

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

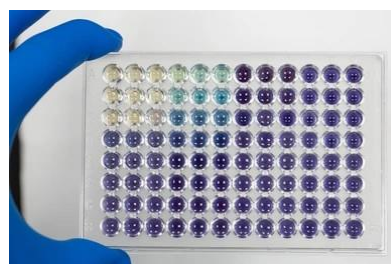
TEMA 5: TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

En el tema anterior vimos los procesos de desnaturalización, renaturalización e hibridación. En este tema vamos a ver las diferentes técnicas de laboratorio que aplican ese conocimiento.

Las técnicas de hibridación se pueden clasificar según el medio o soporte en el que se llevan a cabo. Así, hay tres tipos:

- **Soporte sólido:** se caracterizan porque una de las dos moléculas implicadas (secuencia diana o sonda) se inmoviliza sobre un soporte sólido antes de comenzar la hibridación. Lo más normal es fijar al soporte sólido la secuencia diana.
- **Medio líquido:** en este caso el híbrido sonda-diana se forma en solución, normalmente en los pocillos de una placa especial llamada placa "Microtiter" (microtituladora o de microtitulación) y posteriormente se fija a la pared del pocillo para su detección.
- **Hibridación *in situ* (ISH):** se realizan directamente sobre extensiones citológicas o secciones de tejidos y el resultado obtenido se analiza microscópicamente. Estas técnicas permiten detectar y localizar secuencias de ácidos nucleicos sobre cromosomas metafásicos, células o tejidos, directamente.



Dentro de cada tipo tenemos diferentes técnicas que vamos a estudiar.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN SEGÚN EL SOPORTE	EN MEDIO SÓLIDO	DOT BLOT
		SOUTHERN BLOT
		NORTHERN BLOT
		MICROARRAYS (CHIP DE ADN)
	EN MEDIO LÍQUIDO	TECNOLOGÍA DE CAPTURA DE HÍBRIDO
		TECNOLOGÍA DE ADN RAMIFICADO (<i>BRANCHING DNA</i>)
	IN SITU (ISH)	FLUORESCENTE (FISH)
		CROMOGENICA (CISH)

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

2.- DOT BLOT

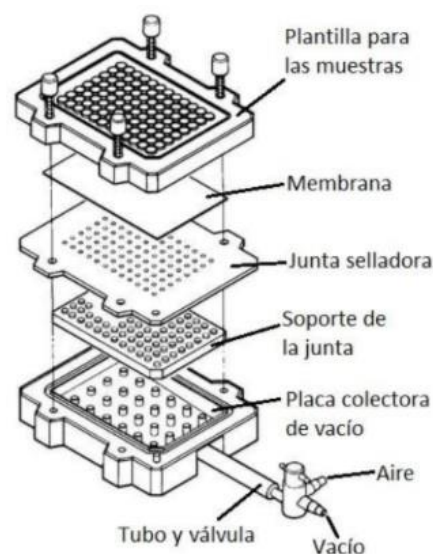
Es una técnica de hibridación simple que utiliza membranas de nitrocelulosa o nylon como soporte sólido y que permite detectar secuencias de ácidos nucleicos en una mezcla compleja sin aportar ninguna información adicional (siendo la forma más simple de hibridación). No hay digestión enzimática ni separación por electroforesis, por lo que sólo indica la presencia o ausencia de la secuencia diana.

Es una técnica que permite el estudio simultáneo de varias muestras aplicando cada muestra en una zona distinta de la membrana y se puede realizar con sondas radiactivas o con sondas marcadas con haptenos.

2.1. Protocolo/Procedimiento

Antes de las cuatro fases típicas de la hibridación hay que aplicar la muestra al soporte:

1. Aplicación de la muestra al soporte: Antes de iniciar la aplicación hay que humedecer la membrana que actúa como soporte sólido mediante inmersión, durante 10 min en un tampón adecuado o en agua destilada. Luego se retira el exceso de líquido mediante papel de filtro y, a continuación, se coloca la membrana humedecida en un sistema de vacío que consta de una plantilla con pocillos. Debajo de la plantilla se sitúa la membrana de nitrocelulosa o nylon humedecida y una junta selladora. Se añade la muestra y al conjunto se le hace el vacío, y la muestra queda fijada en la membrana.



2. Prehibridación: Las membranas con las muestras se incuban con una solución de prehibridación para bloquear las posibles uniones inespecíficas de la sonda a la superficie de la membrana. Así al añadir la sonda, sólo se puede unir de manera específica a la secuencia diana. Evitamos los falsos positivos.

Las soluciones de prehibridación suelen tener la misma composición que las soluciones de hibridación pero sin la sonda. Pueden llevar ADN *carrier*, normalmente ADN de esperma de salmón, que es el que va a bloquear las uniones inespecíficas de los ácidos nucleicos a la membrana. La membrana se incubaba con esta solución a la misma temperatura a la que posteriormente se hará la hibridación (65°-68°C). El tiempo de incubación varía bastante según los protocolos, puede ir desde varios minutos a varias horas.

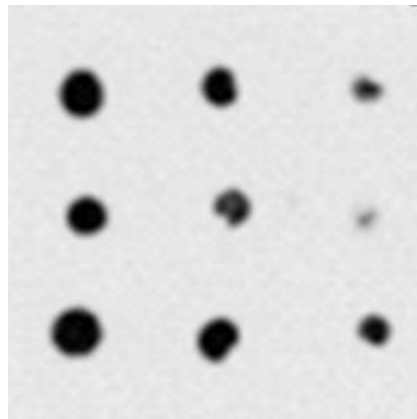
3. Hibridación: Las sondas de ADN bicatenario se desnaturalizan inmediatamente antes de su uso, mediante calentamiento a 95°-100°C durante 5 min y enfriamiento rápido en hielo. Para realizar la hibridación se retira la solución de prehibridación y se le añade una solución con la sonda recién desnaturalizada. La membrana se incubaba con esta solución un tiempo variable (4-24h).

