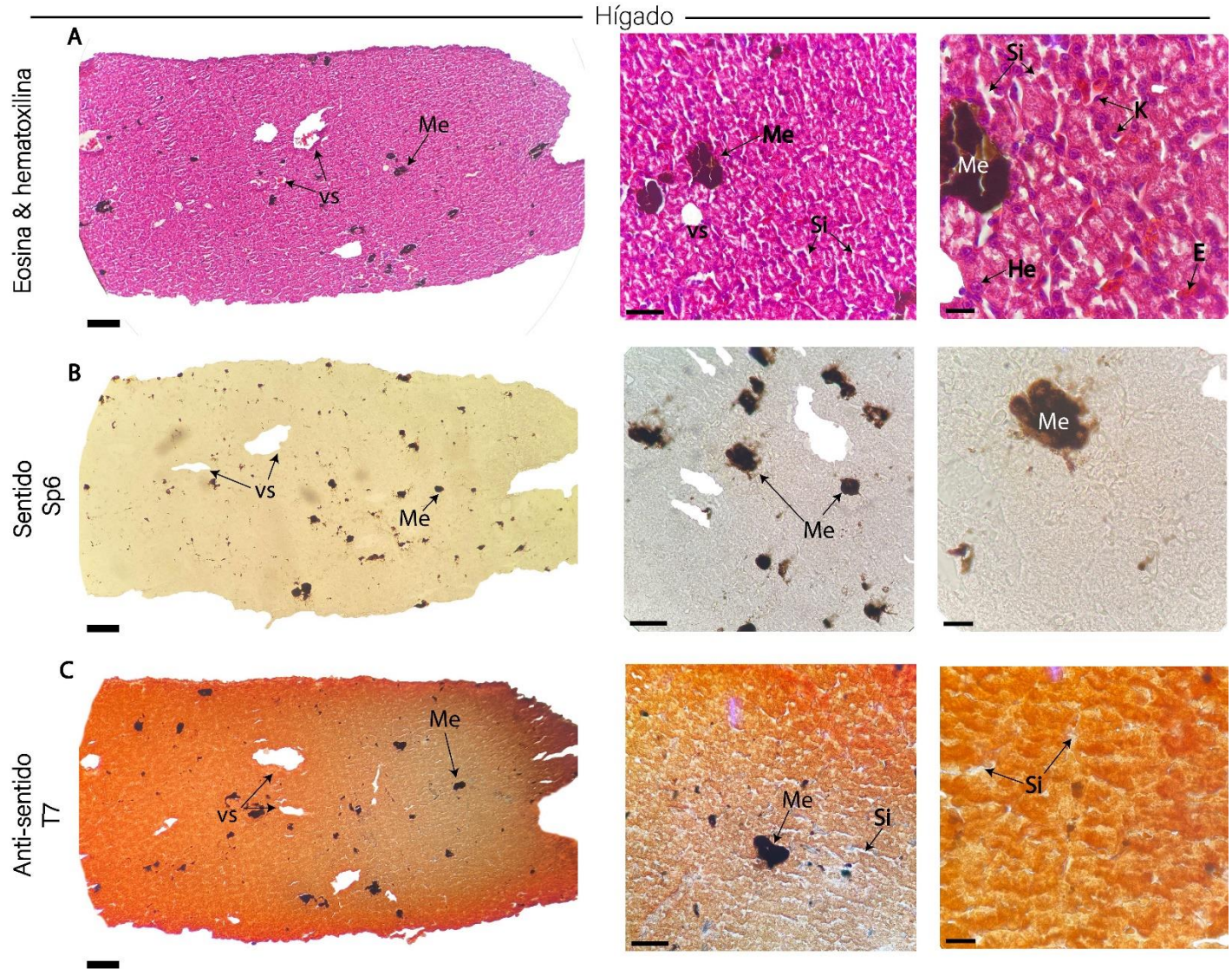
En total se hicieron 14 hibridaciones no exitosas (apéndice B), en donde se evaluó la concentración y tiempo en proteinasa K, la temperatura de hibridación, la temperatura y tiempos de lavados post-hibridación, la concentración de anticuerpo, el tiempo y concentración del sustrato y la concentración de la sonda. Aunque se diseñaron y sintetizaron tres sets de sondas utilizando diferentes *primers* específicos para la β -actina, al realizar las pruebas de HIS, solo las sondas del set de Actina1 generó resultados positivos detectables en los tejidos, estos resultados se observan en las figuras 16, 17 y 18, sección C. Las tonalidades de naranja y amarillo corresponden a la

