

# Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

## Aguilar Villalba, Rubén & Montoro Gámez, Carolina

La FISH es una técnica que combina la biología molecular y las técnicas histoquímicas para detectar secuencias específicas de nucleótidos pudiendo marcar porciones cromosómicas o hasta cromosomas enteros en células metafásicas (células en división) o núcleos celulares fijados. Esta detección se realiza con el empleo de sondas de DNA fluorescentes (marcadas con fluorocromos), que pueden ser de diferentes tipos en función de las estructuras que son capaces de detectar: sondas específicas de gen o locus, sondas centroméricas, sondas subteloméricas y sondas de pintado cromosómico. Dentro de sus numerosas aplicaciones, esta técnica es útil en la detección de alteraciones numéricas y estructurales cromosómicas (ploidías y reordenamientos genómicos), para mapear de cromosomas metafásicos e incluso para detectar bacterias y otros microorganismos. Además, es de gran utilidad ya que permite la monitorización de enfermedades (seguimiento de una terapia antitumoral, cuantificación de células genéticamente alteradas...) y la localización precisa de los puntos de rotura cromosómicos en tumores, en la búsqueda de nuevos genes implicados en el cáncer, y detectar y localizar genes de interés ya conocidos. La FISH presenta numerosas ventajas frente a otras técnicas citogenéticas convencionales (cariotipo de bandas G) sobre todo a la hora del diagnóstico clínico para la detección de tumores y aberraciones cromosómicas, presentando una alta sensibilidad y especificidad, además de ser una técnica relativamente rápida (24 horas).

### Introducción

En 1984, Pinkel & Gray desarrollaron la Hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridation*). Esta técnica deriva de la hibridación *in situ* convencional y su objetivo es el de detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante sondas fluorescentes sobre células tanto en metafase como en interfase. El apareamiento se da por la complementariedad de bases a través de puentes de hidrógeno que se forman entre los nucleótidos.

### Método

Las principales aplicaciones de la FISH son tres:

- Visualización de la ploidía.
- Mapeo de cromosomas.
- Cambios en la localización de nucleóticos; translocaciones, inversiones y microdeleciones.

Las sondas apropiadas para el método, tanto en forma de cromosoma (A) como en forma de cromatina (B), dependen especialmente de las secuencias diana (tabla I). Es necesario localizar al menos una o dos secuencias, a lo sumo tres, para diferentes sondas. Dependiendo del marcaje, podemos distinguir entre:

- **Marcaje indirecto:** ligación de biotina-avidina o digoxigenina al oligonucleótido para luego ser reconocidos por anticuerpos conjugados con fluorocromos.
- **Marcaje directo:** ligación de los fluorocromos a la sonda de oligonucleótidos. En comparación con las sondas indirectas, no siempre muestran una señal lo suficientemente intensa.