4. Lavado post-hibridación: Lo habitual es hacer 2 o 3 lavados con soluciones en las que se va aumentando progresivamente la temperatura de lavado (en los híbridos imperfectos hay más mismatch y se separan antes).

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

5. Detección del híbrido: Se procederá según el tipo de marcaje que lleve la sonda, normalmente radiactivo o haptenos.

a) **Marcaje radiactivo:** tras el último lavado, la membrana se seca y se revela mediante exposición radiográfica encima y se mantiene el conjunto en oscuridad durante horas- días. Al revelar la placa aparecerán puntos negros en las posiciones de las muestras positivas, es decir, aquellas que contenían las secuencias diana (como tendrán la sonda marcada con isótopos radiactivos dará la señal).



b) **Marcaje con haptenos:** tras el último lavado se revela con un método de detección cromogénico, con enzimas (se verá en la CISH, pero básicamente usamos enzimas que producen color al actuar sobre ciertos sustratos). El resultado final es una mancha coloreada en las posiciones de las muestras positivas.

2.2. Aplicaciones del Dot Blot:

1. Como técnica de rastreo: De forma genérica el Dot blot se puede utilizar como técnica de rastreo o “*screening*” para detectar secuencias de interés en múltiples muestras de manera simultánea. Algunos ejemplos son:

- Detección de secuencias extrañas en muestras biológicas, por ejemplo, para detectar la presencia de virus, bacterias, parásitos etc.
- Control de calidad de PCR para comprobar la especificidad de los productos amplificados.
- Control de calidad de marcaje de sondas utilizando como muestra secuencias diana control.
- Determinación del sexo en especies sin diferencias fenotípicas.

2. Aplicaciones específicas: Se han desarrollado también aplicaciones concretas del Dot Blot con nombres específicos:

- **ASO Dot Blot:** Es una estrategia basada en el Dot Blot para detectar mutaciones, tanto en homocigosis como heterocigosis, mediante el empleo de Oligonucleótidos Específicos de Alelo (ASO), tanto del alelo normal como del mutado, como sondas (estarán marcados). Es útil para detectar mutaciones asociadas con enfermedades. El primer paso es la realización de una PCR para amplificar la región del gen que puede presentar o no la mutación, y esta es la muestra que vamos a colocar en las membranas. Primero se realiza la hibridación con ASOs del alelo normal o silvestre, se revela el resultado y se lava la sonda. Después se hace la

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

hibridación con los ASOs del otro alelo (el mutado) y se revela el resultado. Los que dieran positivos sólo en la primera hibridación o sólo en la segunda serán homocigotos (para el alelo normal o para el mutado) y los que den positivo en las dos hibridaciones serán heterocigotos (tienen los dos alelos).

- **Dot blot inverso:** Aplica el mismo fundamento que el ASO dot blot pero de forma inversa. En este caso, lo que se inmoviliza en la membrana son los oligonucleótidos específicos de alelo (tanto normales como mutados) pero irán sin marcar. Las regiones de los genes del paciente amplificadas en la PCR serán las sondas, que se marcarán añadiendo los dNTPs marcados directamente a la mezcla de la PCR. Normalmente, se establecen dos filas de muestras: una con los ASOs del alelo normal y otro con los ASOs del alelo mutado y se añaden las sondas de ADN marcados obtenidos con la PCR.

- **Hibridación de colonias:** Es un tipo específico de dot blot utilizado para detectar bacterias que aportan una secuencia génica concreta, normalmente un gen de interés, un plásmido natural o recombinante. Se utiliza una membrana del tamaño de una placa de Petri, y se coloca sobre las colonias para hacer una impronta. Se lisan las bacterias y se desnaturaliza el ADN, y después se fija a la membrana mediante calor o radiación UV y ya se sigue con el dot blot tradicional. Tras el revelado, aparecerá una mancha oscura en la posición de la membrana que contactó con una colonia que portaba la secuencia diana.

- **Hibridación de placas virales:** Es un tipo de dot blot, similar a la hibridación de colonias pero en este caso se detectan virus que portan la secuencia diana. También se utiliza una membrana del tamaño de una placa de Petri. Es especialmente útil en la técnica del ADN recombinante para localizar los fagos recombinantes que contienen la secuencia clonada.

3.- SOUTHERN BLOT

Es una técnica de hibridación que permite identificar fragmentos de ADN separados por electroforesis en gel y transferidos a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Su nombre procede de la persona que la diseñó por primera vez (Edwin Southern).

A diferencia del dot blot, permite detectar simultáneamente varias secuencias diana de diferentes tamaños en una muestra con una única hibridación. Normalmente se utilizan sondas marcadas con radioactividad, como sondas marcadas con P^{32} , ya que pueden detectar cantidades pequeñas de ADN (son muy sensibles).

3.1. Protocolo

El material de partida es ADN purificado, el cual es sometido a un proceso de digestión enzimática, electroforesis en gel, transferencia a membrana, hibridación y revelado:

I. Digestión enzimática: Se realiza con una o varias enzimas de restricción. Su objetivo es trocear ADN de partida en fragmentos de distinto tamaño, lo que va a permitir al Southern blot aportar información sobre el tamaño del fragmento que contiene la secuencia diana.