presencia de transcritos de β -actina en el corte. En el hígado su presencia se concentró en las células hepáticas y hepatocitos, para el ovario fue en todo el corte, con pigmentos más oscuros en la teca y lecho germinal, mientras que en el músculo se observó principalmente en el tejido conjuntivo y fibroblastos.

El tratamiento de proteinasa k se realizó a una concentración de 5 μ g/ml por 20 minutos para cada tejido. La temperatura de hibridación fue de 40°C con lavados de 55°C, la proporción de anticuerpo 1:500 y la dilución del sustrato 1:133 de INT/BCIP dejándolo actuar por 4 horas.

Figura 16

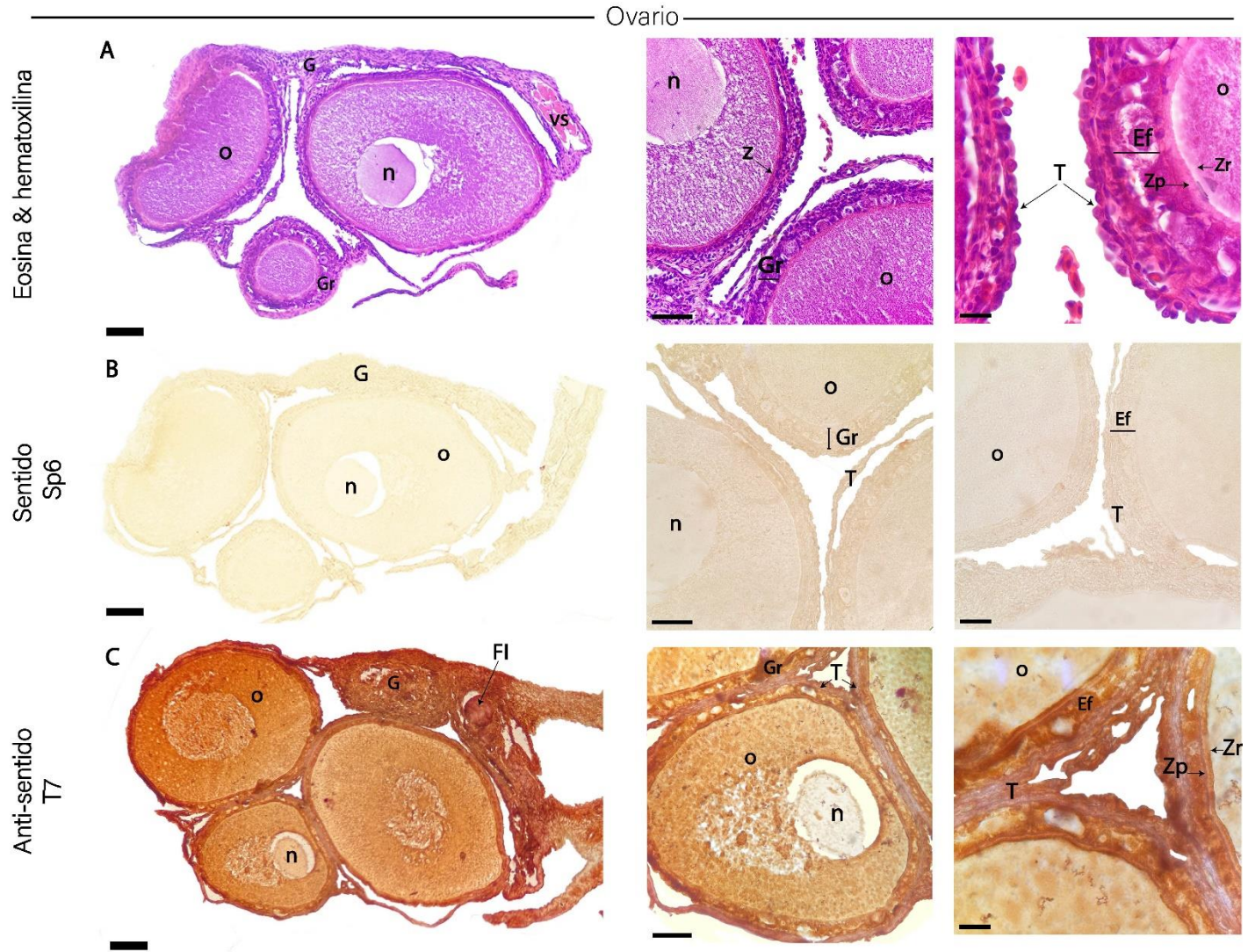
Histología y expresión de β - actina en hígado de Marisora sp