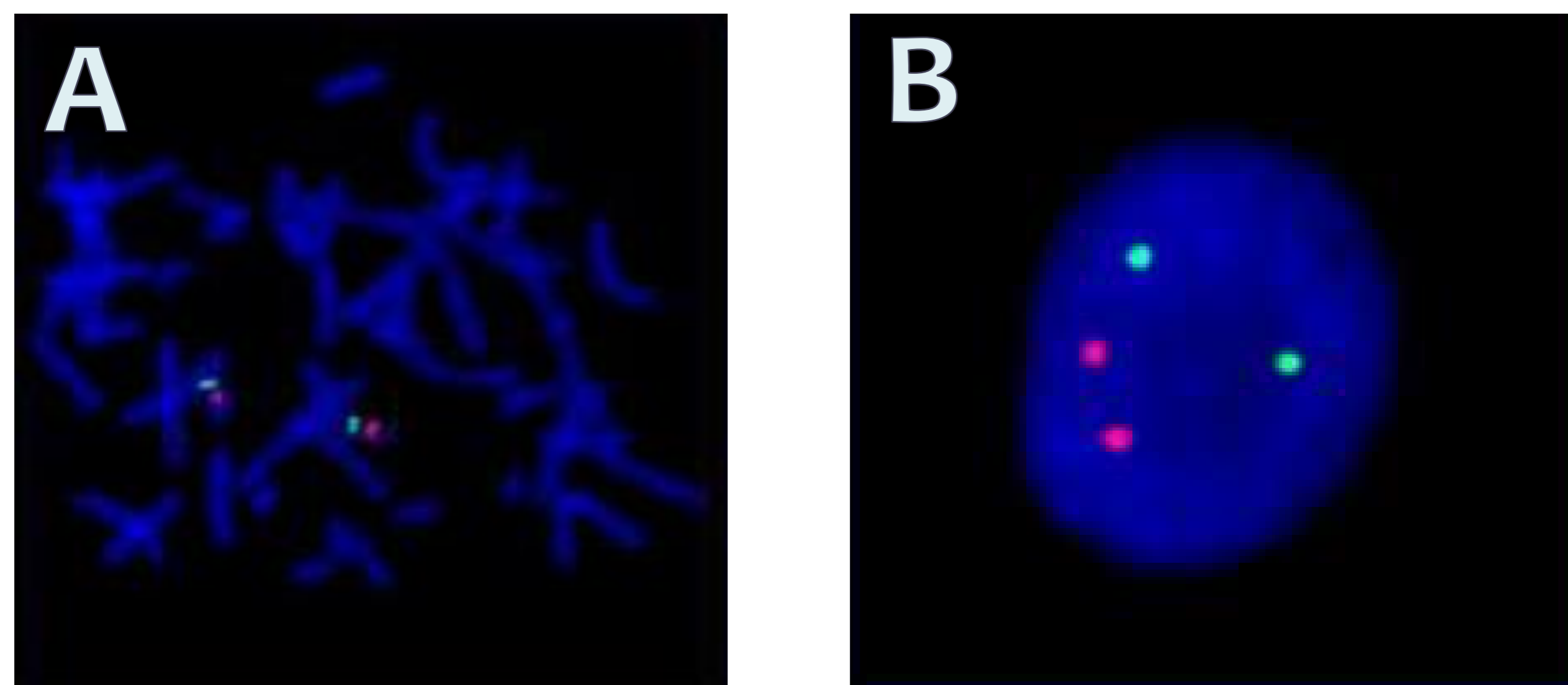


Figura 1. Imágenes a microscopia de fluorescencia. En A se observan cromosomas en metafase y en B una célula en interfase.

Tabla I. Tipos de sonda de acuerdo con la diana.

Tipo de sonda	Tamaño	Estructura	Vector
<i>Large single-locus probes</i>	1 Mb	Al menos una copia de secuencias repetidas	Fago PI, BACs, YACs y cósmidos
<i>Small unique-sequence probes</i>	1 Kb o varias	Copia de locus específicos o únicos	Plásmidos
<i>Chromosome-or region specific «paints»</i>	Pequeño	Colección de fragmentos genómicos	-
<i>Chromosome-or region specific paints repetitive-sequence probes</i>	Muy pequeño	Secuencias en tándem una tras otra	Plásmidos
<i>Genomic DNA probes</i>	Depende	Colección de secuencias repetidas y específicas	-

### Conclusiones

- La FISH es una técnica útil a la hora de visualizar células en división aunque también se puede aplicar a células tanto parafinadas como congeladas.
- Técnica rápida, con gran especificidad y sensibilidad, incluso en células pequeñas.
- Se pueden analizar un gran número de células.
- Es muy útil a la hora de diagnosticar enfermedades basadas en aneuploidías y poliploidías.
- No obstante, su precisión se puede ver alterada por una variedad de factores como la calidad de la sonda y de la fijación, los reactivos de detección y la temperatura de desnaturalización.

### Bibliografía

- R.M, Raúl. Empleo de la técnica hibridación *in situ* fluorescente para visualizar microorganismos. Salud UIS 2011; 43 (3): 307-316.
- Genome Analysis, A laboratory manual Volume 4: Mapping Genomes