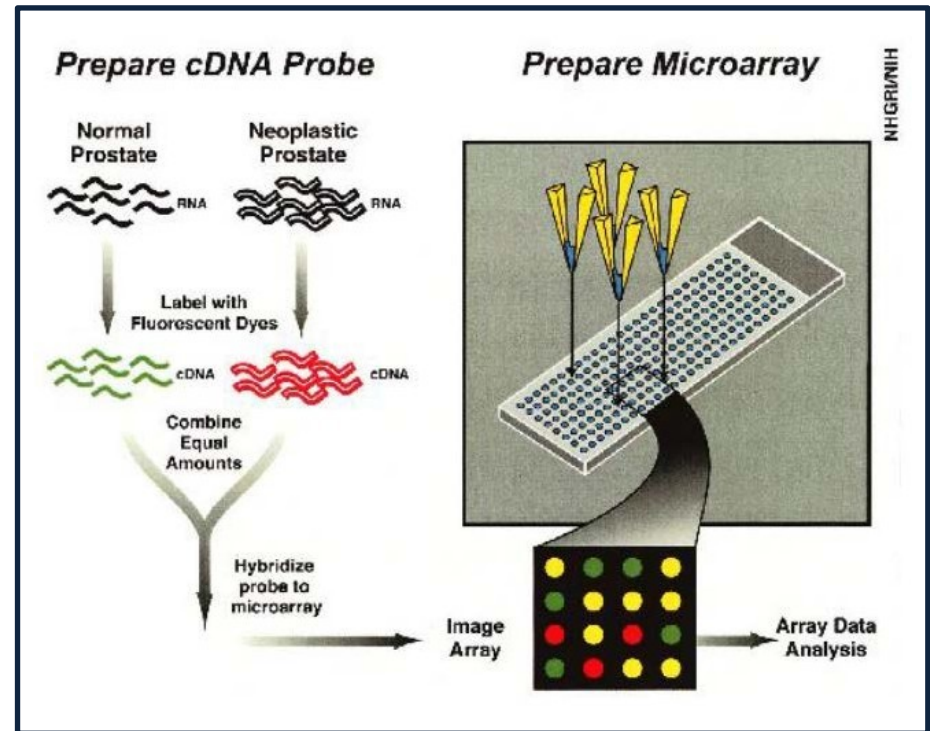
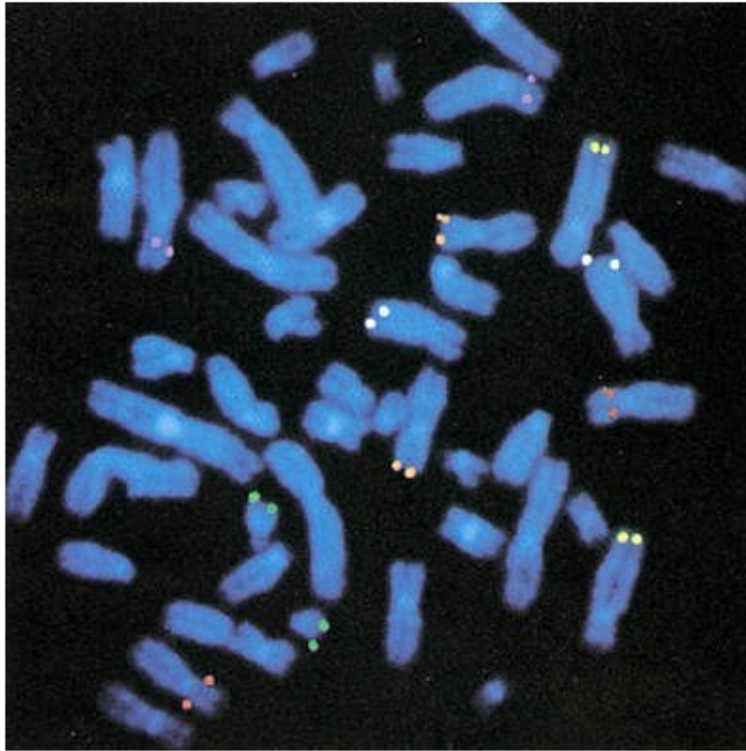




TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas de hibridación se clasifican tomando como criterio el medio o soporte en que se llevan a cabo.

```
graph TD; A[Las técnicas de hibridación se clasifican tomando como criterio el medio o soporte en que se llevan a cabo.] --> B[EN SOPORTE SÓLIDO]; A --> C[EN SOPORTE LÍQUIDO]; A --> D[IN SITU]; B --> E[➤ DOT BLOT<br/>➤ SOUTHERN BLOT<br/>➤ NORTHERN BLOT<br/>➤ MICROARRAYS]; C --> F[➤ CAPTURA DE HÍBRIDO<br/>➤ T. DE ADN RAMIFICADO]; D --> G[➤ FLUORESCENTE (FISH)<br/>➤ CROMOGÉNICA (CISH)];
```

EN SOPORTE SÓLIDO

- DOT BLOT
- SOUTHERN BLOT
- NORTHERN BLOT
- MICROARRAYS

EN SOPORTE LÍQUIDO

- CAPTURA DE HÍBRIDO
- T. DE ADN RAMIFICADO

IN SITU

- FLUORESCENTE (FISH)
- CROMOGÉNICA (CISH)

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

EN SOPORTE SÓLIDO

Se caracterizan porque:



- Lo habitual es fijar al soporte la muestra que contiene la secuencia diana e incubar posteriormente con la sonda marcada para formar el híbrido.

En esta metodología se basan las técnicas:

- Dot blot,
- Southern blot,
- Northern blot.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

EN MEDIO LÍQUIDO

El híbrido
sonda/secuencia
diana



se forma en solución,



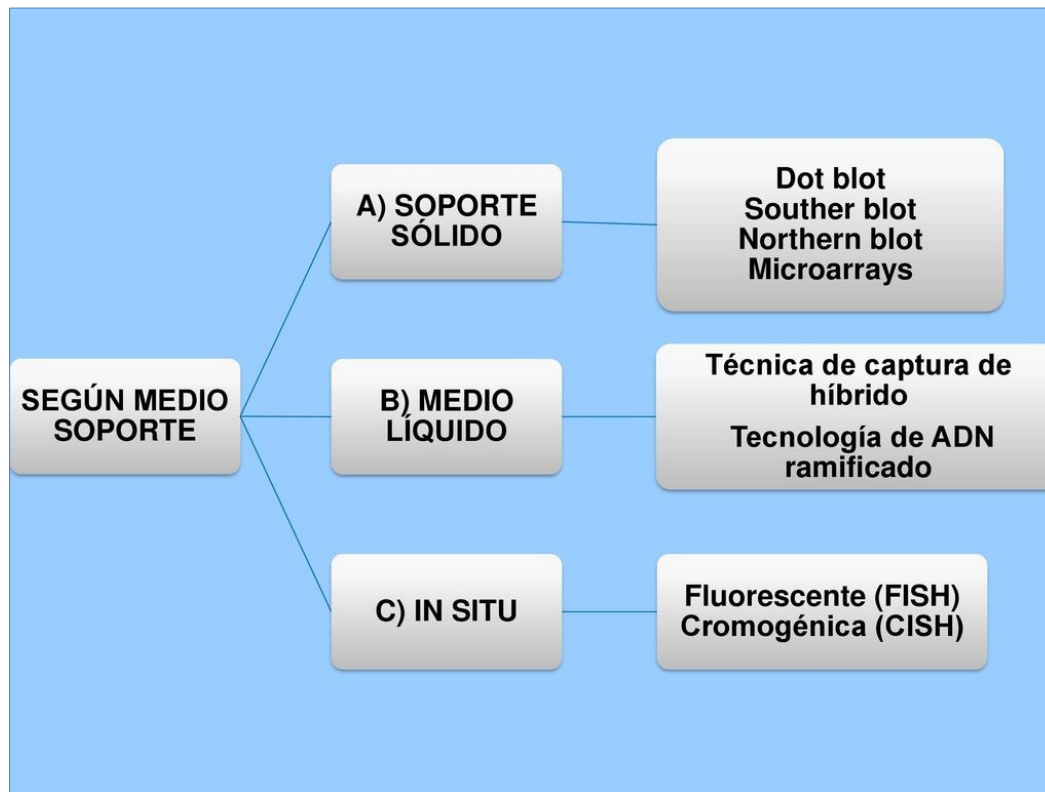
y posteriormente se fija a
la pared del pocillo para
proceder a su detección

- Habitualmente **no se marca ni la sonda ni la muestra**.
- El híbrido se detecta por métodos indirectos más o menos complejos.
- Estas técnicas se usan fundamentalmente para **diagnóstico microbiológico** y especialmente para la detección de **virus**
- Permiten **analizar múltiples muestras simultáneamente** y son fácilmente automatizables
- Las más importantes son: técnica de **captura de híbrido** y la **técnica del ADN ramificado**

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU (ISH)

- Son las técnicas en las que la hibridación de los ácidos nucleicos se realiza directamente sobre extensiones citológicas o secciones de tejido
- El resultado obtenido se analiza microscópicamente en el contexto de detalles morfológicos.
- Se puede realizar sobre preparaciones citogenéticas de metafases o núcleos interfásicos desnudos, extensiones citológicas y secciones de tejido
- Dependiendo del marcador empleado, se diferencian dos tipos de ISH:
 - **FLUORESCENTE (FISH)**: las sondas se marcan con fluorocromos. Se requiere un **microscopio de fluorescencia** para visualizar los resultados.
 - **CROMOGÉNICA (CISH)**: las sondas se marcan con haptenos. Los híbridos se detectan por **métodos inmunohistoquímicos** produciéndose al final una **reacción coloreada** que se visualiza con un **microscopio óptico normal**.



TÉCNICAS HIBRIDACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

DOT BLOT

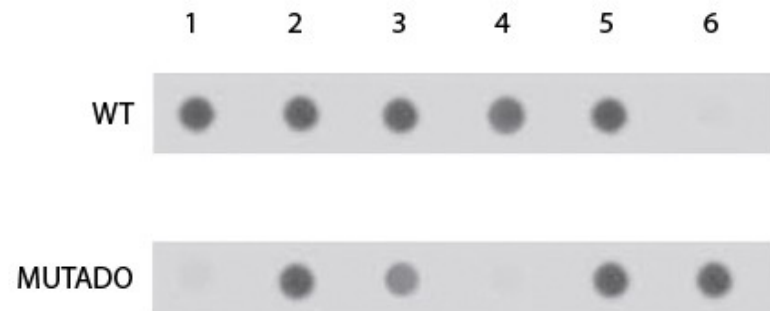
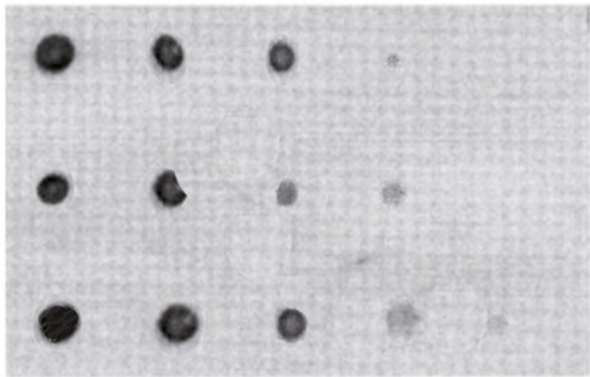
El **dot blot** es una técnica de hibridación simple:

- Utiliza **membranas de nitrocelulosa o nailon** como soporte sólido
- Permite detectar secuencias de ácidos nucleicos, **ADN** o **ARN**, en una mezcla compleja,
- No aporta ninguna información adicional.
- Permite estudio simultáneo de varias muestras
- Se puede realizar con **sondas radiactivas** o con sondas **marcadas con haptenos**.
- La técnica se lleva a cabo incubando secuencialmente las membranas con los reactivos por inmersión en cubetas, en bolsas de plástico termosellables o con cierre hermético o en frascos con tapón de rosca.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PROTOCOLO DOT BLOT