II. Electroforesis en gel: El ADN digerido se somete a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida para separar los fragmentos producidos según su tamaño.

III. Transferencia del ADN a la membrana: Es el paso clave de la técnica mediante el que se

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

obtiene una réplica exacta del patrón de bandas de ADN en gel sobre una membrana de nitrocelulosa o nylon. Consta de varios pasos que incluyen la desnaturalización del ADN, transferencia a la membrana por capilaridad y anclaje del ADN a la membrana (con calor o luz UV).

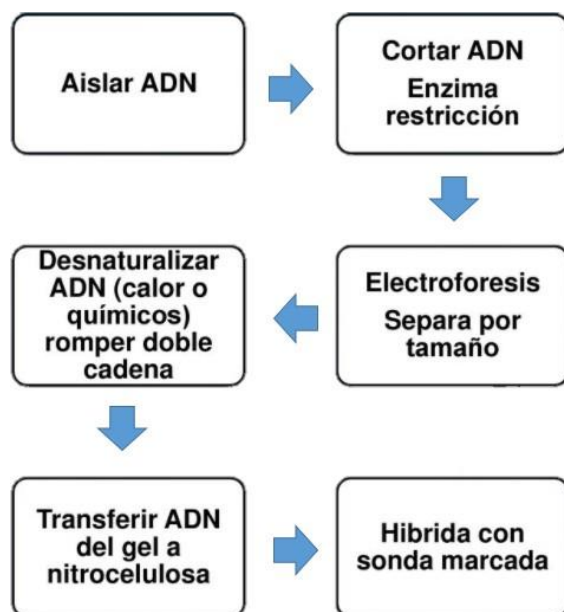
IV. Hibridación: Se realiza de manera similar a la descrita en el dot blot, incubando la membrana con distintos reactivos. También se utiliza la solución de prehibridación para evitar las uniones inespecíficas.

V. Revelado: El revelado de la sonda se hace mediante autorradiografía con una película de rayos X de manera que aparecerá una mancha oscura en los puntos de la membrana donde se localizan los híbridos sonda-secuencia diana.

3.2. Aplicaciones del Southern blot

Tiene múltiples aplicaciones aunque muchas de ellas están siendo sustituidas por la PCR ya que aporta mayor sensibilidad y rapidez. Entre las principales aplicaciones destacan:

- Elaboración de huellas genéticas.
- El estudio de mutaciones estructurales (translocación, deleción, inversión e inserción).
- Detección de secuencias adquiridas.



4.- NORTHERN BLOT

Es una técnica de hibridación que permite detectar moléculas de ARN separadas por electroforesis en gel y transferirlas a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Es similar al Southern blot pero optimizada para estudiar ARN en lugar de ADN.

4.1. Protocolo

El material de partida es ARN purificado y se procede de la misma forma que en el Southern blot pero con tres diferencias básicas:

- No se requiere digestión enzimática previa con enzimas de restricción ya que el ARN

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

purificado es ya una mezcla compleja de moléculas diferentes de ARN de diferentes tamaños (ARNm, ARNr, ARNt, etc).

- La detección se realiza en condiciones desnaturalizantes porque las moléculas de ARN cuando están en solución tienden a adquirir estructuras secundarias complejas con emparejamiento intracatenarios entre regiones con secuencias complementarias que impedirían una hibridación correcta. Como agente desnaturalizante se utiliza el formaldehído antes de cargar el gel.
- No es necesario el paso de desnaturalización antes de la transferencia del gel a la membrana.

Los siguientes pasos de transferencia del gel a la membrana, hibridación y revelado se realizan de forma similar al Southern blot.

4.2. Aplicaciones del Northern blot

- Análisis de expresión génica (las proteínas se traducen del ARNm).
- Detección de mutaciones.
- Estudios de corte y empalme o “*splicing* alternativo”.

5.- MICROARRAYS

Los *microarrays* son conjuntos o colecciones de fragmentos de ADN (sondas) distintos fijados a una superficie sólida (vidrio, plástico o silicio). Los *microarrays* son también conocidos como “biochips” o chips de ADN. Partiendo de una única muestra y realizando un único proceso de hibridación, un *microarray* detecta simultáneamente miles de secuencias distintas, cualitativa y cuantitativamente.

Las sondas ancladas en el biochip son monocatenarias y no están marcadas. La muestra que se va a estudiar se marca con fluorocromos y la lectura del resultado obtenido tras la hibridación requiere un escáner de lectura basado en tecnología láser y un potente *software* de análisis.

5.1 Protocolo

1. Marcaje de la muestra: Las sondas fijadas al *microarray* no están marcadas por lo que el primer paso de la técnica consiste en marcar la muestra con un fluorocromo.
2. Hibridación y lavado post-hibridación.
3. Lectura del *microarray* mediante un escáner.
4. Análisis e interpretación de los resultados.

