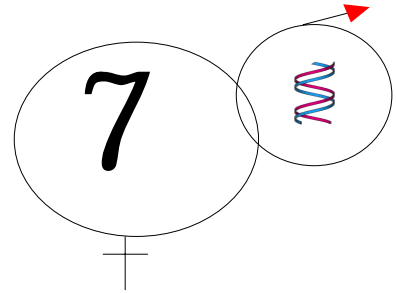


CITOGÉNÉTICA MOLECULAR

Jorge Quintana Aguilar



El año 1977 marca el inicio de la era de la citogenética molecular. Los avances en este campo de la citogenética son impresionantes.

Con este tipo de estudio se puede lograr identificar defectos submicroscópicos del ADN y disminuir la brecha que existe entre la detección de una simple inserción o deleción de un nucleótido, la inserción o deleción de varios de ellos y la observación de estos defectos a nivel de la citogenética convencional.

La importancia extrema de estos avances técnicos motivó la realización de este capítulo en el que se exponen las características y fundamentos que combinan instrumentos moleculares a partir del ADN recombinante y la citogenética.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN *in situ*

La tecnología de "hibridación in situ" (HIS) combina las técnicas de citogenéticas convencionales con técnicas moleculares y está basada en la detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos, bien sea en cromosomas aislados o células interfásicas. Fue descrita originalmente por Pardue y Gall, John y cols., en 1969 utilizando isótopos radiactivos para marcar las sondas, las cuales, combinadas con técnicas de autoradiografía posibilitaron la detección de las secuencias hibridadas.

En 1977, Rudkin y Stollar describieron un método inmunocitoquímico basado en la utilización de anticuerpos anti ADN ó anti ARN marcados con sustancias fluorescentes detectables microscópicamente. Este procedimiento se conoce como técnica de "hibridación in situ fluorescente" (FISH) o "hibridación no isotópica".

Actualmente existen dos métodos de FISH, llamados directos e indirectos.

Los métodos directos permiten realizar la visualización microscópica de la señal inmediatamente después de realizada la HIS. El marcaje directo emplea nucleótidos marcados con sustancias fluorescentes.

Los métodos indirectos se basan en la utilización de sondas unidas a moléculas tales como la biotina o digoxigenina marcadas con una sustancia fluorescente que permite su

visualización al microscopio con luz ultravioleta. Estos métodos se pueden combinar con técnicas inmunocitoquímicas basadas en reacciones antígeno - anticuerpo para aumentar la intensidad de las señales fluorescentes.

La Biotina 11 - dUTP y la digoxigenina 11 - dUTP son dos ejemplos de bases análogas que pueden ser incorporadas al ADN en lugar de dTTP.

La biotina (vitamina H) tiene la ventaja de poseer una gran afinidad por las proteínas avidina y estreptoavidina, dando lugar a uniones casi irreversibles.

La digoxigenina es un derivado de la digitoxina procedente de la *Digitalis purpúrea* y *D. lanata* que resulta altamente eficiente en reacciones antígeno anticuerpo en células.

Existe una amplia variedad de sondas disponibles comercialmente. Otra alternativa para la obtención de sondas se basa en la amplificación del ADN en vectores y su marca posterior por medio de la técnica conocida como "nick translation".

Mediante la FISH pueden detectarse diferentes tipos de secuencias en el genoma humano, de acuerdo con las sondas utilizadas. Algunas de ellas se citan a continuación.

- . Sondas de secuencias únicas o copia simple: se utilizan para la detección de secuencias específicas en regiones subteloméricas y otros sitios útiles para la identificación de alteraciones submicroscópicas, como por ejemplo, 15q11-q13.
- . Sondas centroméricas: se basa en la utilización de sondas a satélites que permiten la detección de secuencias altamente repetitivas localizadas en regiones pericentroméricas. Una desventaja de estas sondas es la hibridación cruzada entre regiones homólogas de diferentes cromosomas, por ejemplo entre los cromosomas 13/21 y 14/22.
- . Sondas de secuencias para regiones específicas: se basa en la detección de secuencias altamente repetitivas localizadas en determinadas regiones de los cromosomas, como por ejemplo, la región Yq12.
- . Sondas para el pintado de cromosomas completos (WCP): detectan secuencias de eucromatina en determinados brazos o cromosomas completos.

MÉTODOS DE HIBRIDACIÓN *in situ*

La metodología general utilizada para la FISH sobre ADN descrita por Pinkel y cols., en 1986, se basa en los principios siguientes.

- . Preparación de láminas y extensiones.
- . Pretratamiento del material extendido.

- . Desnaturalización del ADN.
- . Hibridación.
- . Lavados post hibridación.
- . Marca de la sonda.
- . Observación al microscopio.

A continuación se describen los aspectos básicos esenciales de los protocolos de laboratorio, en relación con la hibridación in situ ADN - ADN. Para ello se requiere de preparaciones de células, cromosomas, o ambos, de óptima calidad.

Preparación de láminas y extensiones: se recomienda la limpieza de láminas portaobjetos con alcohol éter (1:1) y realizar fijación de las extensiones.

Pretratamiento del material extendido: Se utiliza la ARNasa para eliminar el ARN endógeno. El HCl permite la extracción de proteínas e hidrólisis parcial del ADN - blanco. Las proteasas provocan la digestión de la cubierta proteínica del ADN - blanco mejorando la accesibilidad de la sonda.