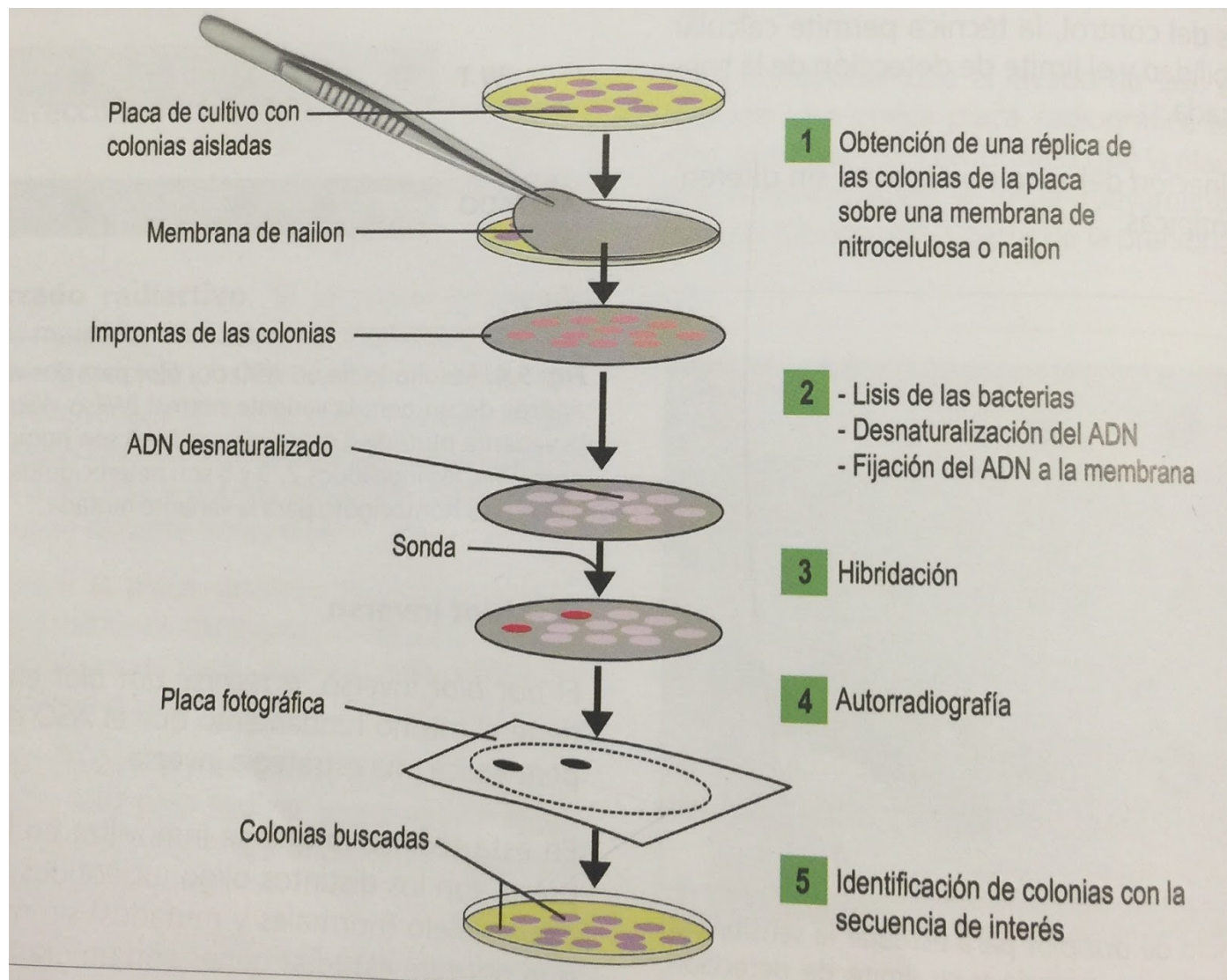
- Aplicación de la muestra a la membrana
- **Prehibridación**: para bloquear posibles uniones inespecíficas de la sonda
- **Hibridación**
- **Lavado posthibridación**
- **Detección del híbrido**: según el marcaje utilizado (radiactivo o hapteno)
- **Rehibridación**; cuando se usan sondas radiactivas, las membranas pueden someterse a nuevas rehibridaciones con otras sondas previa desnaturalización para deshacer la unión y lavado.



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

APLICACIONES DOT BLOT

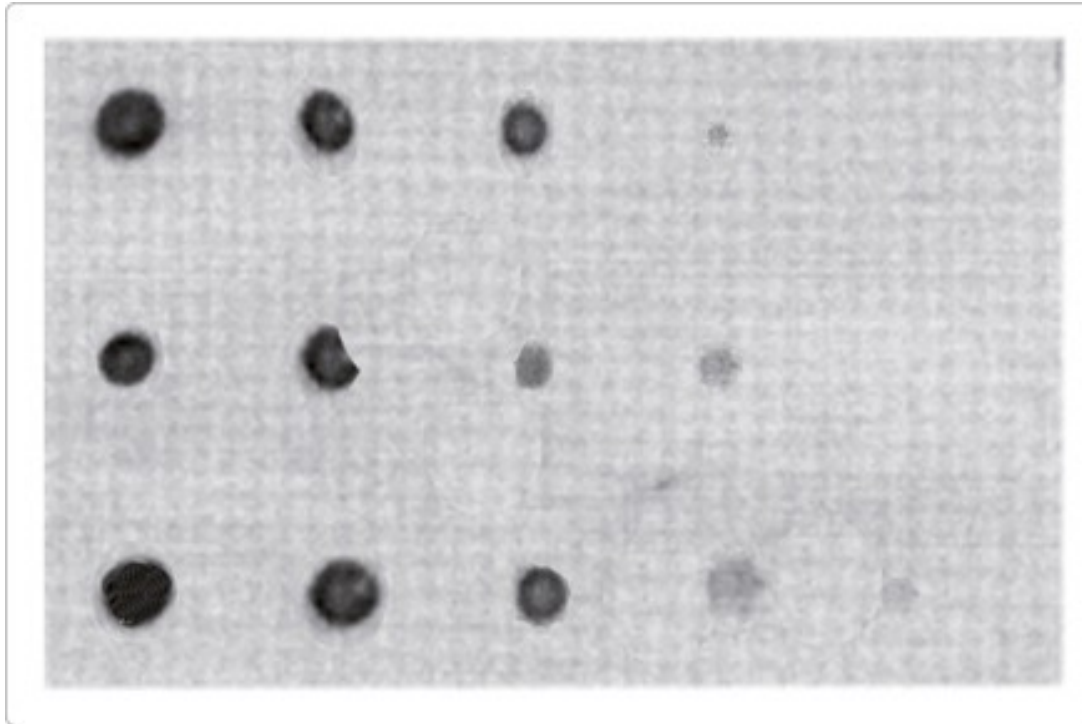
- Como técnica de rastreo o screening para detectar secuencias de interés en múltiples muestras simultáneamente.
- Algunos ejemplos de este tipo de aplicación son:
 - **Estudios de expresión génica**, para detectar ARNm concretos en poblaciones celulares en situación basal y tras distintas estimulaciones, en células tumorales, etc.
 - **Detección de secuencias extrañas en muestras biológicas**, por ejemplo para detectar la presencia de virus, bacterias o parásitos.
 - **Control de calidad de PCR** para comprobar la especificidad de los productos amplificados. En este sentido el acoplamiento PCR/dot blot mejora también en algunos casos la sensibilidad de la PCR sola, permitiendo la confirmación de casos dudosos.
 - **Control de calidad del marcaje de sondas**, utilizando como muestra secuencias diana control.
 - **Determinación del sexo en especies sin diferencias fenotípicas**.



Tipo especial de dot blot utilizado para detectar bacterias que portan una secuencia génica concreta, normalmente un gen de interés, un plásmido natural o un plásmido recombinante

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

DOT BLOT



Ejemplo de dot blot para estudiar la sensibilidad de una sonda tras su marcaje y su límite de detección. Cada fila corresponde a una sonda distinta y cada columna a una concentración menor de un ADN control con la secuencia diana.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

SOUTHERN BLOT

Detecta *fragmentos de ADN*, separados por tamaño mediante electroforesis en gel.

Implica cinco pasos:

- Separación electroforética
- Desnaturalización
- Transferencia a membrana
- Hibridación
- Revelado

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PASOS SOUTHERN BLOT

Implica CINCO pasos:

➤ **Separación electroforética:**

- Se digiere el ADN diana con *enzimas de restricción*.
- Los fragmentos resultantes se separan según su tamaño mediante *electroforesis en gel de agarosa*.
- Durante la electroforesis, los fragmentos de ADN cargados negativamente migran desde el polo negativo hacia el positivo.

➤ **Desnaturalización:** tras la electroforesis,

- Los fragmentos de ADN se hidrolizan parcialmente con un ácido débil
- Se desnaturalizan con una base fuerte, para permitir la transferencia.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PASOS SOUTHERN BLOT

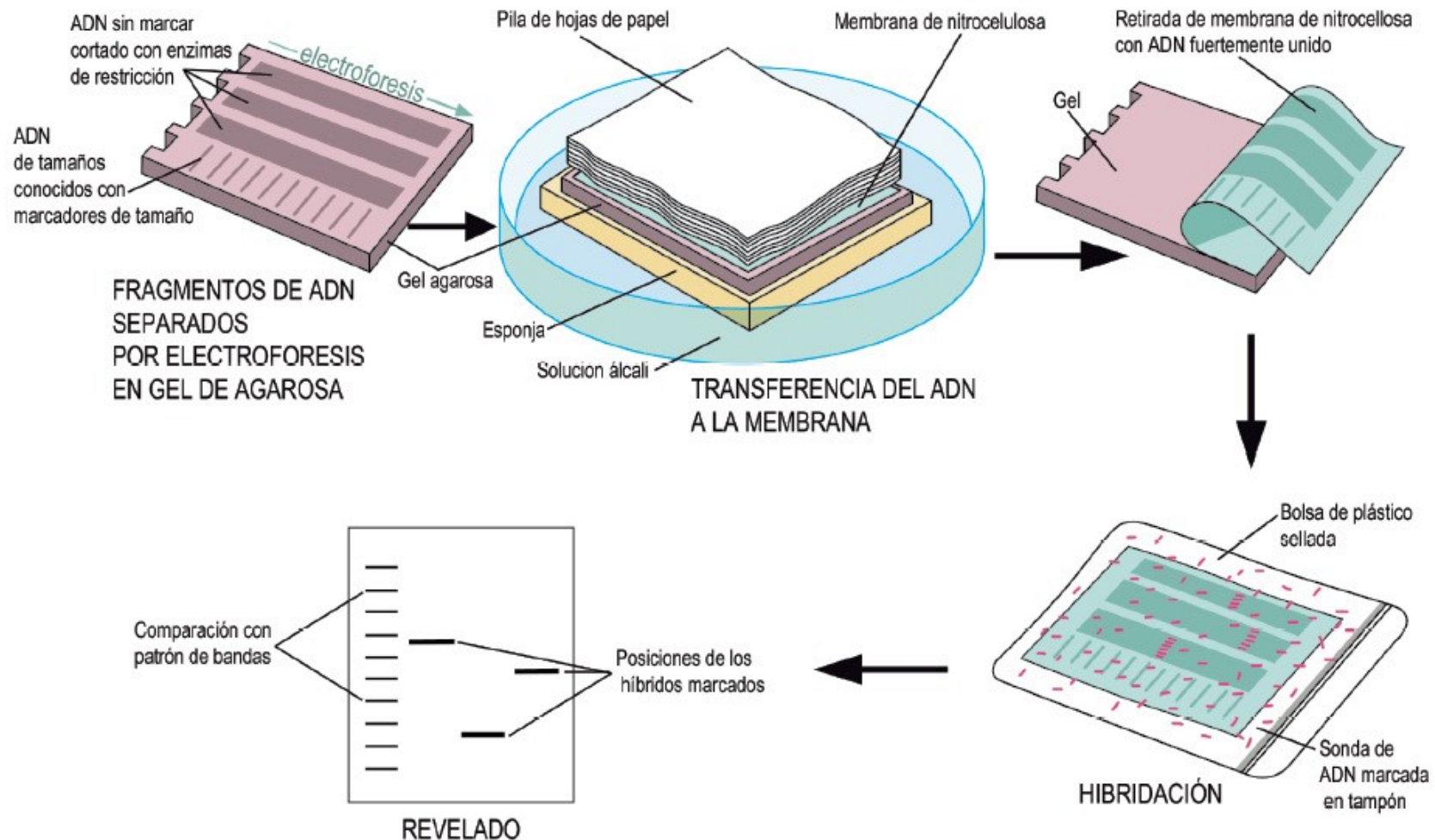
➤ Transferencia:

- Debido a la fragilidad de los geles de agarosa y para que los fragmentos de ADN no se desplacen por el gel → **el ADN se transfiere a un filtro de nitrocelulosa o de nailon.**

➤ Hibridación:

- En este momento los fragmentos monocatenarios de ADN diana fijos en el filtro de nitrocelulosa se pueden hibridar con sondas monocatenarias de ADN marcadas.
- Durante la incubación las sondas hibridarán sólo con las secuencias de ADN diana complementarias
- Detección: la sonda unida a la diana complementaria se puede visualizar de una manera sencilla en el filtro, mediante la **exposición a rayos X** (sondas con marcaje radioactivo) o con **una película sensible a la luz** (marcaje las sondas con fluorocromos).