5.2 Aplicaciones de los *microarrays*

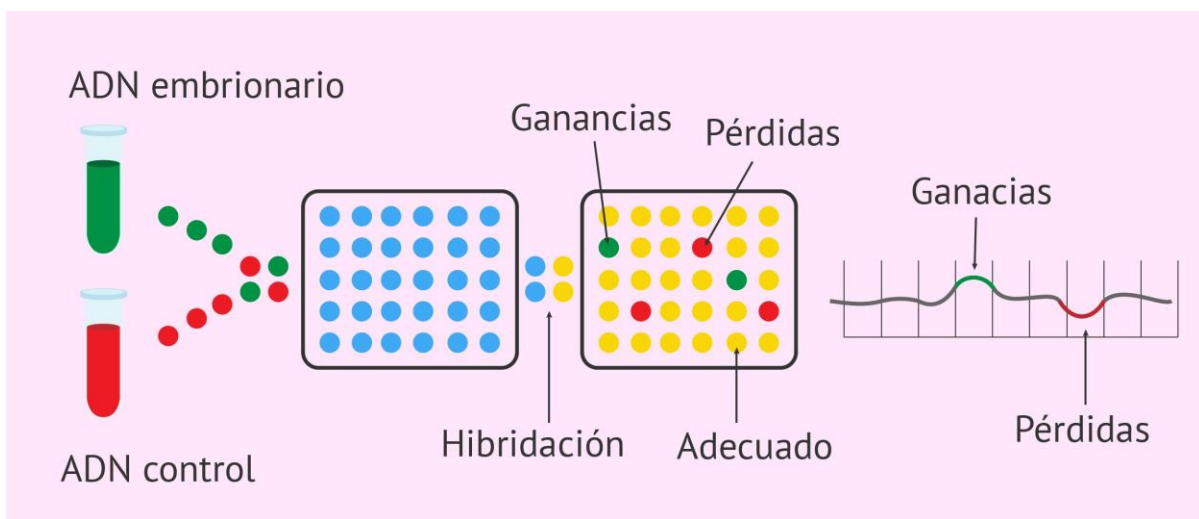
A) Hibridación genómica comparada en *arrays* (aCGH): Esta técnica permite detectar e identificar alteraciones genéticas de tipo pérdida (deleciones y microdeleciones) o ganancia (duplicaciones o microduplicaciones) de material genético mediante la comparación de un ADN muestra con un ADN de referencia. La clave del método consiste en marcar el ADN de la muestra que se quiere analizar y el ADN de referencia con fluorocromos distintos

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

(habitualmente verde y rojo respectivamente).

Una vez marcados se mezclan en la misma proporción y se utilizan para hibridar un *array* fabricado. El color de la fluorescencia final va a depender de la proporción de ambos en la mezcla: Los puntos rojos indican deleciones de ADN problema, los amarillos indican genes inalterados (en colores luz la mezcla de verde y rojo es amarillo) y los verdes indican duplicaciones en el ADN problema.

Es una técnica especialmente útil para realizar estudios genómicos de células tumorales (puntos verdes) en el diagnóstico de enfermedades genéticas y en el diagnóstico prenatal. La principal limitación es que no detecta alteraciones estructurales como translocaciones o inversiones puesto que las secuencias diana están presentes en cantidades normales aunque se sitúen en localizaciones cromosómicas anómalas.



B) Estudios de expresión génica: La hibridación en *microarrays* permite el análisis detallado de perfiles de expresión génica de poblaciones celulares al estudiar simultáneamente la expresión de miles de genes mediante los ADNc (ADN comparativo), que son los ADN

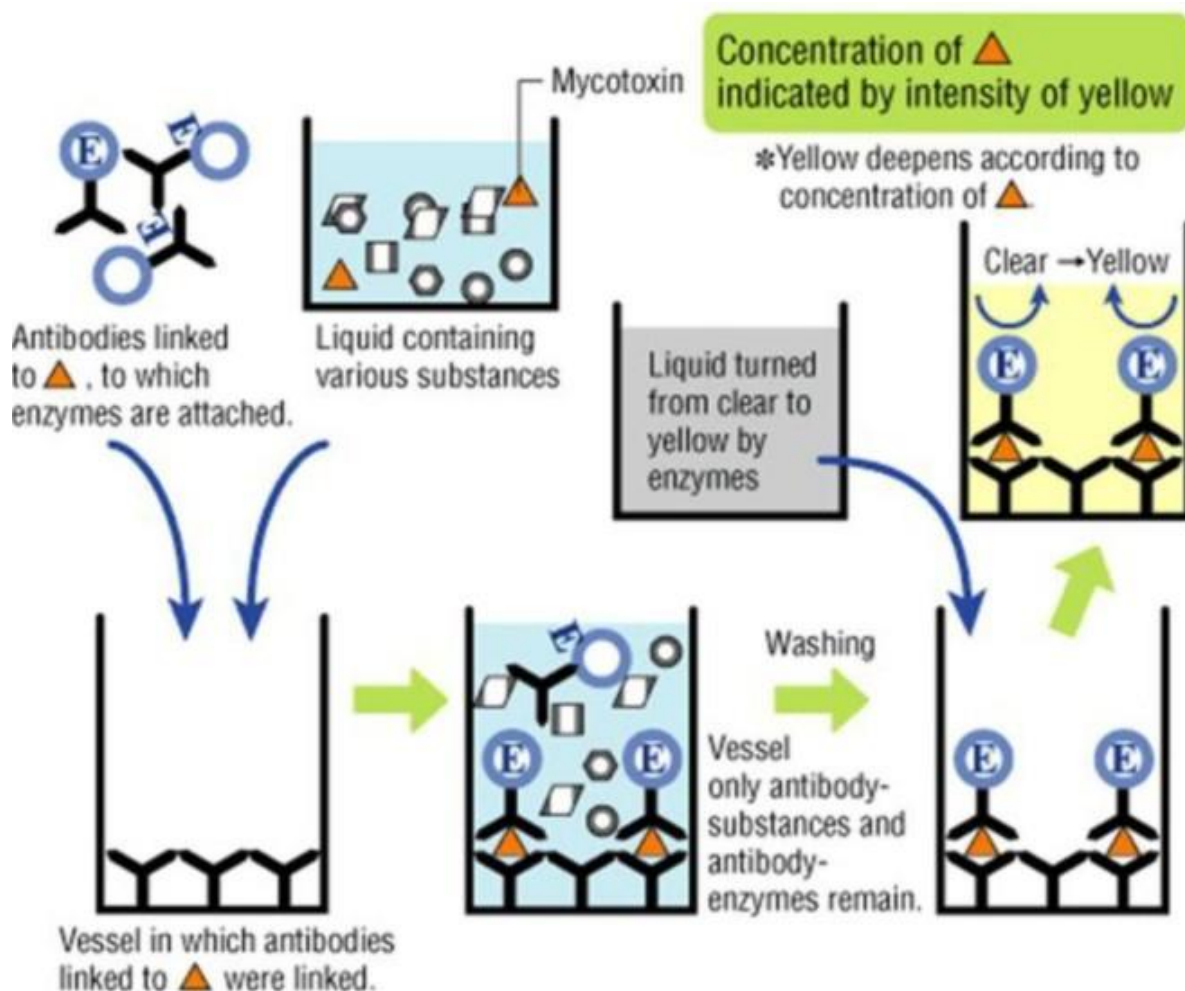
U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