Nota. Corte histológico de hígado. A. corresponde la tinción de eosina y hematoxilina, se muestran las principales estructuras y células. B. hibridación *in situ* de la sonda Sp6, control negativo. C. hibridación *in situ* control positivo. Me: agregado de melanomacrófagos, vs: vasos sanguíneos, E: eritrocitos, He:hepatocitos, Si: espacio sinusoides y K: células de Kupffer. Las escalas son de 100µm, 50µm y 10µm de izquierda a derecha respectivamente.

Figura 17

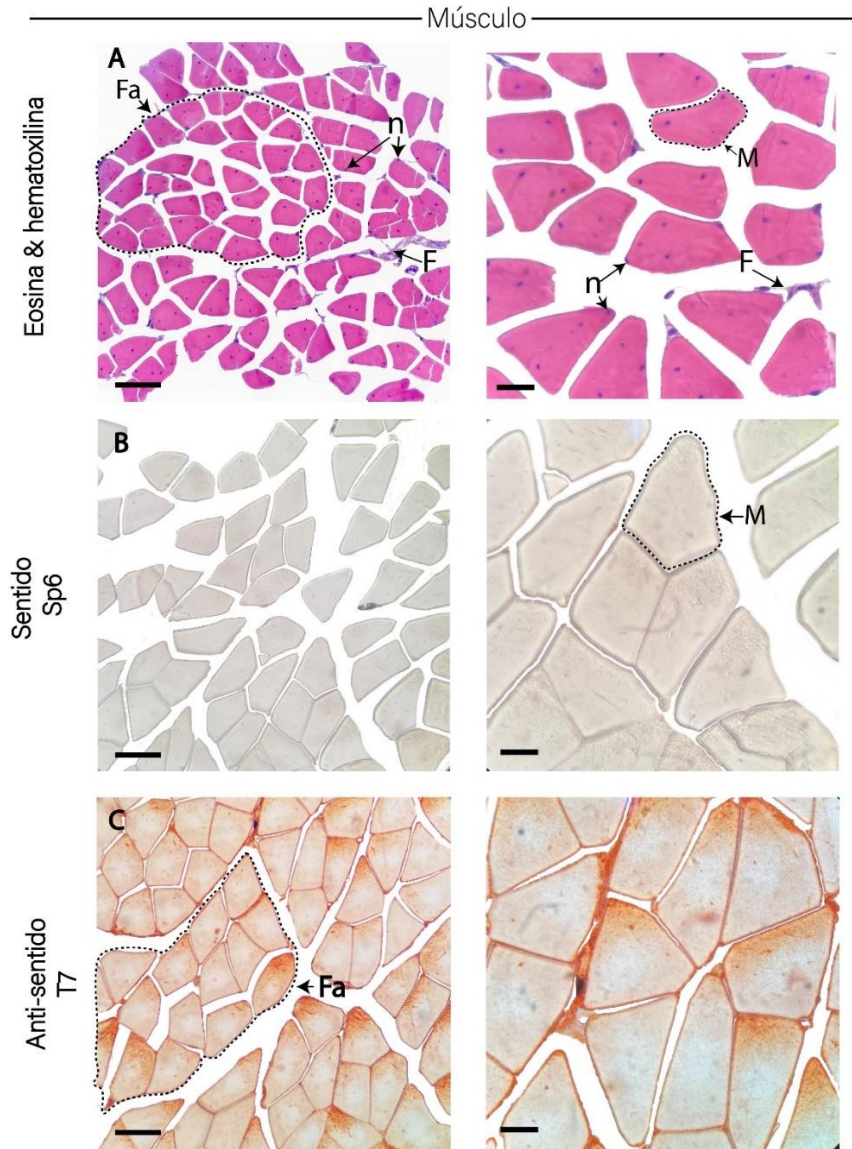
Histología y expresión de β - actina en ovario de Marisora