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS



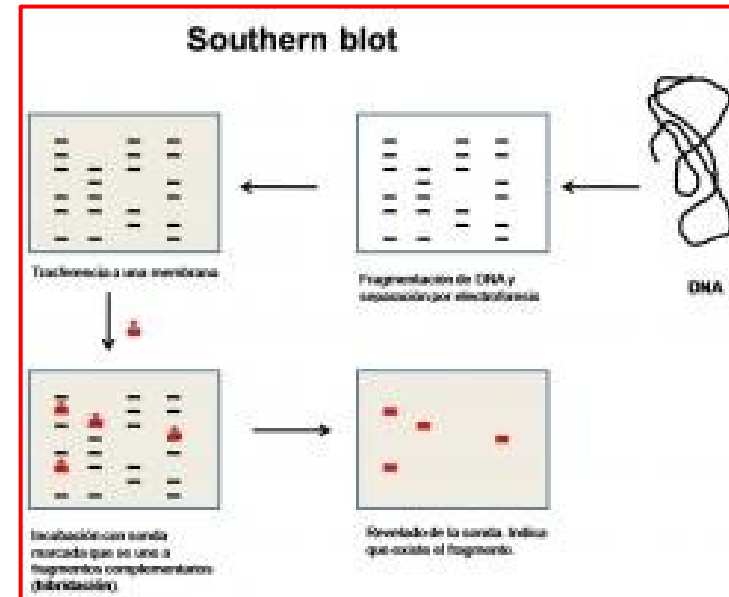
TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

APLICACIONES SOUTHERN BLOT

El Southern Blot tiene múltiples aplicaciones, aunque muchas de ellas están siendo sustituidas por técnicas como la PCR.

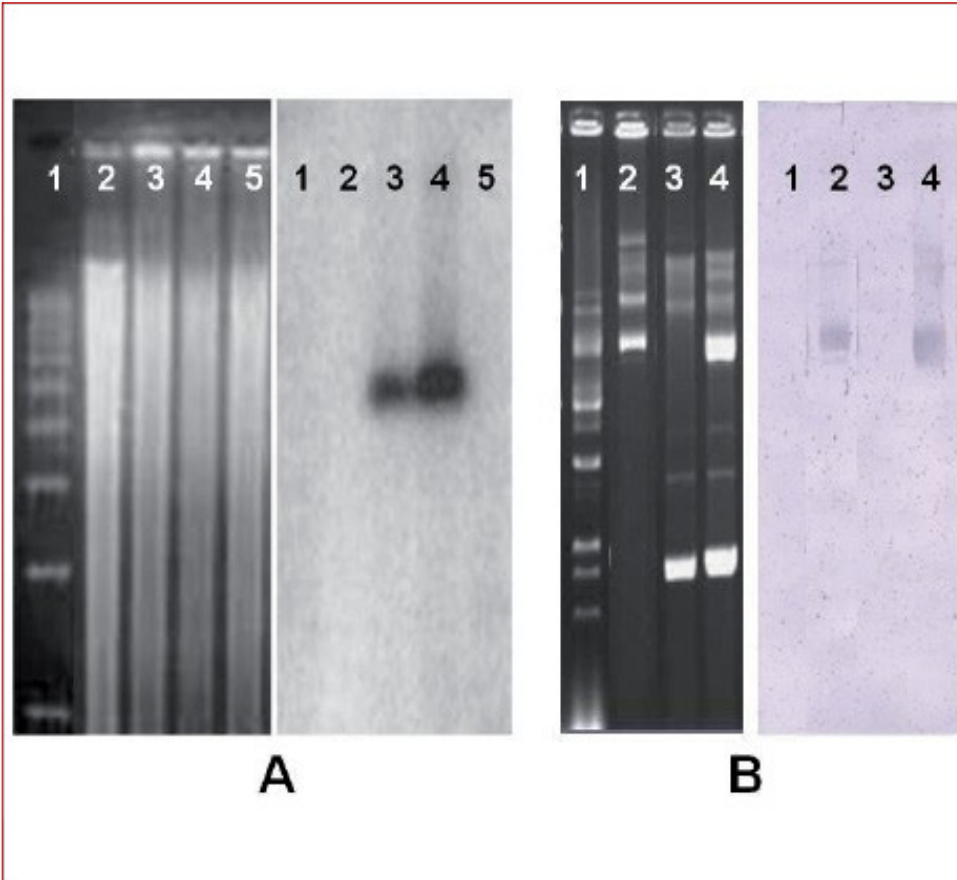
Entre las principales aplicaciones destacan:

- Elaboración de huellas genéticas
- El estudio de mutaciones estructurales
- La detección de secuencias adquiridas



<https://youtu.be/LNVdOdNQyCM>

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS



A) Partiendo de un **ADN genómico** se detecta una secuencia concreta con sondas marcadas radiactivamente:

- Las muestras **3** y **4** contienen la secuencia en estudio
- Las muestras **2** y **5** son negativas.

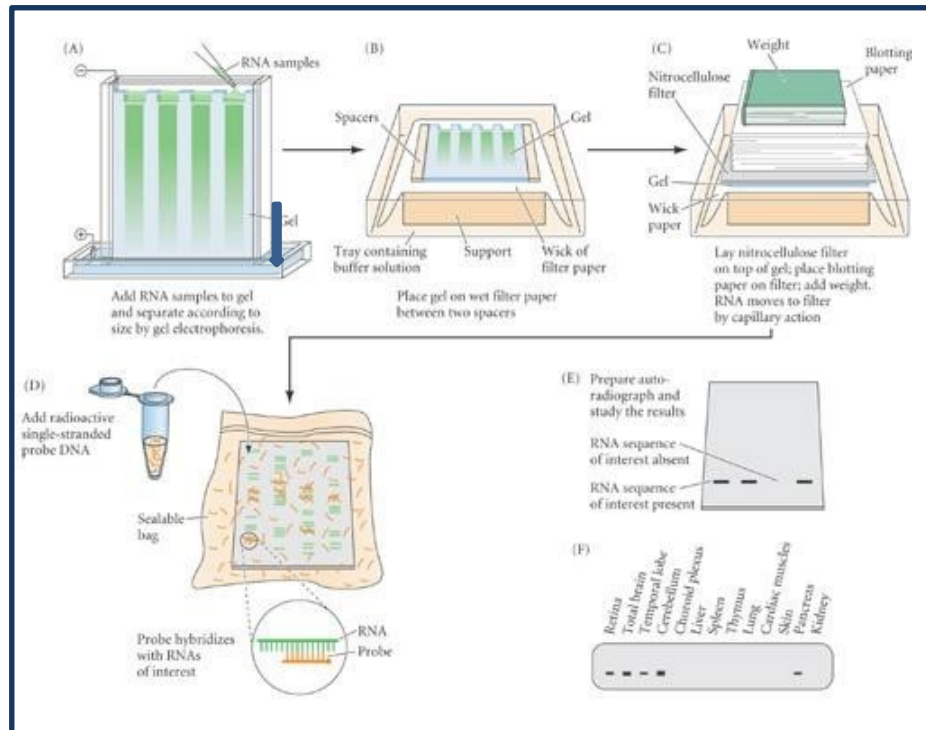
B) Partiendo de **ADN plasmídico**, las sondas marcadas con hapteno y el revelado es cromogénico:

- Las muestras 2 y 4 son positivas para la secuencia en estudio
- Las muestras 1 y 3 son negativas.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

NORTHERN BLOT

- Fue desarrollada en 1977 como una variación de la técnica de Southern en la que **los fragmentos diana que se utilizan son de ARN en lugar de ADN**.
- Por su menor tamaño **no es necesaria la fragmentación** con endonucleasas de restricción, pero debe evitarse la acción de las ARNasas endógenas y exógenas.
- Esta técnica se emplea principalmente **para determinar el tamaño del ARN** y obtener información sobre el modelo de expresión de genes concretos.



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MICROARRAYS o BIOCHIPS

Los microarrays de ADN son conjuntos o colecciones de **sondas** (fragmentos de ADN) distintas, fijadas a una superficie sólida (vidrio, plástico o silicio)

- Partiendo de una única muestra y realizando un único proceso de hibridación, un microarray detecta simultáneamente miles de secuencias distintas, cuantitativa y cualitativamente.
- **Permite estudiar la expresión de muchos genes a la vez**
- La gran cantidad de información que aportan en una única reacción los convierte en **potentes herramientas para estudios genómicos y de expresión génica**.
- Las **sondas ancladas en el biochip son monocatenarias y no están marcadas**.
- Se marca con fluorocromos la muestra que se va a estudiar.
- La lectura del resultado obtenido tras la hibridación requiere un escáner de lectura basado en tecnología láser y un potente software de análisis.



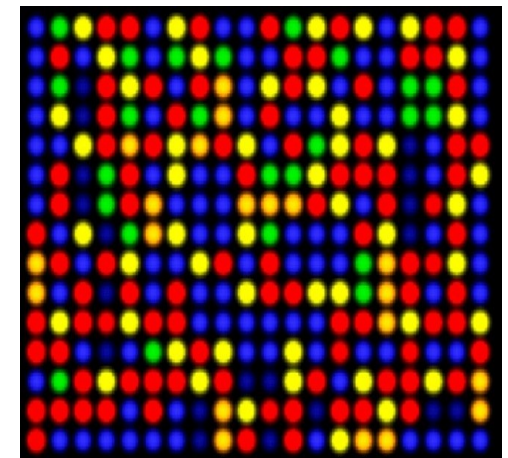
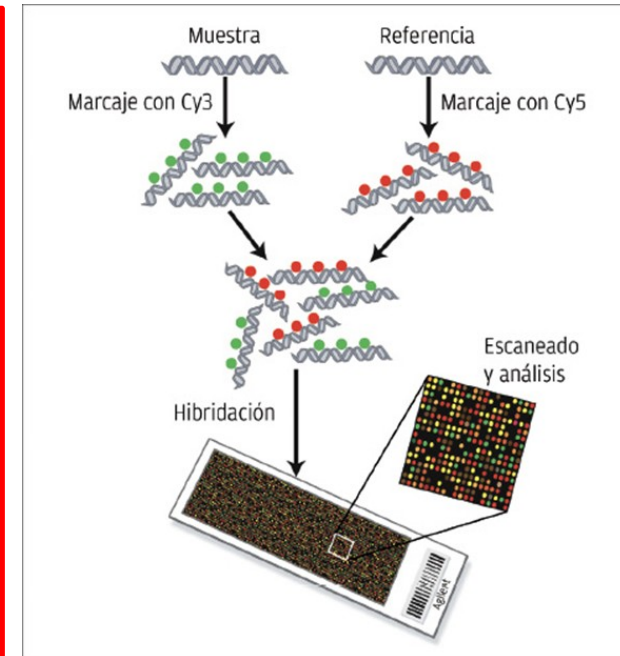
TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PROTOCOLO MICROARRAYS o BIOCHIPS

Varían mucho según el fabricante y la muestra que se quiere analizar.