cuyas secuencias son totalmente complementaria al ARN mensajero a partir del cual se han sintetizado las proteínas. Estos estudios pueden hacerse en términos absolutos, viendo qué ADNc posee la célula y en qué proporción (según qué secuencias se iluminan y con qué intensidad), o en términos comparativos, comparando dos poblaciones de células según sus proporciones de ADNc.

6.- TÉCNICAS DE CAPTURA DE HÍBRIDO.

Es una técnica que se basa en la formación de híbridos ARN/ADN que serán reconocidos o capturados por anticuerpos específicos. Si la secuencia diana es ADN la sonda será de ARN y viceversa.

Así, la captura del híbrido ARN/ADN se produce mediante anticuerpos específicos anti-híbrido que reconocen estos heterodúplex y que se hallan fijados en las paredes de pocillos de una placa *microtiter*.



Se desarrolló inicialmente para detectar el virus del papiloma humano (VPH) en muestras del cérvix (cuello de útero) aunque en la actualidad permite detectar múltiples agentes infecciosos. Siguiendo como ejemplo del VPH que es un virus con ADN, los pasos que se siguen partiendo de una muestra cervical son:

I. Lisis de los virus y desnaturalización del ADN: Se realiza en un eppendorf mezclando la

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

muestra con una solución salina desnaturalizante (es parecido a hacer un choque osmótico).

II. Hibridación: En un tubo limpio se mezclan las cantidades adecuadas de la muestra desnaturalizada y la sonda, en este caso ARN (ya que el virus es de ADN), disuelta en el tampón adecuado.

III. Captura del híbrido: La mezcla de hibridación se traspasa a un pocillo de una placa *microtiter* cuya pared está recubierta de anticuerpos anti ARN/ADN. Durante la incubación los híbridos sonda-secuencia diana se unen a los anticuerpos y quedan retenidos en el pocillo cuando se retira la solución de hibridación.

IV. Detección del híbrido: Se añaden al pocillo anticuerpos anti ARN/ADN marcados con fosfatasa alcalina que también se va a unir al híbrido sonda-secuencia diana durante la incubación.

V. Revelado: Se añade al pocillo un sustrato quimioluminiscente que por acción de la fosfatasa alcalina produce luminiscencia de una longitud de onda determinada que puede ser detectada por un luminómetro o bien un lector de placas.

7.- TECNOLOGÍA DE ADN RAMIFICADO (*branched DNA*).

La tecnología de ADN ramificado consiste en un sistema de amplificación de señal basado en la unión de la secuencia diana en un macrocomplejo de ADN de tipo arborescente mediante sucesivas hibridaciones. La tecnología del ADN ramificado o bDNA en inglés, se diseñó para aumentar la sensibilidad de las técnicas de captura de híbrido haciendo posible además su cuantificación.

Una de sus principales aplicaciones es precisamente la cuantificación de cargas virales en muestras biológicas. Los pasos que se siguen son:

I. Lisis de las partículas víricas y desnaturalización (en los virus de ADN).

II. Hibridación con sondas específicas. Se realiza en un tubo de manera que las sondas específicas se van a unir al ácido nucleico vírico por regiones complementarias, quedan sin aparear las regiones no complementarias. Hay dos tipos de sondas específicas:

a) Sondas de captura: Diseñadas de manera que una parte de la sonda es complementaria de una región del ácido nucleico vírico y otra parte es complementaria de un oligonucleótido de captura fijado a la pared de un pocillo de una placa *microtiter* que se va a utilizar en el siguiente paso.

b) Sondas de extensión: Una parte de la sonda es complementaria de una región del ácido nucleico vírico (como en el caso anterior) y otra es complementaria del extremo de un oligonucleótido preamplificado que se va a utilizar en un paso posterior a la técnica.

III. Captura del híbrido: La mezcla de hibridación se traspasa a un pocillo de una placa *microtiter* con las paredes recubiertas de un oligonucleótido de captura cuya secuencia es complementaria de la región que ha quedado sin aparear en la sonda de captura. Al hibridarse ambas secuencias, el ácido nucleico vírico queda anclado a la pared del pocillo.