Nota. Corte histológico de ovario. A. Tinción de eosina y hematoxilina. B. Control negativo hibridación *in situ* sonda Sp6. C. hibridación *in situ* de β - actina. O: ooplasma, n: núcleo, vs: vaso sanguíneo, G: línea germinal, Fi: folículo primario, Gr: células de la granulosa, Z: zona pelúcida, T: teca, Ef: epitelio folicular, Zp: zona pelúcida y Zr: zona radiata. Las escalas corresponden a 100µm, 50µm y 10µm de izquierda a derecha respectivamente.

Figura 18

Histología y expresión de β - actina en músculo de Marisora



Nota. Corte histológico transversal de músculo. A. Tinción de eosina y hematoxilina. B. Control negativo hibridación *in situ* sonda Sp6. C. hibridación *in situ* T7 de β - actina. Fa: fascículo muscular rodeado de perimysio, n: núcleo, M: miocito/ célula muscular rodeada de endomysio, F: fibroblastos. Las escalas corresponden a 100 μ m, 50 μ m y 10 μ de izquierda a derecha respectivamente.

6. Discusión

La β -actina es una proteína altamente conservada y esencial en la función celular, la cual desempeña roles claves en los eucariotas (Xie & Percipalle, 2018) como la dinámica cromosómica, la activación, regulación y represión de programas génicos (Xie et al., 2018), la estructura y función del citoesqueleto, así como en la organización citoplasmática para generar fuerzas mecánicas (Guirado et al., 2018), el movimiento celular y transporte celular, interacciones proteicas, entre otros (Schmidt & Hall, 1998; Lifland et al., 2011; Lin & Redies, 2012). El presente documento muestra la estandarización de un protocolo de hibridación *in situ* para la preparación de sonda de ARN marcada con DIG a base de amplificadores de PCR y su implementación en cortes histológicos de hígado, ovario y músculo esquelético. La implementación de técnicas como la HIS en *Marisora* es de suma importancia en futuras investigaciones que busquen conocer la localización y expresión de moléculas de interés en la placentotrofia obligada. Teniendo presente que hasta la fecha el único protocolo probado de HIS en *Marisora* y reptiles escamados es el publicado por Cornelis et al. (2017).

La β -actina asociada a técnicas de hibridación *in situ* ha sido relevante para la evaluación de la interacción de esta misma con otras moléculas, así como la identificación de los procesos neuronales asociados en las fibras de mielina (Sotelo et al., 2008; Xie et al., 2018), y de manera general como control positivo o de referencia en cultivos celulares (Uehara et al., 2007). Se detectó la expresión de ARNm usando la sonda de Actina 1 T7 combinado con el sistema de detección de alcalina fosfatasa y el sustrato INT/BCIP (preparación del sustrato de acuerdo a: Pringle & Richardson, s. f.). Se encontró la presencia de transcritos de ARNm de β -actina expresados en

coloración naranja/rojiza (figura 16, 17 y 18, sección C) en contraste con lo observado en el control negativo Actina 1 Sp6 (figura 16, 17 y 18, sección B).