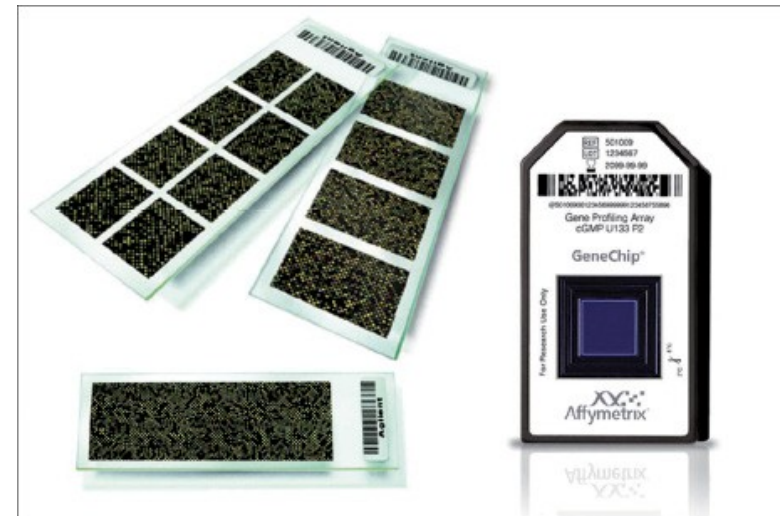
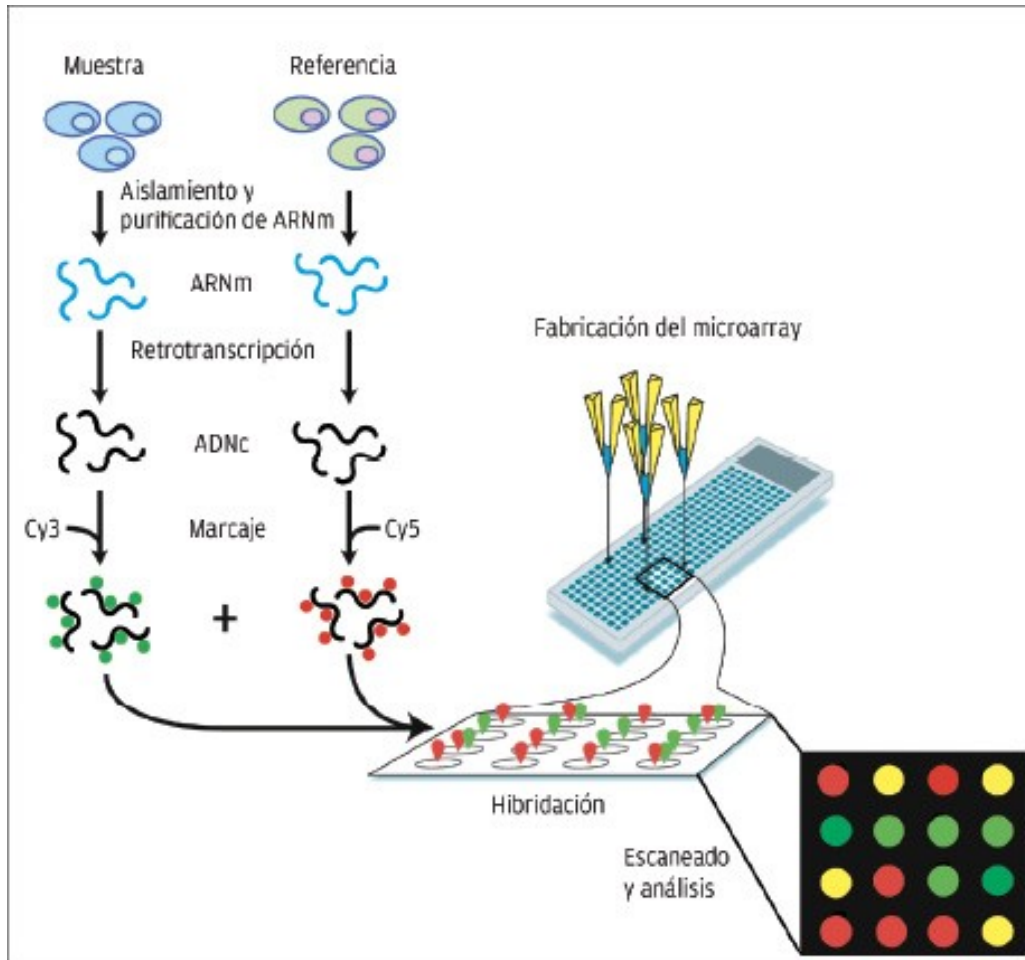
En todos los protocolos hay unos pasos comunes:

- **Marcaje de la muestra**: las sondas fijadas al micrarray no están marcadas, por lo que el primer paso de la técnica consiste en **marcar la muestra con un fluorocromo**.
- **Hibridación y lavados posthibridación**: se llevan a cabo siguiendo la rigurosidad recomendada por el fabricante.
- **Lectura del microarray**: se realiza mediante escáner que dispone de luz láser que excita cada punto de la matriz con la longitud de onda adecuada al fluorocromo utilizado y de un detector que mide la intensidad de la fluorescencia emitida por cada punto de la matriz.
- **Análisis e interpretación de los resultados**: se realiza mediante software específico



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

MICROARRAYS o BIOCHIPS



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (aCGH)

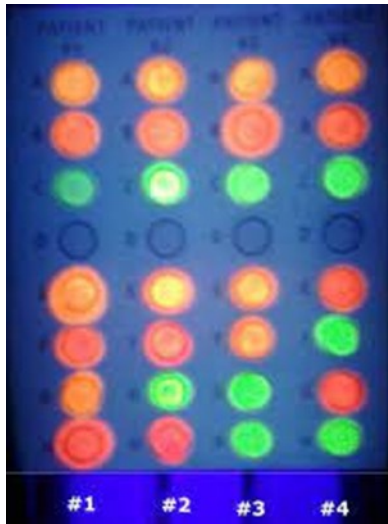
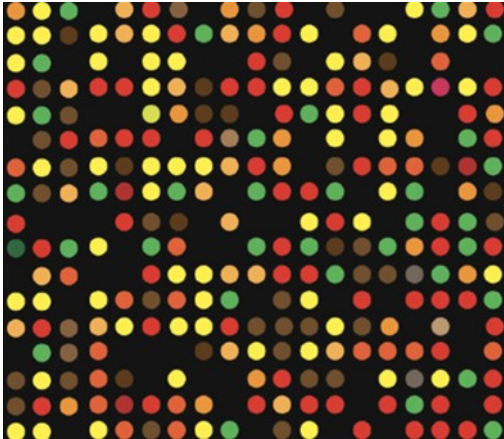
Se basa en comparar el ADN del paciente con un ADN control o de referencia (sin alteraciones) para detectar ganancias (duplicaciones) o pérdidas (deleciones) de genes en el paciente.

Procedimiento:

- Se disponen las **muestras (marcadas)** con distintos **fluorocromos** sobre una **matriz sólida, que contiene multitud de sondas**, cuya secuencia es complementaria a las regiones del ADN que se quieren estudiar.
- **Se marca el ADN del paciente con el fluorocromo cianina Cy3 (verde).**
- **Se marca el ADN control con cianina Cy5 (roja).**
- Ambos ADN **se mezclan en la misma proporción y se añaden a la matriz donde competirán por unirse a las sondas**, y detectaremos el que esté unido en más cantidad, aparecerá su color.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (aCGH)

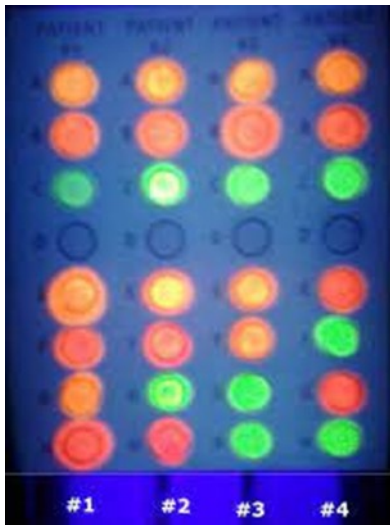


RESULTADOS:

- **Color amarillo** (mezcla de verde y rojo): indica **misma intensidad** de hibridación, por lo que **no hay alteración en el paciente** (genes inalterados).
- **Color verde**: indica que hay más hibridación de la muestra del paciente, por lo que el **paciente ha ganado material genético** (duplicaciones).
- **Color rojo**: indica que hay más hibridación del ADN control y menos del paciente, por lo que **el paciente ha perdido material genético** (delección).
- **NO detecta traslocaciones o inversiones**

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARADA (aCGH)



APLICACIONES:

- Diagnóstico prenatal.
- Diagnóstico de discapacidad intelectual.
- Anomalías congénitas múltiples.
- Pacientes con trastorno generalizado del desarrollo, autismo, déficit de atención.

ESTUDIOS COMPARATIVO DE EXPRESIÓN GÉNICA

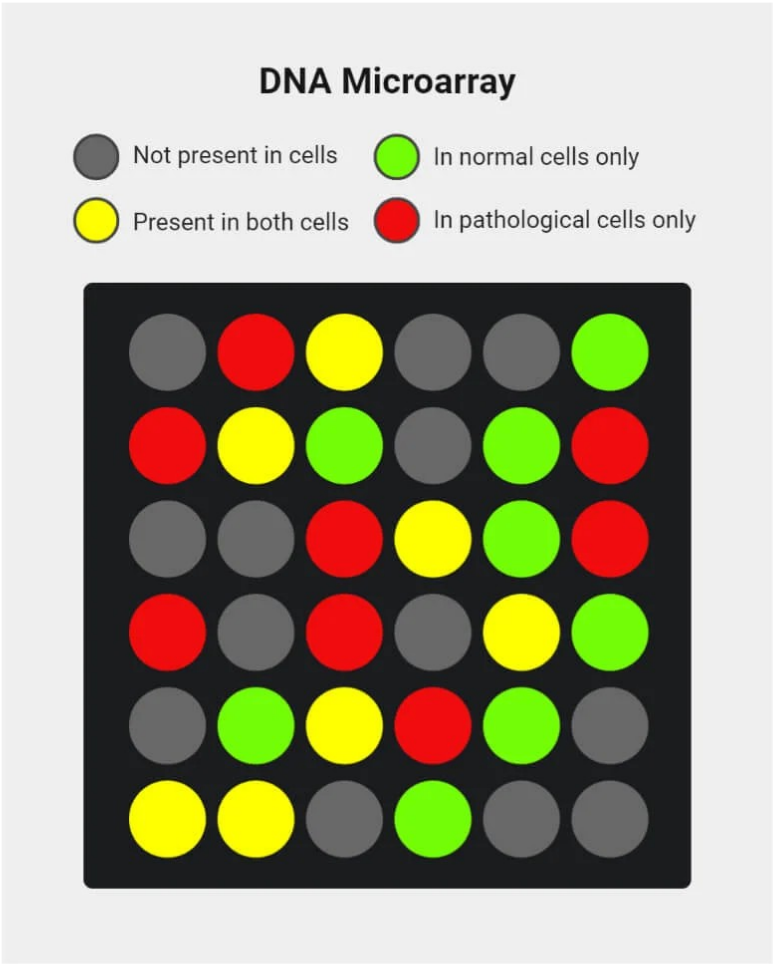
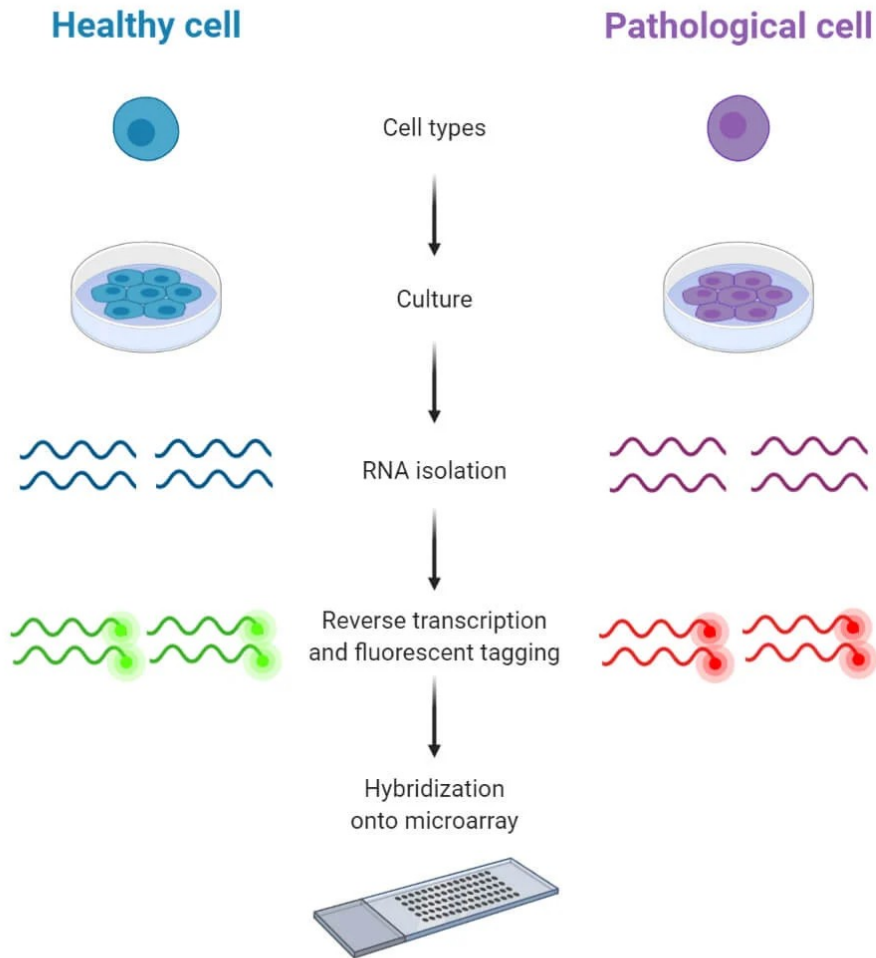
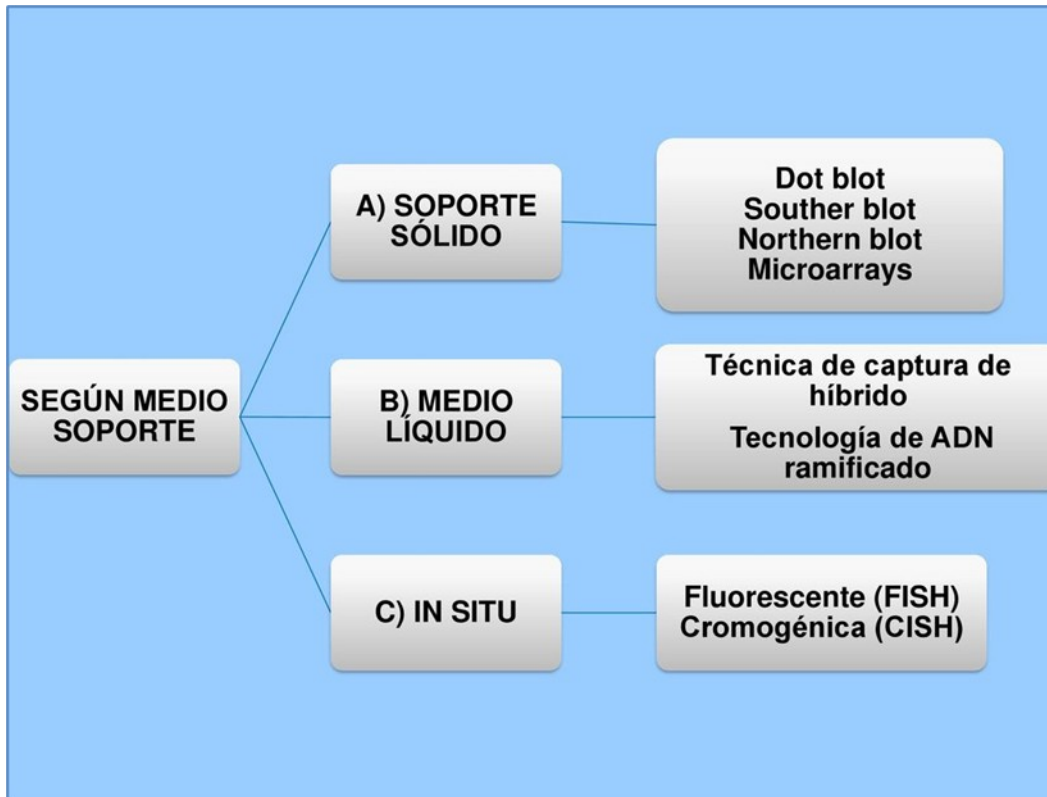