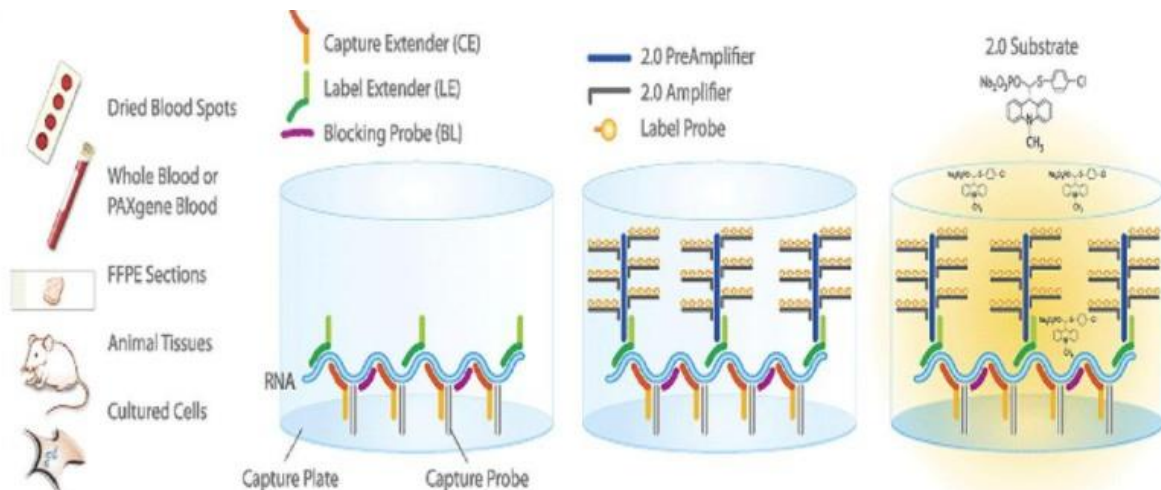
U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

IV. Preamplificación: Se añade al pocillo un oligonucleótido preamplificador que tiene en un extremo una secuencia complementaria de la región no apareada de la sonda de extensión que está unida al ADN vírico. Una vez unido a la sonda de extensión, mediante hibridación, el oligonucleótido preamplificador va a constituir el “tronco” del sistema amplificador de señal.

V. Amplificación: Se añaden al pocillo los oligonucleótidos amplificadores que se van a unir por sus extremos mediante hibridación a las secuencias repetidas del oligonucleótido preamplificador constituyendo “las ramas” del sistema amplificador de señal. Los oligonucleótidos amplificadores contienen múltiples secuencias repetidas complementarias de pequeños oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina.

VI. Detección: Se añaden al pocillo los oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina que se van a unir mediante hibridación a las secuencias repetidas de los oligonucleótidos amplificadores constituyendo las “hojas” del sistema de amplificación marcado.

VII. Revelado: Se añade al pocillo un sustrato quimioluminiscente que por acción de la fosfatasa alcalina produce luminiscencia detectable con un luminómetro o un lector de placas.



U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

8.- HIBRIDACIÓN IN SITU (ISH)

Las siglas se refieren a *In Situ Hybridization*, que significa que la secuencia diana se va a localizar en el sitio en el que se encuentra fisiológicamente (*in situ*), es decir, en los cromosomas o núcleos interfásicos en el caso del ADN y en el citoplasma en el caso del ARN. Por lo tanto para poder realizar esta técnica hay que colocar estructuras celulares o tisulares en forma de monocapa sobre un portaobjetos de cristal que realiza la función de soporte sólido sobre el que realizar la hibridación.

Características de la ISH:

- No requiere la extracción y purificación previa de los ácidos nucleicos.
- Es relativamente rápida y sencilla, con un coste económico moderado.
 - Se puede realizar sobre material fresco, congelado e incluso fijado en formol e incluido en parafina (FFPE).
- Utiliza sondas no radiactivas, tanto de ADN como de ARN.

Concretamente la ISH se puede realizar sobre preparaciones citogenéticas de metafases o núcleos interfásicos desnudos, extensiones citológicas y secciones de tejido.

8.1.- Preparaciones de cromosomas en metafase

Se realiza para cultivos de sangre periférica, médula ósea, líquido amniótico etc. Deteniendo las mitosis en metafase con colchicina.

8.2.- Preparación de núcleos interfásicos desnudos

Se obtiene a partir de sangre periférica o médula ósea en tres pasos:

- Choque hipotónico con KCl donde los glóbulos rojos y blancos se hinchan.
- Fijación con solución de Carnoy
 - Extensión de los núcleos en un portaobjetos frío: al chocar las células con un porta frío éstas se rompen y los núcleos desnudos quedan pegados al porta.

8.3.- Extensiones citológicas

Se obtienen a partir de fluidos biológicos con células en suspensión que se extienden directamente sobre un porta.

8.4.- Secciones de tejido

Puede estar conservado mediante congelación o con tejidos FFPE.

- Tejidos FFPE: Las secciones se obtienen con un micrótopo, se recogen con un pincel fino, se depositan en un baño María (agua tibia) para que se extiendan y se “pescan” con un portaobjetos.
- Conservación mediante congelación: Se obtienen con un criostato (un tipo especial de microtopo), se depositan sobre un portaobjetos y se fijan por inmersión en etanol a 4°C).

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

9.- FISH

La hibridación in situ fluorescente se basa en el empleo de sondas marcadas con fluorocromos que son detectadas visualizando las preparaciones con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados.

Tradicionalmente se realizan en los laboratorios de citogenética y hematología sobre cromosomas en metafase (FISH metafásica) o sobre núcleos interfásicos desnudos (FISH interfásicos) aunque cada vez son más los laboratorios de anatomía patológica que realizan FISH sobre secciones de tejido congelado.