El hígado está conformado por hepatocitos que a su vez forman cordones hepáticos, entre estos se encuentra las sinusoides capilares recubiertos por células endoteliales y macrófagos, que en el hígado son llamadas células de Kupffer (Lemus et al., 2017). A diferencia de mamíferos y aves en los reptiles hay presencia de melanomacrófagos (Frimiano et al., 2011). La localización de transcritos en las células hepáticas fue homogénea exceptuando los espacios sinusoidales en donde no se observó ARNm de β -actina, esto se debe a que está presente en las células endoteliales contribuyendo a la regulación de la permeabilidad de las sinusoides, pero no en la cavidad sinusoidal (Lifland et al., 2011). Por otra parte, el músculo esquelético está conformado por miocitos o fibras musculares rodeadas de tejido conjuntivo llamado endomisio, que a su vez se organizan en fascículos musculares rodeadas por tejido conectivo denominado perimisio. El epimisio es tejido conjuntivo denso compuesto de colágeno tipo 1 que rodea a los fascículos que conforman al músculo (Flores & Uribe, 2002). La presencia de transcritos se concentró en el tejido conectivo de sostén y los fibroblastos; estructuras especializadas en proporcionar soporte a las células o tejidos (Ross et al., 2003).

La estructura ovárica en *Marisora* es sacular con folículos en desarrollo y dos o un lecho germinal. La pared del ovario está rodeada externamente por un epitelio cuboidal o escamoso (Hernández et al., 2005; Gómez & Ramírez-Pinilla, 2004). El tejido folicular es diferencial dependiendo de la etapa, en la previtelogénesis es estratificada y polimórfica y durante la vitelogénesis se convierte en una monocapa de células planas, por último, el tejido conjuntivo que rodea el epitelio folicular forma la teca (Flores & Uribe, 2002).

La presencia diferencial de β -actina en diferentes regiones o tipos celulares en el corte puede deberse a sus diversas funciones en las células. Para el caso de la teca en donde se presentó un color más oscuro en comparación a otras estructuras de los folículos ováricos, especialmente en comparación con el citoplasma del ovocito podría deberse a las funciones diferenciales entre ellas. La teca desempeña un papel importante en el desarrollo y la función de los ovocitos proporcionando soporte y nutrición a los folículos en desarrollo (Flores & Uribe, 2002; Hernández et al., 2005), por lo que es posible que la β -actina sea más abundante en la teca debido a sus funciones específicas en la organización del citoesqueleto y la dinámica celular requerida para el desarrollo y la interacción de las células de la teca con los ovocitos en crecimiento o también involucrada en la migración celular, la formación de prolongaciones celulares y la comunicación célula-célula (Guirado et al., 2002; Lifland et al., 2011). Dado que la teca puede estar involucrada en la migración de las células durante el crecimiento folicular, la β -actina podría estar en mayor abundancia en esta área para facilitar estos procesos. Sin embargo, se requiere más investigación científica en histología y biología celular para proporcionar información más detallada.

La hibridación *in situ* es una técnica altamente sensible que puede estar influenciada por múltiples variables. En este contexto, se identificaron varios factores clave que pueden afectar la efectividad de la sonda. En primer lugar, está la temperatura de hibridación, esta indica la temperatura a la cual la sonda se unirá a su objetivo en la muestra y es específico para cada sonda. Si la T_h es demasiado baja, hay unión no específica y un alto *background* y, si es demasiado alta la unión específica no es eficiente (Zimmerman et al., 2013). La T_h se puede calcular teniendo presente la T_m de cada *primer* en la PCR y el contenido de GC de la sonda. Según la literatura se recomienda iniciar la estandarización 20 grados menos de la T_m e ir variando de a 5 grados en