Image By Sagar Aryal, created using biorender.com



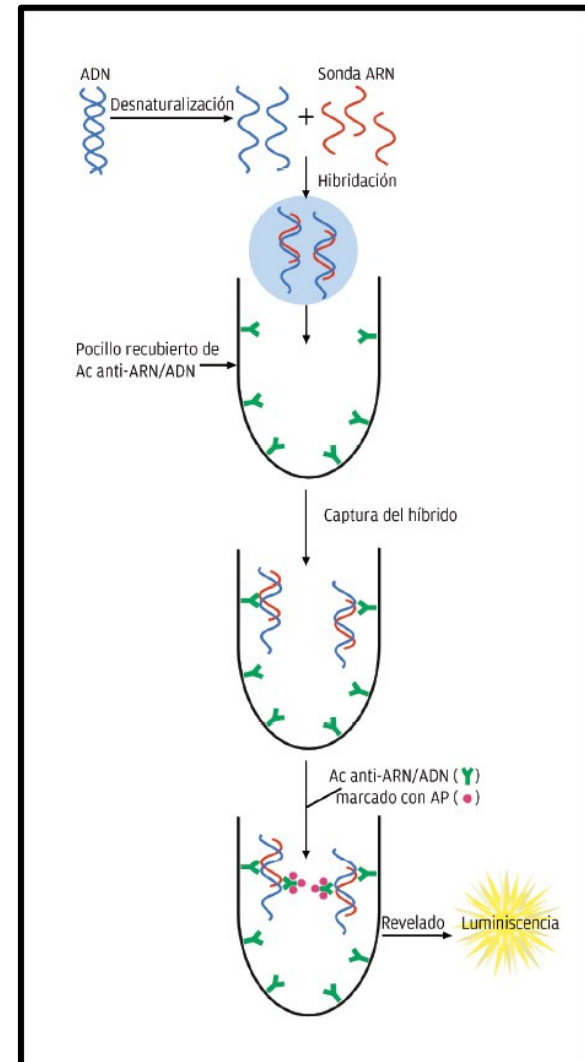
TÉCNICAS HIBRIDACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La técnica de hibridación de **CAPTURA DE HÍBRIDO** 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
- Si la secuencia diana es de ARN, la sonda será de ADN

- La «**captura**» del híbrido ARN/ADN **se produce mediante anticuerpos específicos que reconocen estos heterodúplex y que se hallan fijados en las paredes de pocillos de una placa microtiter.**
- Esta técnica se desarrolló inicialmente para detectar el virus del papiloma humano (VPH) en muestras cervicales (cuello uterino)
- En la actualidad permite detectar múltiples agentes infecciosos.



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Siguiendo con el ejemplo del **VPH** (es un virus ADN), los pasos que se siguen, partiendo de una **muestra cervical**, son:

- **Lisis de los virus y desnaturalización del ADN.** Se realiza en un tubo tipo eppendorf mezclando los volúmenes adecuados de **muestra** y una **solución alcalina desnaturalizante**.
- **Hibridación.** En un tubo limpio se mezclan las cantidades adecuadas de la **muestra desnaturalizada** y la **sonda**, en este caso de **ARN**, disuelta en el tampón adecuado a la temperatura de incubación.
- **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.
- **Detección del híbrido.** Se añaden al pocillo anticuerpos anti-ARN/ADN **marcados con fosfatasa alcalina**, que también se van a unir al híbrido sonda/secuencia diana durante la incubación.
- **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 un lector de placas.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

La tecnología del **ADN RAMIFICADO** consiste en un sistema de amplificación de señal, basado en la unión de la secuencia diana a un macrocomplejo de ADN, de tipo arborescente, mediante sucesivas hibridaciones.

La tecnología del ADN ramificado, se diseñó para:

- Aumentar la sensibilidad de las técnicas de captura de híbrido,
- Una de sus principales aplicaciones es la cuantificación de cargas virales en muestras biológicas.

Los **pasos** que se siguen son estos

1. Lisis de las partículas víricas y desnaturalización (en los virus ADN).
2. Hibridación con sondas específicas
3. Captura del híbrido
4. Preamplificación
5. Amplificación
6. Detección
7. Revelado

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

PASOS

1. **Lisis de las partículas víricas y desnaturalización** (en los virus ADN).
2. **Hibridación con sondas específicas**. Se usa una mezcla de **dos tipos de sondas**:
 - **Sondas para captura**: están 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.
 - **Sondas de extensión**: como en el caso anterior, una parte de la sonda es complementaria de una región del ácido nucleico vírico y la otra es complementaria del extremo de un oligonucleótido preamplificador
3. **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 para captura

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.**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 ácido nucleico vírico.

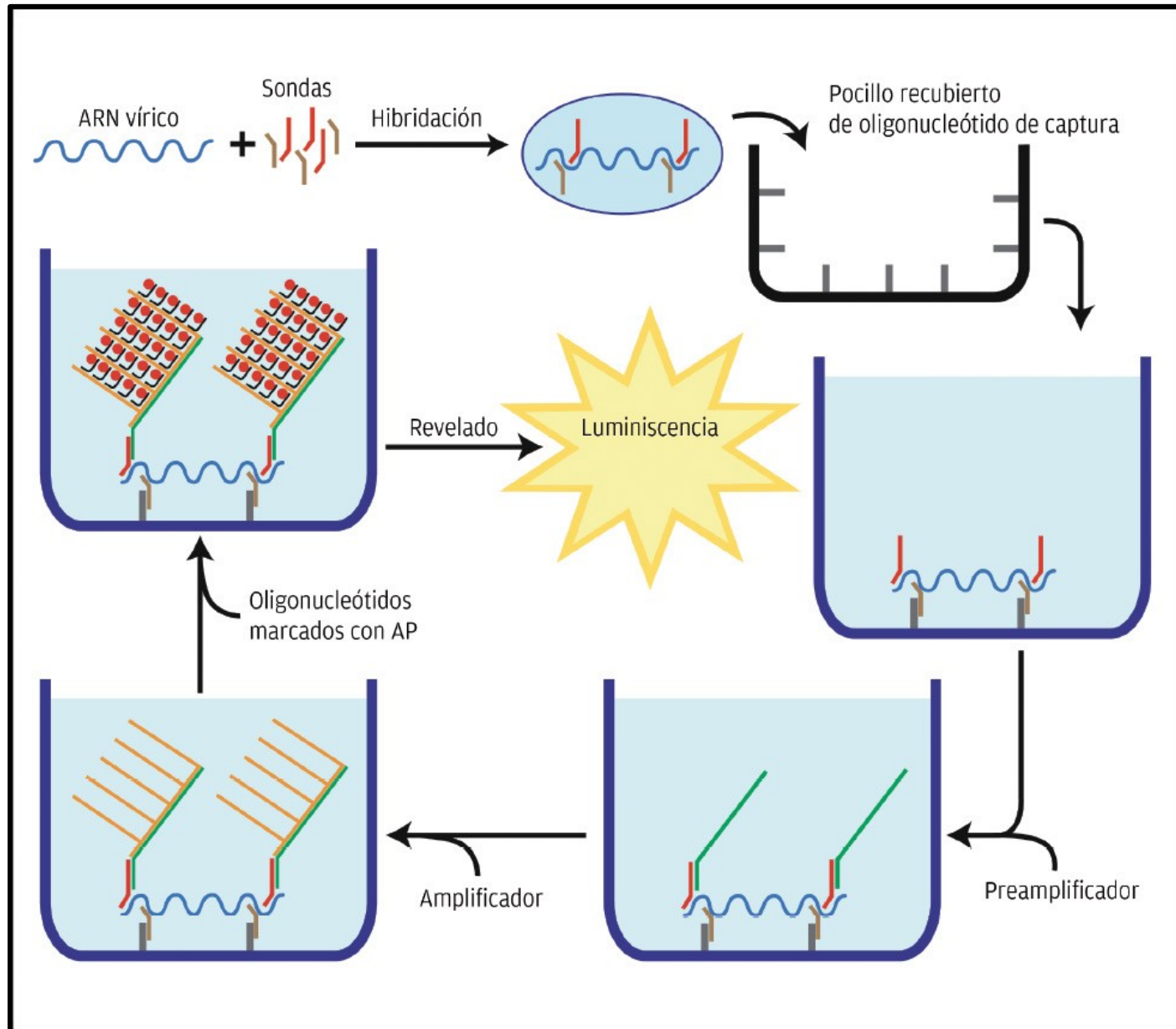
5.**Amplificación.** Se añaden al pocillo los oligonucleótidos amplificadores que se van a unir por sus extremos, mediante hibridación, a las secuencias repetidas del oligonucleótido preamplificador, constituyendo las «ramas» del sistema de amplificación de señal.