Su principal aplicación es la detección de alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales en relación con el diagnóstico y pronóstico de patologías oncológicas de base genética.

En muchas ocasiones complementa otras técnicas citogenéticas como el cariotipo, aportando información adicional, sobre todo en cariotipos con metafases de baja calidad o de difícil interpretación.

9.1.- Protocolo genérico:

I. Hibridación: Se realiza directamente sobre la preparación, aplicando 5uL de la sonda marcada en el área de hibridación y colocando encima un cubre sin que se formen burbujas. El portaobjetos se coloca a continuación en una estufa para desnaturalizar el ADN de la muestra y de la sonda (en el caso de que sea una sonda de ADN bicatenario).

II. Lavado post-hibridación: Se realiza por inmersión de los portaobjetos en soluciones de lavado colocadas en cubetas Coplin, una vez retirados los cubre.

III. Contratinción: La solución de contratinción contiene diamino-fenil-indol (DAPI) por lo que al excitar las preparaciones con luz UV los núcleos muestran fluorescencia azul. Los portas pueden visualizarse inmediatamente con un microscopio de fluorescencia o conservarse en la nevera a 4°C preservados de la luz.

IV. Visualización: Las preparaciones se observan con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados a los fluorocromos utilizados en las sondas. Normalmente se utilizan fluorocromos que emiten en verde y rojo.

En el caso de las preparaciones en metafase, los cromosomas se visualizan en color azul mientras que las regiones en que se localizan las secuencias diana aparecen como puntos o manchas rojas o verdes. Si las preparaciones son de núcleos desnudos éstos se visualizan en color azul con puntos verdes o rojos en su interior correspondientes a los híbridos formados entre la sonda y la secuencia diana.

Hay que analizar un mínimo de 200 núcleos y el resultado final se expresa como % de núcleos que presentan la alteración que se estudia.

9.2.- Tipos de sondas

Las sondas empleadas se diseñan de manera específica según la anomalía cromosómica que

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

se quiere detectar (numérica o estructural). Muchos estudios requieren varias sondas por lo que se suelen emplear cócteles de varias sondas con diferentes fluorocromos. Para estudios citogenéticos en humanos las sondas más utilizadas son de dos tipos:

A) Sondas centroméricas: hibridan con secuencias localizadas en el centrómero de cromosomas concretos. Se emplean para anomalías cromosómicas numéricas. Existen sondas centroméricas para cada cromosoma, se nombran como CEPx siendo X el número del cromosoma afectado (*Chromosome Enumeration Probe*).

En cada núcleo interfásico se observará un punto fluorescente por cada cromosoma igual presente en él. En núcleos normales se observarán 2 puntos; en monosomías un único punto y en trisomías se observarán 3 puntos.

Para diferenciar una trisomía de una poliploidía, la hibridación se realiza con un cóctel de al menos dos sondas CEP, una específica del cromosoma de interés (por ejemplo en verde) y otra específica de un cromosoma control control (roja). Así, en una trisomía se observarán tres puntos verdes y dos rojos, mientras que en una triploidía habrá 3 puntos verdes y 3 puntos rojos.

B) Sondas específicas de locus: también denominadas “sondas LSI” (*Locus Specific Identifier*) hibridan en regiones (locus) concretas de un cromosoma implicadas en patologías específicas. Se emplean para detectar tanto anomalías cromosómicas estructurales como numéricas.

Para la identificación de traslocaciones se usan juegos de sondas que hibridan a ambos lados de los puntos o regiones donde se produce la rotura de los cromosomas:

Las sondas de separación se utilizan para detectar traslocaciones en las que uno de los cromosomas implicados es siempre el mismo, pero el otro puede variar. La hibridación se realiza con un juego de dos sondas marcadas en verde y rojo que hibridan a ambos lados del punto de rotura en el cromosoma que está siempre implicado en la translocación. Cuando no hay traslocación, al hibridar tan próximas las sondas, las fluorescencias de ambas se superponen y se observan solo dos puntos amarillos (mezcla de rojo y verde). Si hay traslocación, se observan tres puntos fluorescentes: uno amarillo (del cromosoma intacto) uno rojo y otro verde, separados, correspondientes a las dos partes del cromosoma traslocado.

Sondas de fusión: Se utilizan para detectar translocaciones en las que se conocen los dos cromosomas implicados. En este caso se utilizan dos pares de sondas, cada par va a hibridar a ambos lados de los puntos de rotura de cada uno de los cromosomas implicados en la translocación. En este caso, las dos sondas que flanquean el mismo punto de rotura están marcadas con el mismo color (las de un cromosoma en verde y las de otro en rojo). Si

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

no hay translocación se observan 4 puntos fluorescentes, dos verdes y dos rojos, correspondientes a los 4 cromosomas normales. Si hay traslocación se observará un punto verde (de un cromosoma normal no traslocado), un punto rojo (del otro cromosoma normal no traslocado), y dos puntos amarillos (de los dos cromosomas derivados de la traslocación).

9.3.- FISH metafásica

Consiste en la detección de secuencias de ADN directamente en los cromosomas sobre extensiones citogenéticas de metafases. Se utilizan sondas centroméricas para detectar anomalías numéricas y sondas específicas de locus para detectar anomalías estructurales. Recientemente se han desarrollado varias técnicas de FISH metafásicas que utilizan cócteles complejos de sondas que cubren cromosomas enteros incluso al genoma completo lo que permite “pintar” los cromosomas con distintos colores fluorescentes.

Dependiendo de la estrategia utilizada se conocen como “FISH para pintado de cromosomas enteros”, FISH multicolor y cariotipo espectral.