cada hibridación (Hua et al., 2018). Otro factor importante es el tratamiento con proteinasa K, si es demasiado alto puede modificar la morfología del corte y si es muy bajo no permite la correcta permeabilización del tejido (Kidner & Timmemans, 2006). Se recomienda realizar este tratamiento en un rango de concentración de 1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ por pocos minutos a 30 min dependiendo de las características del tejido (Lee et al., 2013; Hua et al., 2018). El correcto pretratamiento de los cortes también es fundamental, ya que es susceptible a contaminación o degradación de este (Pringle & Richardson, s. f.). Adicionalmente, se encontró que los tejidos que daban resultados más satisfactorios fueron aquellos elaborados con muestras frescas (Kasai et al., 2016). Por último, es fundamental seleccionar de manera adecuada la secuencia que se usará para sintetizar la sonda, por lo que es indispensable realizar distintas sondas derivadas de diferentes regiones del transcriptoma (Javelle et al., 2011). Además de incluir un control positivo (T7-antisentido) y negativo (Sp6-sentido) para identificar puntos críticos o posibles problemas en el protocolo.

La implementación de estudios moleculares en lagartos como *Marisora*, es esencial para comprender procesos biológicos fundamentales y tiene un impacto en la investigación científica y desarrollo de nuevas tecnologías (Grabinski et al., 2015). Teniendo presente lo anterior, el desarrollo de un protocolo de hibridación *in situ* en un lagarto placentotrófico obligado usando la β - actina como molécula modelo es relevante debido a que permite una comprensión de la expresión genética de un tejido y, arroja luz sobre la futura implementación en estudios que aborden aspectos importantes de su biología, tales como el desarrollo embrionario, la diferenciación celular, detección de enfermedades, expresión de moléculas, respuesta a estímulos ambientales entre otros (Schmidt & Hall, 1998; Lifland et al., 2011; Lin & Redies, 2012; Wen et

al., 2018; Xie et al., 2018). Además de que se puede implementar este protocolo en otras especies de animales o incluso en plantas (Narayanan & Oates.,2019; Javelle et al.,2011).

7. Conclusiones

La hibridación *in situ* es una técnica que nos permite localizar la expresión de transcritos presentes en diversos tejidos, con una alta especificidad para cada muestra y especie. Se obtuvo un protocolo de hibridación *in situ* de β -actina exitoso que puede ser usado como control positivo en futuros estudios de hibridación en *Marisora* sp con una metodología replicable y que puede ser aplicada en diferentes grupos animales. Así mismo se puede usar este mismo protocolo para realizar hibridaciones con diferentes sondas en un mismo corte.

Referencias Bibliográficas

- Beaupre, S. J., Jacobson, E. R., Lillywhite, H. B. and Zamudio, K. (2004). *Guidelines for the use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists.
- Brawand, D., Wahli, W., & Kaessmann, H. (2008). Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLoS Biology*, 6(3), e63.
- Bentley Lawrence, J., & Singer, R. H. (1985). Quantitative analysis of *in situ* hybridization methods for the detection of actin gene expression. *Nucleic Acids Research*, 13(5), 1777-1799.
- Cardiff, R. D., Miller, C. H., & Munn, R. J. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2014(6).
- Chen Jie, Laramore Cindy, & Shifman Michael. (2015). Triple-labeling whole-mount *in situ* hybridization method for analysis of overlapping gene expression in brain tissue with high level of autofluorescence. *Journal of Cytology and Histology*.
- Cornelis, G., Funk, M., Vernochet, C., Leal, F., Tarazona, O. A., Meurice, G., Heidmann, O., Dupressoir, A., Miralles, A., Ramirez-Pinilla, M. P., & Heidmann, T. (2017). An endogenous retroviral envelope syncytin and its cognate receptor identified in the viviparous placental *Mabuya* lizard. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(51).
- Carmen, I. M., & Aranzábal, U. (2002). *Atlas de Histología de vertebrados*.