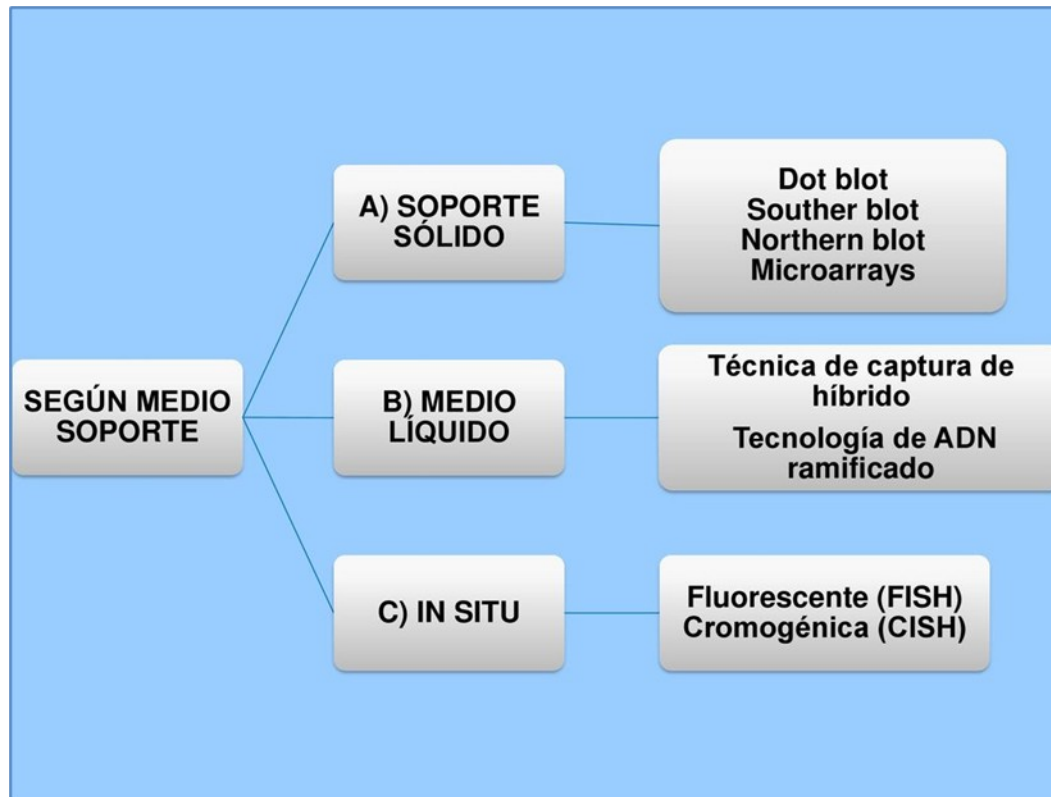
Los oligonucleótidos amplificadores contienen, a su vez, múltiples secuencias repetidas complementarias de pequeños oligonucleótidos marcados con fosfatasa alcalina.

6.**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 ramificado.

7.**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.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS





TÉCNICAS HIBRIDACIÓN IN SITU

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH (TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU)

- La expresión “in situ” significa que la secuencia diana se va a localizar en el sitio en que se encuentra fisiológicamente, es decir, en los cromosomas o núcleos interfásicos en el caso del ADN y en el citoplasma en el caso del ARN.
- 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 LAS TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN IN SITU

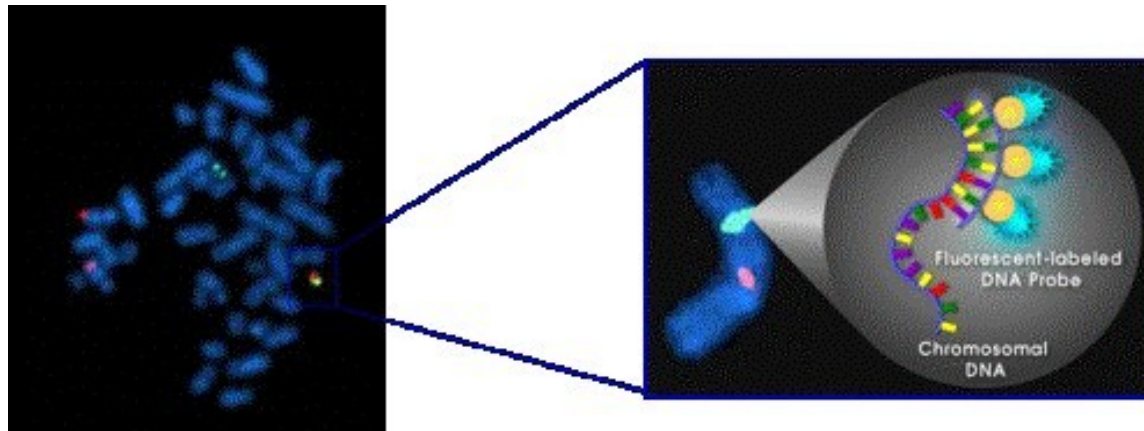
- No requiere la extracción y purificación previa de ácidos nucleicos
- Es relativamente rápida y sencilla, con un coste económico moderado.
- Se puede realizar sobre **material fresco, congelado** e incluso **fijado en formol e incluido en parafina**.
- Permite obtener información a nivel de célula individual en relación con el resto del tejido.
- Posibilita la realización de estudios retrospectivos.
- Utiliza sondas no radioactivas, tanto de ADN, como ARN y PNA

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH FLUORESCENTE (FISH)

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.

- Su principal aplicación es:
 - La detección de **alteraciones cromosómicas**, tanto **numéricas** como **estructurales** en relación con el diagnóstico y pronóstico de patologías oncológicas o con base genética.
- En muchas ocasiones complementa los resultados obtenidos con técnicas citogenéticas tradicionales (cariotipo)



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH FLUORESCENTE (FISH)

HIBRIDACIÓN



- La hibridación se realiza directamente sobre la preparación,
- Aplicando 5 ul de la sonda marcada en el área de hibridación y colocando encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- El portaobjetos se coloca sobre una placa calefactora a 72°C durante 4-5 minutos para desnaturalizar el ADN de la muestra y la sonda (en el caso de sonda de ADN bicatenario)
- Transcurrido ese tiempo se coloca el portaobjetos en una cámara húmeda para evitar la desecación y se incuba en estufa a temperatura recomendada por el fabricante de la sonda (37-42°C) durante 12-16 horas para que tenga lugar la hibridación

LAVADO DE POSHIBRIDACIÓN

se realizan por inmersión de los portaobjetos en soluciones de lavado colocadas en cubetas Coplin, una vez retirados los cubreobjetos.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH FLUORESCENTE (FISH)

CONTRATINCIÓN

- Se sacan los portaobjetos de la cubeta Coplin, se elimina el exceso de solución de lavado colocándolos en posición vertical sobre papel de filtro.
- Se dispensan 5-7 ul de solución de contratinción sobre el área de hibridación y se coloca encima un cubreobjetos, evitando la formación de burbujas.
- La solución de contratinción contiene diamino-fenil-indol (DAPI) por lo que al excitar la preparación con luz ultravioleta los núcleos muestran fluorescencia azul.
- Los portaobjetos pueden visualizarse inmediatamente con un microscopio de fluorescencia o conservarse en nevera a 2-8°C preservados de la luz.

VISUALIZACIÓN

- Las preparaciones se visualizan con un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados a los fluorocromos utilizados en las sondas.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH INTERFÁSICA

Consiste en la detección de secuencias de ADN en núcleos en interfase:

- Sobre preparaciones citogenéticas de núcleos desnudos
- En extensiones citológicas
- Secciones de tejido

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

- Numérica
- Estructural

Muchos estudios requieren más de una sonda, por lo que se suelen emplear cócteles de varias sondas con distintos fluorocromos

Para estudios citogenéticos en humanos, las sondas más utilizadas:

- Centroméricas
- Específicas de locus

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH interfásica

Sondas centroméricas(sondas CEP)→Hibridan con **secuencias localizadas en el centrómero** de cromosomas concretos

- Existen sondas centroméricas para cada cromosoma, que se denominan como **CEPx**, siendo x el número del cromosoma

Se emplean para el **estudio de anomalías cromosómicas numéricas**:

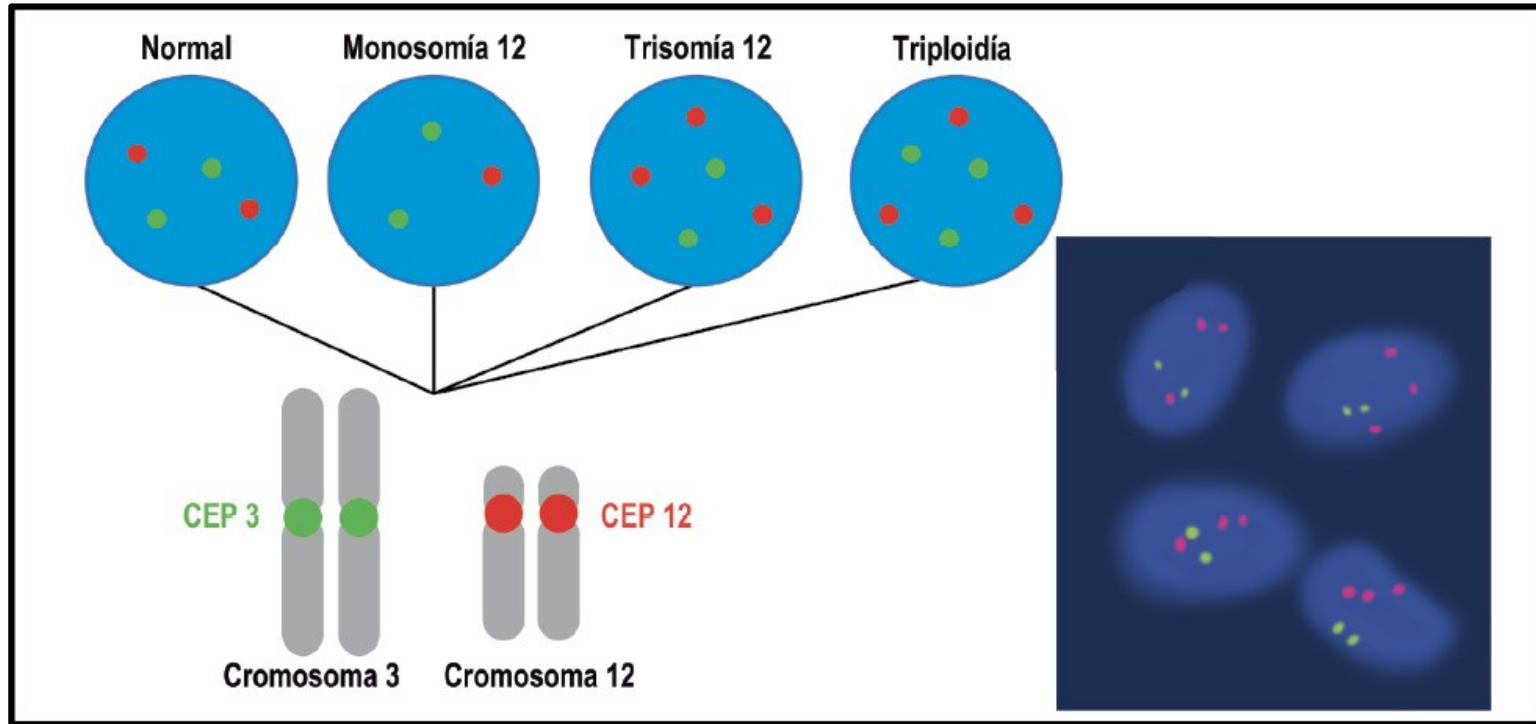
- Aneuploidías (monosomías, trisomías, etc.)
- Poliploidías

La hibridación se realiza con un cóctel de **por lo menos dos sondas CEP**

- Una específica del **cromosoma de interés** (marcada, por ejemplo, en verde)
- Otra específica de un **cromosoma control** (roja)

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH interfásica: Centromérica



- En núcleos interfásicos se observa **un punto** fluorescente por cada cromosoma
- En cromosomas **normales** se observarán **dos puntos** fluorescentes
- En **monosomías** se observará **un único punto** fluorescente
- En **trisomías** se observarán **tres puntos**
- En **poliploidías**, los puntos correspondientes al número de múltiplo de juegos