Desnaturalización del ADN: en caso de que se utilicen sondas de doble hélice es necesario realizar la desnaturalización del ADN - sonda y el ADN - blanco. La desnaturalización se realiza mediante pH extremadamente alcalino o por calor.

Hibridación: múltiples factores influyen sobre la hibridación. La velocidad de hibridación aumenta proporcionalmente con la concentración del ADN. Además, la cantidad de híbridos obtenidos será mayor cuanto más largo sea el tiempo de hibridación. Por otra parte, el dextrán sulfato es importante también porque al hidratarse facilita obtener una mayor concentración relativa de la sonda.

Lavados post hibridación: los lavados astringentes permiten eliminar el llamado "ruido de fondo" (HIS no específica) mediante la utilización de soluciones salinas poco concentradas a altas temperaturas.

Marca: se pueden realizar diferentes tipos de marcas mediante sistemas que utilizan principalmente la biotina ó digoxigenina. Las sondas de ADN marcadas con biotina pueden detectarse por la vía de la avidina la cual es una glicoproteína unida a la fluoresceína-isotiocianato (FITC) que es la sustancia fluorescente. La avidina tiene 4 sitios de unión con la biotina, lo cual resulta en un complejo muy estable. Para aumentar la señal fluorescente se puede realizar la amplificación con un anticuerpo anti-avidina (obtenido de cabras) el que posteriormente se pone en contacto nuevamente con avidina marcada con FITC.

Observación al microscopio: la observación al microscopio requiere de una fuente de luz ultravioleta y de un sistema de filtros adecuados de acuerdo con las longitudes de onda de las señales fluorescentes. Además, se utilizan programas automatizados, los cuales permiten realizar el análisis utilizando diferentes colores simultáneamente (FISH multicolor), así como también mediante análisis de la intensidad de las señales fluorescentes (Figuras 7.1 y 7.2).

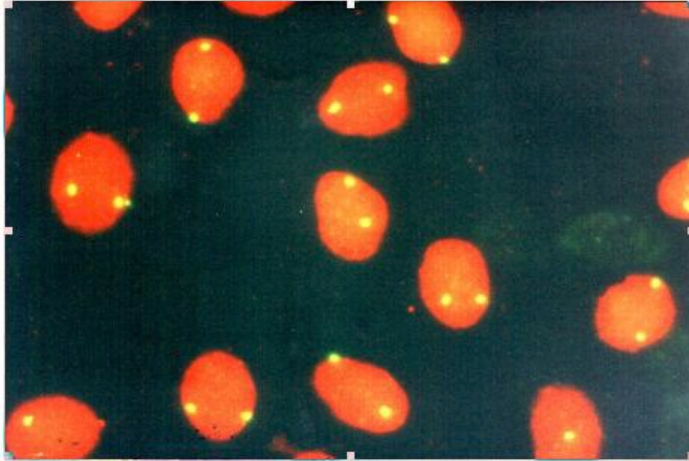


Figura 7.1. FISH sobre células en interfase utilizando sonda centromérica para cromosomas X (Oncor). Obsérvese el marcaje de 2 cromosomas X.

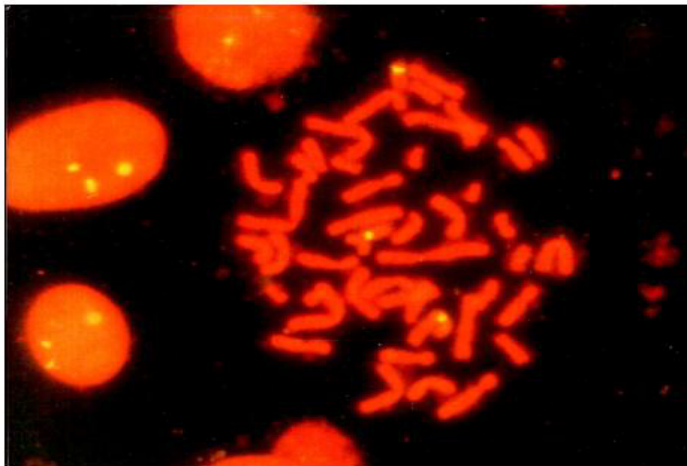


Figura 7.2. FISH sobre células en interfase y cromosomas utilizando sonda centromérica para cromosomas 18 (Oncor) en un caso de trisomía 18.

Otros procedimientos, tales como el cariotipo espectral (SKY), la microdissección y pintado reverso de cromosomas, la hibridación genómica comparativa (CGH) se desarrollan actualmente principalmente en el campo de las investigaciones

Las técnicas de citogenética molecular se han aplicado a los estudios de cartografía genética y de expresión génica.

RESUMEN

Más que sintetizar los aspectos tratados mencionar la utilidad de la tecnología de citogenética molecular en el diagnóstico de las enfermedades genéticas:

- Análisis de células interfásicas. Permite realizar marcas fluorescentes en células interfásicas sin necesidad de realizar cultivos para la obtención de cromosomas lo cual posibilita realizar diagnósticos prenatales rápidos de las aneuploidías más comunes.
- Diagnóstico de alteraciones submicroscópicas tales como los síndromes de microdeleciones o por defectos de genes contiguos.
- Análisis de marcadores cromosómicos de origen desconocido. Los estudios moleculares resultan particularmente útiles para precisar el origen y composición del material genético en estos casos.
- Reordenamientos complejos en casos de células tumorales y hemopatías malignas. Cuando se presentan translocaciones complejas que involucran a más de dos cromosomas pueden detectarse con precisión los sitios de roturas e intercambios del material genético.