- Dufaure, J. P., & Hubert, J. (1961). Table de développement du lézard vivipare-Lacerta (*Zootoca*) *vivipara* Jacquin. *Archives D Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale*, 50(3), 50, 309.
- Franco Mesa, M. (2012). *Comparación entre hibridización in situ e inmunoperoxidasa indirecta para la determinación de la ubicación de Pasteurella multocida en conejo afectados con enfermedad respiratoria* [Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20063>.
- Franco, M. L. (2013). Características, ventajas y desventajas de la hibridización *in situ* para la identificación de agentes patógenos. *Revista de Medicina Veterinaria*, 25, 63- 270 78.
- Frimiano, E. M. S., Cardoso, N. N., Vieira, D. A., Sales, A., Mendes, A. L. S., & Nascimento, A. A. (2011). Histological study of the liver of the lizard *Tropidurus torquatus* Wied (Squamata: Tropiduridae) (AU). *Braz. j. morphol. sci*, 165-170.
- Furusawa, T., & Bustin, M. (2009). Visualization of the expression of HMGN nucleosomal binding proteins in the developing mouse embryo and in adult mouse tissues. *Chromatin Protocols: Second Edition*, 67-82.
- Gómez, D., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2004). Ovarian histology of the placentotrophic *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Morphology*, 259(1), 90-105.
- Grabinski, T. M., Kneynsberg, A., Manfredsson, F. P., & Kanaan, N. M. (2015). A method for combining RNAscope *in situ* hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. *PloS one*, 10(3).
- Guirado Blanco, O., Solanas García, M., Costa Traschel, I., & Escrich Escriche, E. (2002). El citoesqueleto de actina: una perspectiva desde la biología molecular del cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(2), 115-122.

- Hedges, S. B., & Conn, C. E. (2012). A new skink fauna from Caribbean islands (Squamata, Mabuyidae, Mabuyinae). *Zootaxa*, 3288(1), 1.
- Hernández-Franyutti, A., Uribe Aranzábal, M. C., & Guillette Jr, L. J. (2005). Oogenesis in the viviparous matrotrophic lizard *Mabuya brachypoda*. *Journal of Morphology*, 265(2), 152-164.
- Ho, S. M. (1987). Endocrinology of vitellogenesis. In *Hormones and reproduction in fishes, amphibians, and reptiles*, 145-169.
- Ho, S. M, Kleis, S., McPherson, R., Heisermann, G. J., & Callard, I. P. (1982). Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica*, 40-50.
- Hua, R., Yu, S., Liu, M., & Li, H. (2018). A PCR-based method for RNA probes and applications in neuroscience. *Frontiers in Neuroscience*, 12, 266.
- Javelle, M., Marco, C. F., & Timmermans, M. (2011). *In situ* hybridization for the precise localization of transcripts in plants. *Journal of Visualized Experiments*, 57.
- Kasai, A., Kakiyama, S., Miura, H., Okada, R., Hayata-Takano, A., Hazama, K., Niu, M., Shintani, N., Nakazawa, T., & Hashimoto, H. (2016). Double *in situ* hybridization for microRNAs and mRNAs in brain tissues. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9.
- Kidner, C., & Timmermans, M. (2006). *In Situ* hybridization as a tool to study the role of microRNAs in plant development. *MicroRNA Protocols*, 159-180.
- Lee, D., Xiong, S., & Xiong, W.-C. (2013). General introduction to *in Situ* hybridization protocol using nonradioactively labeled probes to detect mRNAs on tissue sections. *Neural Development: Methods and Protocols*, 1018(1), 165-174.
- Lifland, A. W., Zurla, C., Yu, J., & Santangelo, P. J. (2011). Dynamics of native β -actin mRNA transport in the cytoplasm. *Traffic*, 12(8), 1000-1011.