I. FISH para pintado de cromosomas enteros (WCP-FISH): Se utilizan sondas marcadas con el mismo fluorocromo que hibridan con un cromosoma entero pintándolo de un color uniforme. Se utilizan sobre todo para detectar anomalías numéricas.

II. FISH multicolor (M-FISH): Permite la identificación diferencial de regiones cromosómicas. Se basa en la utilización de cócteles de sondas que hibridan en distintas regiones de un mismo cromosoma, con solapamiento parcial, y que están marcadas con diferentes fluorocromos. Son las denominadas sondas para pintado de bandas específicas o sondas BSP. Los solapamientos de las sondas producen combinaciones de colores y el resultado final es un bandeo multicolor característico de cada cromosoma.

10.- ISH CROMOGÉNICA (CISH)

Se caracteriza porque el híbrido se detecta mediante una reacción inmunohistoquímica que produce un producto coloreado visible con un microscopio convencional de luz transmitida. Se realiza principalmente sobre secciones de tejido FFPE porque las muestras que se han fijado en formol adquieren cierto nivel de autofluorescencia por lo que en muchos casos la interpretación de una técnica FISH sobre este tipo de muestras es muy problemática.

Algunas aplicaciones son:

- Detección de secuencias génicas de virus oncológicos como el VPH y el virus de Epstein Barr (VEB).
- Estudios de expresión génica mediante la alteración de ARNm concretos.

10.1.- Protocolo genérico:

1. Desparafinación: se realiza con xilol. La rehidratación con baños sucesivos en alcoholes de graduación decreciente (100%--> 96%--> 70%) hasta agua destilada, lo que provoca la rehidratación del tejido (el agua sustituye a la parafina).

2. Digestión enzimática: Durante la fijación, el formol produce enlaces entre las proteínas y

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

otras macromoléculas. Por eso este es un paso clave en la CISH, porque el tratamiento enzimático libera a los ácidos nucleicos de su unión a histonas y otras proteínas, y de esta forma las sondas pueden acceder libremente a la secuencia diana. Las enzimas más utilizadas son la proteinasa K y la pepsina.

3. Prehibridación: Tiene como finalidad el bloqueo de uniones inespecíficas de la sonda. Se consigue inundando el tejido con solución de prehibridación de ADN de esperma de salmón fragmentado.

4. Hibridación: Se deposita sobre el tejido una pequeña cantidad de sonda sobre una placa calefactora a 95°C/5-10min hasta separar totalmente las cadenas de ADN. Se coloca una cámara húmeda y se incuba.

5. Lavado post-hibridación: Los portas se lavan por inmersión en solución colocada en cubetas coplin con los tiempos y temperatura que indique el fabricante.

6. Detección del híbrido: Las sondas utilizadas se marcan con haptenos y se detecta por métodos inmunohistoquímicos indirectos con amplificadores de señal, obteniéndose un producto coloreado que se deposita en el tejido alrededor del híbrido.

7. Contratinción: Tras el revelado del marcaje aparece en el tejido manchas coloreadas en las regiones en que se encuentra la secuencia diana. El resto del tejido no es visible al microscopio óptico por lo que no se puede interpretar el resultado. Por eso es necesario contrateñir el tejido con una tinción suave que no enmascare el resultado de la ISH. Se utiliza hematoxilina de Mayer.

8. Visualización: Para visualizar las preparaciones utilizaremos el microscopio óptico convencional. La reacción coloreada se observará en el núcleo o en el citoplasma de las células que contengan las secuencias detectadas.

10.2.- Controles de CISH

Son muy importantes para poder interpretar correctamente los resultados. Se llevan a cabo controles positivos y negativos y se hacen tanto de la técnica como de la muestra.

Control positivo de la técnica: Sirve para comprobar que todos los reactivos funcionan correctamente. Se realiza hibridando una muestra conocida que contiene la secuencia diana. Por tanto, si todos los reactivos están bien, el control nos dará color.

Control negativo de la técnica: Sirve para comprobar que ningún reactivo empleado tiñe de manera inespecífica algún componente del tejido del mismo color que el marcaje empleado.

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

También se aplican controles a las muestras para comprobar su estado. Se realiza exactamente igual que la reacción problema eliminando la sonda de la solución de hibridación. Por tanto, si los reactivos no van bien el control nos dará color, como si estuviera la diana (que sabemos que no está porque no la hemos añadido).

Control positivo de la muestra: sirve para comprobar que el tejido ha sido tratado adecuadamente y que la fijación se ha efectuado correctamente, conservando el tejido sus ácidos nucleicos aptos para la hibridación. Se realiza con sondas específicas de secuencias repetidas para ADN y sondas poli-T para ARN.

Control negativo de la muestra: Sirve para comprobar que el resultado observado es específico y no se debe a uniones inespecíficas de la sonda a distintas estructuras del tejido. Se realiza sustituyendo la sonda específica por una secuencia no complementaria con los ácidos nucleicos de la muestra.

U.D. 5 TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN

GLOSARIO

Blot/blotting: es la transferencia de ADN/ARN o proteínas a una membrana o un gel.

Cubeta Coplin: una especie de cilindros de vidrio con tapa y relieve en los costados donde podemos colocar los portaobjetos para teñir las muestras, lavar o llevar a cabo otros procesos que requieran líquido.

Huella genética: es una técnica que se utiliza para distinguir entre los individuos de una misma especie utilizando muestras de su ADN. Es decir, busca las secuencias que diferencian a ese individuo del resto.

Placa microtituladora: es un tipo de placa multipocillo pero con volúmenes pequeños.