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH interfásica

Sondas específicas de locus(sondas LSI) → Hibridan en regiones (locus) concretas de un cromosoma, implicadas en patologías específicas

- Son útiles para detectar tanto **anomalías numéricas** como **estructurales**, siendo ésta última su principal aplicación
- Son muy útiles para identificar
 - Traslocaciones
 - Microdeleciones
 - Microamplificaciones

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH interfásica

Estrategias para la identificación de traslocaciones

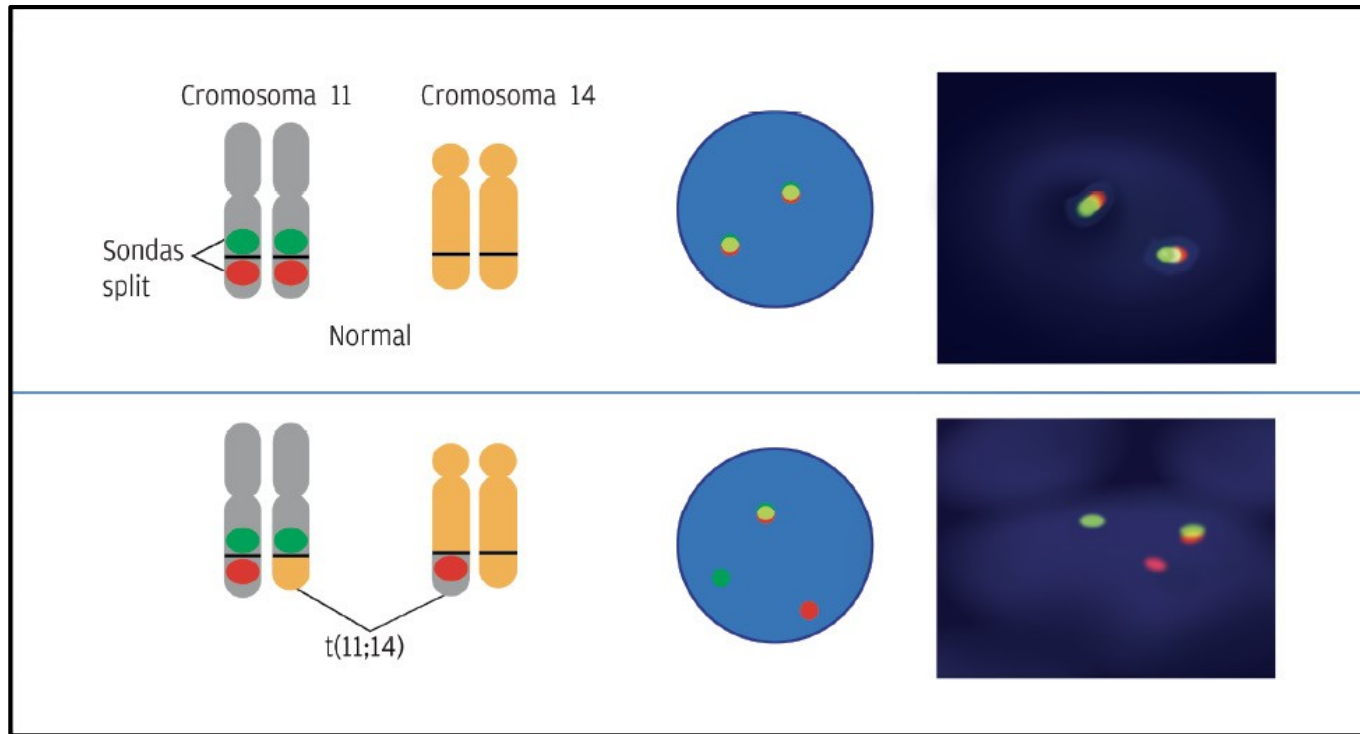
- La identificación de traslocaciones supone un problema
- Para resolverlo se desarrollaron dos estrategias, basadas en juegos de:
 - **Sondas de separación** → Se emplean para detectar translocaciones en las que uno de los cromosomas implicados es siempre el mismo, pero el otro puede variar
 - La hibridación 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 traslocación
 - **Sondas de fusión** → Se emplean para detectar translocaciones en las que se conocen los dos cromosomas implicados

En este caso se utilizan dos pares de sondas

 - Cada par de sondas va a hibridar a ambos lados de los puntos de rotura de cada uno de los cromosomas implicados en la translocación
 - Las dos sondas que flanquean el mismo punto de rotura están marcadas con el mismo color

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

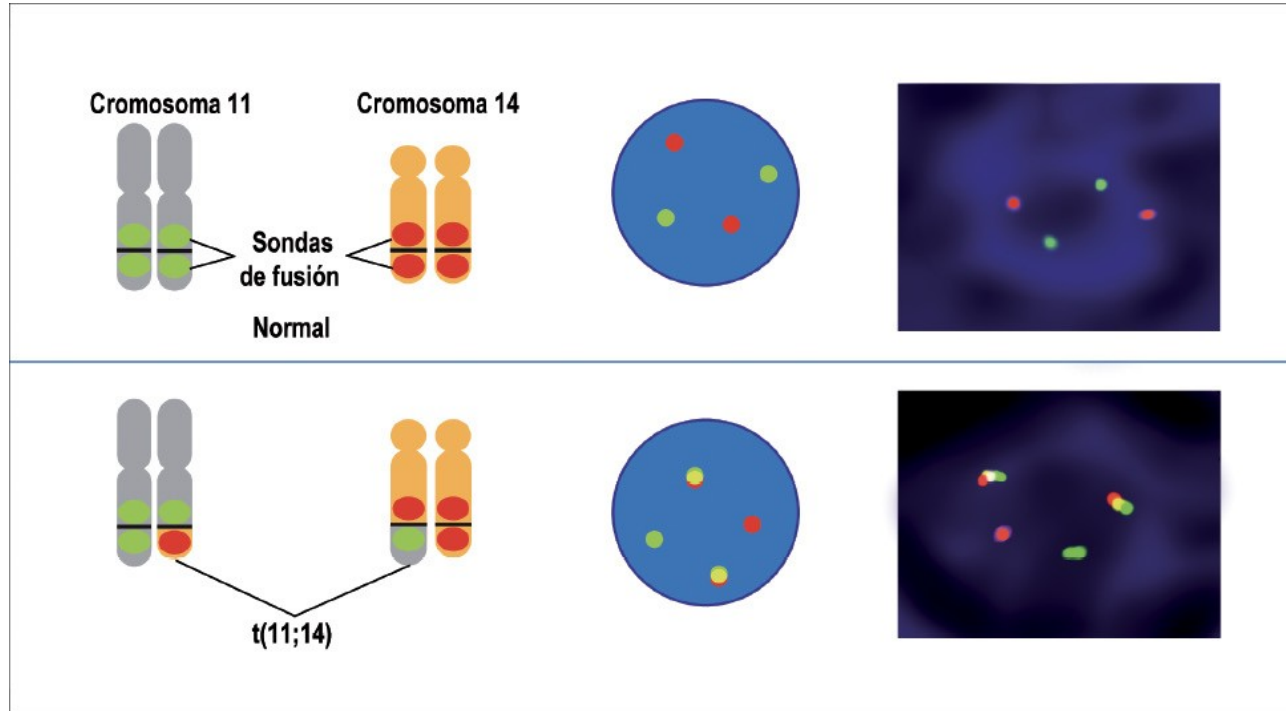
FISH interfásica: sondas de separación



- **No** existe **translocación**, la fluorescencia de la sondas se superpone y se observa dos puntos amarillos o dos pares de puntos rojos y verdes superpuestos, con una zona amarilla central → las sondas hibridan muy cerca
- **Si** existe **translocación**, se observan **tres puntos fluorescentes**:
 - Uno amarillo, correspondiente al cromosoma intacto
 - Uno rojo y otro verde separados, correspondientes a las dos partes del cromosoma translocado

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH interfásica: sondas de fusión



En células normales observamos cuatro puntos fluorescentes:

- Dos verdes
- Dos rojos

Cada par de sondas, al hibridar en reg. adyacentes, se ven como un único punto

Si existe traslocación, se observa:

- Un **punto verde**, correspondiente al cromosoma 11 no translocado
- Un **punto rojo**, correspondiente al cromosoma 14 no translocado
- **Dos puntos amarillos**, correspondientes a los dos cromosomas derivados de la translocación, fusión de parte del cromosoma 11 y parte del cromosoma 14

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH metafásica

Consiste en la detección de secuencias de ADN directamente en los cromosomas sobre extensiones citogenéticas de metafases

Se utilizan :

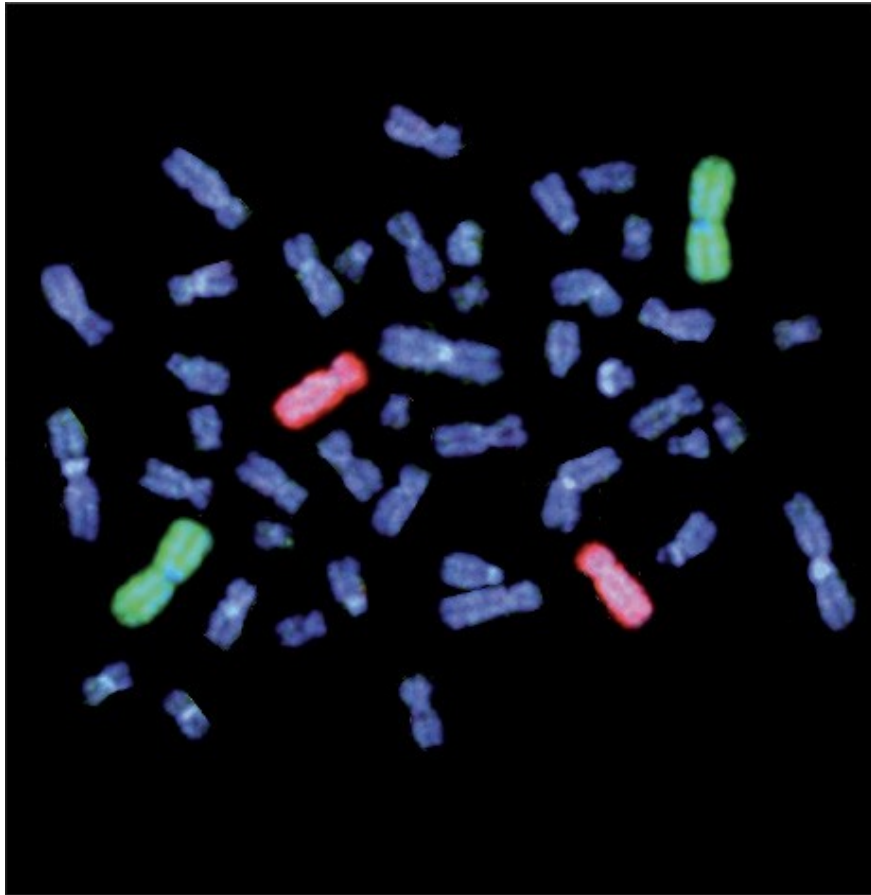
- Sondas centroméricas para detectar anomalías numéricas
- Sondas específicas de locus para detectar anomalías estructurales
- La utilización conjunta de ambos tipos de sondas permite identificar el cromosoma en el que se localiza el locus de interés, información especialmente útil en casos de traslocación
- También se utilizan, en ciertos estudios, sondas teloméricas

Tipos:

- FISH para pintado de cromosomas enteros
- FISH multicolor
- Cariotipo espectral
- Hibridación genómica comparada convencional (CGH)

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH metafásica: FISH para pintado de cromosomas enteros



- Se utilizan **sondas marcadas** con el mismo fluoróforo que **hibridan con un cromosoma entero**, pintándolo de un color uniforme
- Se utiliza **para detectar**:
 - Anomalías numéricas
 - Traslocaciones
- **No es válida para el estudio de deleciones, duplicaciones e inversiones**,
 - Esto se debe a que aunque haya pérdida, ganancia o reordenamiento de material genético, al ser alteraciones estructurales intracromosómicas y pintarse todo el cromosoma del mismo color, no pueden ser visualizadas diferencialmente

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH metafásica: **Multicolor(M-FISH o SKY)**

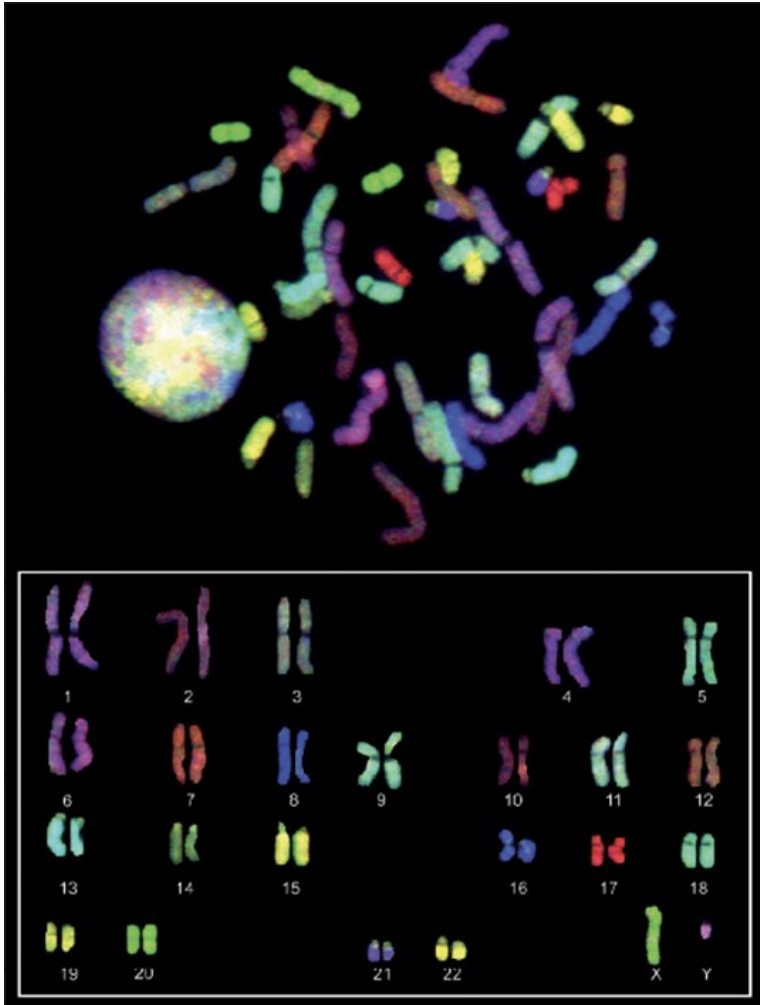


- Permite la identificación diferencial de regiones subcromosómicas
- Se basa en la utilización de cócteles de sondas fluorescentes, que hibridan en distintas regiones de un mismo cromosoma, con solapamiento parcial
- Son las denominadas sondas para pintado de bandas específicas o sondas BSP

- Los solapamientos de las sondas producen combinaciones de colores
- La interpretación de los resultados se realiza con un sistema de análisis de imagen que analiza el espectro de emisión a lo largo del cromosoma y asigna un color convencional de una paleta de colores a las diferentes combinaciones de fluorescencias
- El resultado final es un bandeo multicolor característico de cada cromosoma

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH metafásica: Espectral



- Su fundamento es la suma de los dos anteriores
- Se basa en la **utilización de sondas WCP y la combinación de fluoróforos**
- Se hibridan simultáneamente todos los cromosomas con un cóctel de sondas WCP, una por cada par de cromosomas
- Cada sonda va marcada con una combinación distinta de fluoróforos, de manera que combinando cinco fluoróforos diferentes (que emiten en las regiones del espectro magenta, rojo, naranja, amarillo y verde) conseguimos hasta 31 combinaciones diferentes, cada una con un espectro de emisión característico
- La lectura microscópica del cariotipo requiere un sistema de análisis espectral de cada cromosoma, que asigna a cada combinación de fluoróforos un color convencional de una paleta de colores
- Esta técnica es muy útil para el estudio de cariotipos complejos con múltiples alteraciones numéricas y estructurales.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

FISH metafásica: Hibridación genómica comparada convencional (CGH)

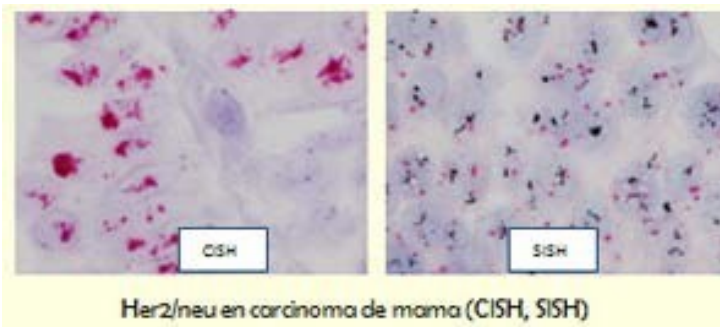
- El fundamento de la hibridación genómica comparada convencional (CGH) es el mismo que el de la aCGH, pero en este caso la hibridación se realiza sobre cromosomas en metafase y el resultado se visualiza con un microscopio de fluorescencia.
- Con esta técnica se detectan deleciones o duplicaciones de varias megabases.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH CROMOGÉNICA (CISH)

La hibridación in situ cromogénica (CISH) se caracteriza porque el híbrido se detecta mediante una reacción inmunohistoquímica que produce un producto coloreado visible con un microscopio óptico 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 la técnica FISH sobre este tipo de muestras es muy problemática.
- Es una **técnica muy utilizada en los laboratorios de anatomía patológica**. Sus aplicaciones se orientan más a la detección de secuencias que permitan precisar el diagnóstico anatomopatológico o aporten información pronóstica, que a la detección de alteraciones cromosómicas.



TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH CROMOGENICA (CISH)

DESPARAFINADO Y REHIDRATACIÓN

- El primer paso de cualquier técnica que se quiera realizar sobre tejidos incluidos en parafina es *eliminar la parafina y volver a rehidratar el tejido*.
- Esto se consigue mediante inmersión sucesiva de los portaobjetos con las secciones de tejido en cubetas con disolventes orgánicos, como el xilol, para eliminar la parafina y alcoholes de degradación decreciente (100%, 96%, 70%) hasta agua destilada o tampón para rehidratar el tejido.

DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

- Durante la fijación, el formol produce enlaces entrecruzantes entre las proteínas y otras macromoléculas.
- El tratamiento enzimático *libera a los ácidos nucleicos de su unión a histonas y otras proteínas y permeabiliza el tejido para que las sondas puedan acceder libremente a su secuencia diana*.
- Las dos enzimas más utilizadas son la proteínasa K y la pepsina.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH CROMOGENICA (CISH)

PREHIBRIDACIÓN

- La finalidad de la prehibridación es la misma que en las demás técnicas de hibridación: *el bloqueo de posibles uniones inespecíficas de la sonda, en este caso al tejido.*
- Se realiza inundando el tejido en solución de prehibridación que contiene ADN de esperma de salmón fragmentado.

HIBRIDACIÓN

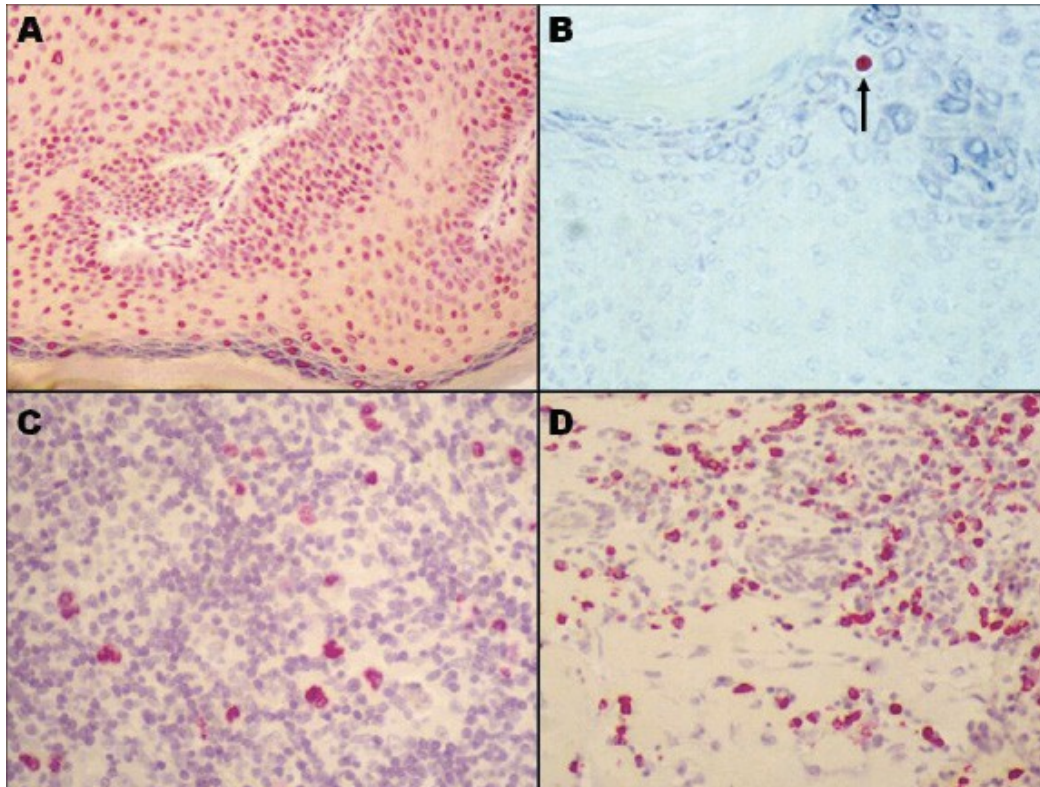
- Se deposita sobre el tejido una pequeña cantidad de sonda (5ul), se coloca un cubreobjetos encima, evitando la formación de burbujas y se coloca el portaobjetos sobre una placa calefactora a 95°C durante 5-10 minutos.
- La detección de secuencias de ARN con sondas de ARN no requiere este paso de desnaturalización.
- A continuación, el portaobjetos se coloca en una cámara húmeda para evitar la desecación de la sonda y se incuba a la temperatura y el tiempo recomendados por el fabricante.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

ISH CROMOGENICA (CISH)

LAVADO DE POSHIBRIDACIÓN	Tras la incubación de hibridación, los portaobjetos se lavan por inmersión en soluciones de poshibridación colocadas en cubetas Coplin.
DETECCIÓN DE LA HÍBRIDO	Las sondas utilizadas se marcan con <i><u>haptenos</u></i> y se detectan por métodos inmunohistoquímicos indirectos, con lo que se obtiene al final un producto coloreado que se deposita en el tejido alrededor del híbrido.
CONTRATINCIÓN	Tras el revelado del marcaje, en el tejido aparecen manchas coloreadas en las regiones en que se encuentra la secuencia diana. Sin embargo, el resto del tejido no es visible al microscopio, por lo que no se puede interpretar el resultado. Por eso es necesario <u>contrateñir el tejido con tinción suave</u>, que no enmascare el resultado de la ISH, pero <u>permita analizar el resultado en el contexto de detalles morfológicos</u>.
VISUALIZACIÓN	Las preparaciones se visualizan con un microscopio óptico de luz transmitida.

Resultados obtenidos con la técnica CISH



A) Biopsia de cérvix uterino sometida a CISH para detección de virus del papiloma humano tipo 6: los núcleos de las células infectadas se tiñen de rojo (se empleó AEC como cromógeno).

B) Otra biopsia de cérvix uterino sometida a CISH para VPH: en este caso solo una célula (flecha) mostró infección por el virus.

C) CISH para virus Epstein-Barr en una biopsia de ganglio con un linfoma.

D) CISH para cadenas κ en un estudio de clonalidad de un infiltrado linfocitario.

CONTROLES DE LA CISH

En la CISH es muy importante la realización simultánea de controles positivos y negativos para poder interpretar adecuadamente los resultados.

- **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

- **Control positivo de la muestra** → Sirve para comprobar que el tejido fue tratado adecuadamente y que la fijación fue efectuada bien, de manera que el tejido conserva los ácidos nucleicos aptos para hibridación.

Se realiza con sondas específicas de secuencias repetidas ALU para ADN y sondas poli-T para ARN

- **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.

Se realiza exactamente igual que la reacción problema, eliminando la sonda de la solución de hibridación.

- **Control negativo de la muestra** → Sirve para comprobar que el resultado observado es específico y no obedece a uniones inespecíficas de la sonda a diversas estructuras del tejido.

Se realiza sustituyendo la sonda específica por secuencias no complementarias con los ácidos nucleicos de la muestra