- Lin, J., & Redies, C. (2012). Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. *Development genes and evolution*, 222, 369-376.
- Narayanan, R., & Oates, A. (2019). Detection of mRNA by whole mount *in situ* hybridization and DNA extraction for genotyping of zebrafish embryos. *BIO-PROTOCOL*, 9(6). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3193>
- Nieto, M. A., & Pate, K. (1996). *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. *Methods in cell biology*, 51, 219-235.
- Nijagal, B. S., & Yajurvedi, H. N. (1999). Influence of corticosterone on FSH-induced ovarian recrudescence in the Lizard *Mabuya carinata*. *General and Comparative Endocrinology*, 115(3), 364-369.
- Perkins, L. E. L., Campagnoli, R. P., Harmon, B. G., Gregory, C. R., Steffens, W. L., Latimer, K., Clubb, S., & Crane, M. (2001). Detection and confirmation of reptilian adenovirus infection by *in situ* hybridization. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 13(4), 365-368.
- Pinto-Sánchez, N. R., Calderón-Espinosa, M. L., Miralles, A., Crawford, A. J., & Ramírez-Pinilla, M. P. (2015). Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical skink genus *Mabuya* Fitzinger (Squamata: Scincidae) with emphasis on Colombian populations. *Molecular phylogenetics and Evolution*, 93, 188-211.
- Pringle, N. P., & Richardson, W. D. (s. f.). *In situ* hybridization protocols. *Wolfson Institute for Biomed.*
- Ramírez-Pinilla, M. P., Serrano, V. H., & Galeano, J. C. (2002). Annual reproductive activity of *Mabuya mabouya* (Squamata, Scincidae). *Journal of Herpetology*, 667-677.

- Ramírez-Pinilla, M. P. (2006). Placental transfer of nutrients during gestation in an Andean population of the highly matrotrophic lizard genus *Mabuya* (Squamata: Scincidae). *Herpetological Monographs*, 20(1), 194-204.
- Rojas Lemus, M., Milán Chávez, R., Delgado Medina, A., Bizarro Nevares, P., Cano Gutiérrez, G., Cafaggi Padilla, D., ... & Fortoul van der Goes, T. I. (2017). El hepatocito como un ejemplo de interacción entre la biología celular y las rutas metabólicas. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 60(2), 52-58.
- Romano, M., Rosanova, P., Anteo, C., & Limatola, E. (2004). Vertebrate yolk proteins: a review. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 69(1), 109-116.
- Ross, M. H., Kaye, G., & Pawlina, W. (2003). *Histology a text and atlas 6th edition*.
- Singer, R. H., & Ward, D. C. (1982). Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in situ* hybridization with a biotinated nucleotide analog. 321 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(23), 7331-7335.
- Sotelo-Silveira, J., Crispino, M., Puppo, A., Sotelo, J. R., & Koenig, E. (2008). Myelinated axons contain β -actin mRNA and ZBP-1 in periaxoplasmic ribosomal plaques and depend on cyclic AMP and F-actin integrity for in vitro translation. *Journal of neurochemistry*, 104(2), 545-557.
- Schmidt, A., & Hall, M. N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 305-338.
- Uehara, H., Kunitomi, Y., Ikai, A., & Osada, T. (2007). mRNA detection of individual cells with the single cell nanoprobe method compared with *in situ* hybridization. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(1), 1-6.

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), e115-e115.
- Wen, X. Y., Tarailo-Graovac, M., Brand-Arzamendi, K., Willems, A., Rakic, B., Huijben, K., ... & Lefeber, D. J. (2018). Sialic acid catabolism by N-acetylneuraminase pyruvate lyase is essential for muscle function. *JCI insight*, 3(24).
- Young, L. J., Lopreato, G. F., Horan, K., & Crews, D. (1994). Cloning and *in situ* hybridization analysis of estrogen receptor, progesterone, and androgen receptor expression in the brain of whiptail lizards (*Cnemidophorus uniparens* and *C. inornatus*). *The Journal of Comparative Neurology*, 347(2), 288-300.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 1-11.
- Xie, X., Almuzzaini, B., Drou, N., Kremb, S., Yousif, A., Farrants, A. K. Ö., ... & Percipalle, P. (2018). β -Actin-dependent global chromatin organization and gene expression programs control cellular identity. *The FASEB Journal*, 32(3), 1296-1314.
- Xie, X., & Percipalle, P. (2018). An actin-based nucleoskeleton involved in gene regulation and genome organization. *Biochemical and biophysical research communications*, 506(2), 378-386.
- Zimmerman, S. G., Peters, N. C., Altaras, A. E., & Berg, C. A. (2013). Optimized RNA ISH, RNA FISH and protein-RNA double labeling (IF/FISH) in *Drosophila* ovaries. *Nature Protocols*, 8(11), 2158-2179.

Apéndices

Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS