

34.1. Inmunofluorescencia directa e indirecta.

En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos de fluoresceína que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible, que depende de la naturaleza del compuesto.

El isotiocianato de fluoresceína emite luz verde amarillenta intensa.

Estas técnicas necesitan muestras en fresco y congeladas, sin fijación convencional, pues los antígenos están presentes en superficies celulares o son muy lábiles a la fijación en formalina.

La inmunofluorescencia directa, es decir con anticuerpos conjugados con fluoresceína, se aplica corrientemente en el diagnóstico de las enfermedades cutáneas en donde tiene indicación y utilidad muy precisas como en enfermedades ampollares, vasculitis y mesenquimopatías.

Esta técnica pese a ser muy sensible, presenta inconvenientes como la falta de permanencia de la fluorescencia, requiere de microscopía especializada y el detalle morfológico es pobre.

Para documentar cada caso, es necesario fotografiar la reacción.

34.1.1. Recogida y preparación del tejido.

El tejido utilizado suele ser congelado, porque con la fijación en formol y la inclusión en parafina se producen fenómenos de auto fluorescencia y bloqueo de determinantes antigénicos por los agentes fijadores.

En la inmunofluorescencia directa se detecta un antígeno mediante un anticuerpo marcado con flourocromo.

En la inmunofluorescencia indirecta se emplea primero un anticuerpo sin marcar, y en un segundo tiempo, un anticuerpo marcado que reacciona con el anticuerpo primitivo.

34.1.2. Técnicas directa e indirecta.

34.1.3. Técnica directa.

Método:

- Cortes de 5 micras aproximadamente.
- Delimitar la superficie de incubación con los anticuerpos.
- Fijar en acetona a -20oC, de 5 a 15 minutos.
- Secar.
- 3 lavados en PBS de 10´ cada uno.
- Drenar el exceso de PBS y secar alrededor del círculo con papel.
- Cubrir con antisuero primario conjugado a la dilución adecuada.
- Otros 3 lavados y secar en torno al círculo.

- Montar en medio hidrosoluble específico para inmunofluorescencia o en PBS-glicerol gelatina. Sellar bordes del cubre con esmalte o polivinilalcohol.
- Guardar a oscuras a 4oC hasta su observación en el microscopio de fluorescencia.

Resultados:

- Marcaje con FITC FLUORESCENCIA VERDE MANZANA.
 - Marcaje con TRITC FLUORESCENCIA ROJO ANARANJADA.
- Aplicaciones de la técnica directa:
- Patología renal (Ej. glomerulonefritis).
 - Algunas lesiones cutáneas.

34.1.4. Técnica indirecta.

Método:

- Diluir en PBS el suero que se quiere probar (suele usarse diluciones de 1/10).
- Incubar las secciones de tejido seleccionadas, con el suero problema, 30´ a temperatura ambiente o toda la noche a 4oC.
- 3 lavados en PBS de 10 minutos. - Drenar exceso de PBS. - Incubar con un conjugado de inmunoglobulina anti Ig humana y fluorocromo a dilución adecuada, 30´, en cámara húmeda.
- Decantar el antisuero y lavar 3 veces con PBS de 10´ cada uno.
- Montar en medio hidrosoluble para Inmunofluorescencia.

Resultados:

- Marcaje con FITC FLUORESCENCIA VERDE MANZANA.
- Marcaje con TRITC FLUORESCENCIA ROJO ANARANJADA.

Observaciones:

Los resultados se expresan a la titulación más alta a la que la técnica de inmunofluorescencia resulta positiva.

34.2. Hibridación in situ.

34.2.1. Introducción.

La hibridación in situ (ISH) es una técnica que se utiliza para la localización y la detección de secuencias de ADN y de ARN específicas en las células, cromosomas o tejidos preservados, mediante la formación de una molécula híbrida entre una molécula endógena de ARN o ADN de la célula y una sonda complementaria de ARN o de ADN monocatenario.

La técnica de hibridación in situ se basa en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse (unirse) entre sí, es decir, la existencia de determinada secuencia de ADN o ARN, que resulta complementaria con otra secuencia. Su utilidad reside en la capacidad de poder demostrar mediante la utilización de una sonda (formada por una secuencia de ADN previamente conocida) marcada (con un elemento radioactivo, con un elemento fluorescente o con un elemento cromógeno) la presencia de determinada secuencia de ADN o ARN complementaria, en la muestra a estudiar.

Cuando una de las dos hebras está marcada, los híbridos reconocidos pueden ser detectados por varios métodos, que pueden ser fluorescente y no fluorescente.

La detección in situ permite visualizar de forma directa la ubicación espacial de secuencias específicas, lo cual es esencial para dilucidar la organización y función génica, debido a esto esta técnica es de gran importancia en diversos campos, entre los cuales se encuentra el diagnóstico de reordenamientos cromosomales (de gran importancia en el diagnóstico del cáncer) y la detección de infecciones virales (por la detección de las secuencias de ADN/ARN del virus dentro de las células).

Por lo tanto, el objetivo de la hibridación in situ es determinar la presencia o ausencia de secuencias de DNA o RNA de interés, así como localizar estas secuencias en células específicas o sitios cromosómicos.⁶ Condiciones óptimas para la hibridación de extractos purificados de DNA o RNA en soportes sólidos han sido arduamente estudiadas. Con el uso de muestras tisulares y celulares; sin embargo, nuevos problemas tales como la unión no específica de las sondas han sido encontrados. La sensibilidad de la hibridación in situ depende de las siguientes variables: la preparación de la muestra (tejido o célula), construcción de la sonda, etiquetado de la sonda y la sensibilidad del método usado para la detección.

33.1.1. Recogida y preparación del tejido.

Un pre-tratamiento puede ser llevado a cabo antes de hibridación para aumentar la eficiencia y reducir la tinción no específica. El tratamiento con proteasas (proteínasa K la más común) facilita el acceso hacia la secuencia objetivo. La acetilación con 0,25% de anhídrido acético o 0.1 M trietanolamina reduce la unión de las sondas en el tejido. La optimización de la preparación de la muestra, incluido la fijación y el almacenamiento, es importante para la detección intracelular de ácidos nucleicos.⁸ La fijación necesita preservar el DNA o RNA y la morfología del tejido. En contraste, los procesos de síntesis y degradación enzimática de DNA o RNA deben mantenerse estables, por lo tanto, el promedio de vida del mRNA es un factor importante. En este contexto, el tejido a ser fijado debe congelarse tan pronto sea posible tras su

escisión, el tiempo entre la escisión y fijación se toma en cuenta al momento de interpretar los resultados. Se utiliza para-formaldehído para la fijación, en algunos casos seguido por la adición de glutaraldehído. La fijación de ciertos tejidos se ve favorecida por mezclas de ácido acético-alcohol o el fijador de Bouin.

34.2.2. Técnicas.

Construcción de la sonda: Diferentes tipos de sondas tales como cDNA, cRNA y oligonucleótidos sintéticos se utilizan para la hibridación in situ. La elección de la sonda dependerá de la sensibilidad y especificidad, facilidad de producción, facilidad de la sonda para penetrar el tejido, aplicación y la reproducibilidad del método. El tamaño óptimo de la sonda es 50-300 nucleótidos.

Etiquetado de la sonda: El etiquetado de la sonda puede realizarse mediante la incorporación de:

1. Radioisótopos (^3H , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I).
2. Marcadores no radioactivos fluorescentes.
3. Marcadores no radiactivos cromógenos.

Los marcadores radioactivos se considera el método más sensible. Los sitios de hibridación pueden visualizarse mediante radiografía con rayos-X o emulsiones líquidas entre las que destacan las denominadas Northern blot o Southern blot. Estos métodos están en desuso por lo complicado que resulta el manejo de sustancias radioactivas.

Los marcadores no radioactivos fluorescentes constituyen la técnica denominada Hibridación In Situ Fluorescente (FISH).

Los marcadores no radioactivos cromógenos constituyen las técnicas denominadas Hibridación In Situ Cromógena (CISH) o Hibridación In Situ con Plata – en inglés se dice Silver- (SISH).

34.3. Tipos de Hibridación in situ.

34.3.1. Hibridación in situ fluorescente (FISH).

Es una técnica que detecta secuencias de ácidos nucleicos en células o tejidos preservados mediante el empleo de una sonda marcada con un fluorocromo, la cual va dirigida hacia un lugar específico del cromosoma y que emite fluorescencia que puede ser observada por medio de un microscopio. Se caracteriza por permitir la visualización directa de las alteraciones genéticas en la célula. El principio básico de FISH es hibridar una sonda de oligonucleótidos marcada con fluorescencia a una secuencia de interés dentro de un microorganismo y visualizar o contar la señal fluorescente resultante por microscopía u otro método.

El procedimiento básico FISH incluye:

1. fijación y permeabilización;
2. hibridación;
3. lavado; y
4. la microscopía (para el recuento y visualización) o citometría de flujo (para el recuento de alta velocidad).

En ciertos tipos de muestras el procedimiento FISH puede ir precedido de un aislamiento de células o método de concentración. Con independencia del enfoque aplicado FISH específica, sólo las células que contienen el ADN diana son reconocidas por la sonda, y estarán etiquetados con fluorescencia cuando se visualizan con las técnicas adecuadas.

La fijación y permeabilización. Este paso permite preservar la integridad y la forma de todas las células, además el mismo facilita la penetración de las sondas FISH fluorescente en la célula y protege el gen diana de la degradación durante el almacenamiento y el análisis. El proceso consiste en cubrir la muestra con un agente de fijación; normalmente se usa como agente de fijación el formaldehído y etanol. El agente de fijación tiene la función de permeabilizar las células para permitir la entrada de oligonucleótidos marcados a las células y la posterior difusión de las sondas a sus dianas intracelulares. Luego de la fijación se elimina el fijador residual y se transfiere la muestra a un portaobjetos de microscopio.

La hibridación. Durante la hibridación una sonda marcada con fluorescencia se une a la secuencia de interés. Sólo organismos que contienen los genes diana incorporan el marcador fluorescente, de modo que se pueden visualizar usando un microscopio u otra técnica. Otros tipos de técnicas de marcaje de células que se utilizan con menos frecuencia que las sondas de oligonucleótidos incluyen combinaciones de moléculas indicadoras (digoxigenina), anticuerpos fluorescentes y la amplificación de la señal enzimática (tryamide), o sondas de polirribonucleótidos.

Lavado. Durante la etapa de lavado los portaobjetos de microscopio que contienen las células fijadas e hibridadas se enjuagan brevemente para eliminar la sonda no unida que pudiera interferir con la cuantificación de los microorganismos diana. Los portaobjetos se secan a continuación, y se cubren con un agente de antidecoloramiento.

La visualización o conteo. Células híbridadas se visualizan por microscopía de epifluorescencia o por citometría de flujo. Microscopia de fluorescencia utiliza una luz de alta intensidad para iluminar una muestra, que excita las especies fluorescentes, generando una imagen de las moléculas fluorescentes unidas a

las sondas de oligonucleótidos. En esta técnica las células son enumeradas por el técnico de laboratorio o por un conteo programas automatizados. Sin embargo, un conteo más eficiente de células marcadas se consigue con citometría de flujo, en la cual se diluyen las células marcadas de manera que las células individuales pasan a través de un rayo láser, que detecta y cuenta células marcadas con fluorescencia.

34.3.2. Hibridación *in situ* con cromógenos (CISH).

34.3.3. Generalidades.

En este tipo de hibridación se utilizan reacciones de peroxidasa o fosfatasa alcalina usando microscopía de campo brillante en tejidos fijados por formalina y embebidos en parafina. En esta técnica los anticuerpos se conjugan con una enzima que cataliza reacciones de sustratos cromogénicos. Los cromógenos resultantes precipitan en el lugar de destino de la sonda y se pueden detectar con un microscopio de campo brillante estándar.

Esta técnica además de proporcionar una alternativa económica fácil de usar para FISH, presenta la ventaja de que permite la visualización del tejido, incluyendo el núcleo y forma de la célula, junto con la señal de la sonda en la misma imagen. A diferencia de la mayoría de los reactivos de detección fluorescentes, agentes cromogénicos utilizados en la mayoría de los métodos de CISH son químicamente estables y no se desvanecen con el tiempo, lo que permite un fácil almacenamiento y posibilita reexaminar las muestras. Entre las aplicaciones de CISH tenemos que la técnica permite examinar la delección de un gen, translocaciones cromosómicas, y el número cromosómico.

34.3.4. Comparación con FISH.

FISH es considerado como el estándar de oro para la detección de anomalías cromosómicas, ya que es muy sensible y tiene alta resolución. Otras técnicas que se desarrollan para detectar anomalías cromosómicas se comparan generalmente con la sensibilidad y especificidad de FISH para ver cómo se miden. Por ejemplo, en comparación con FISH, CISH ha demostrado tener una sensibilidad de 97,5% y una especificidad del 94% para la detección de la amplificación del gen HER-2 / neu (que es de gran importancia en el diagnóstico del cáncer de mama pues determina la posibilidad de utilización de un tratamiento específico). La tasa de concordancia entre FISH y CISH fue del 94,8%, mostrando que el CISH es una técnica comparable a FISH. La mayoría de las otras fuentes están de acuerdo y reportan un desempeño casi igual en los ensayos de amplificación génica para FISH y CISH. Sin embargo, a veces CISH muestra menor sensibilidad para las amplificaciones de bajo nivel.

CISH tiene algunas ventajas sobre FISH en los reactivos y equipos que utiliza:

1. es mucho más barato y es más fácil de usar, ya que utiliza microscopios de campo brillante en lugar de microscopios de fluorescencia.
2. Además, los reactivos CISH son más estables que los reactivos FISH por lo que es posible almacenar las muestras y examinar la misma muestra varias veces.
3. Los reactivos de FISH se desvanecen en horas, por lo que una muestra sólo puede ser examinada una vez.
4. Aparte del costoso microscopio de fluorescencia, FISH también requiere una cámara digital de alta resolución para capturar micrografías de la muestra antes de que se desvanezca la fluorescencia.
5. Otra ventaja de utilizar la microscopía de campo brillante es que el tejido o la muestra de células en su conjunto se puede visualizar a través de CISH, mientras que la morfología celular es difícil de evaluar mediante microscopía de fluorescencia en FISH.

CISH también difiere de FISH en las sondas que se utilizan, así como en el método general. Existen muchos tipos diferentes de sondas FISH disponibles, pero, por el contrario, existe una variedad limitada de sondas CISH comercialmente disponibles, incluyendo sondas que marcan centrómeros y sondas específicas de genes relacionados con el cáncer, como HER-2, EGFR, MYC, etc. A pesar de la limitada variedad de sondas CISH disponibles, son generalmente más rentables que las sondas FISH. Con respecto al método general, el FISH se puede realizar usando marcaje directo - se fijan fluorocromos a las sondas o marcaje indirecto - las sondas se marcan con biotina o digoxigenina, que se detectan a continuación usando estreptavidina marcada fluorescentemente o anticuerpos, respectivamente. CISH se realiza mediante el marcaje indirecto en el que los anticuerpos o estreptavidina se conjugan a enzimas como Peroxidasa (P) o Fosfatasa Alcalina (FA).

34.3.5. Comparación con IHQ.

CISH e IHQ son similares en que ambos se utilizan para el mismo propósito (principalmente para detectar HER-2 / neu amplificación) y ambos utilizan reacciones enzimáticas (P o FA) para medir la amplificación. CISH y IHQ son diferentes en que IHQ mide la expresión de proteínas, mientras que CISH mide la amplificación de ADN. Esta diferencia es particularmente útil para HER-2 / neu porque se ha encontrado que la amplificación génica es de mayor valor pronóstico que la expresión de la proteína.

Una desventaja de IHQ es que no es posible identificar falsos negativos y falsos resultados positivos. En CISH, si no hay señal para la sonda de referencia, el ensayo ha fallado.

Para la sobreexpresión de proteínas y la amplificación de genes, CISH e IHC muestran una concordancia de más del 86% y más del 89%, respectivamente. Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales son mejores que los anticuerpos policlonales para la detección en ambos IHQ y CISH como se unen más específicamente, lo que conduce a una mayor concordancia tasa.

34.3.6. Aplicaciones médicas.

CISH se aplica con frecuencia para evaluar la amplificación de genes, como el estado HER-2/neu en muestras de cáncer de mama. La amplificación de HER-2 / neu se asocia con mayor mortalidad, mayor tasa de recurrencia y mal pronóstico en el cáncer de mama. El anticuerpo monoclonal trastuzumab es un bloqueador de receptores que ha demostrado ser clínicamente muy eficaz en tumores que presentan sobre-expresión de HER-2/neu. Por lo tanto, es crucial determinar el estado de Her2- Neu antes de iniciar el tratamiento del cáncer.

CISH también se utiliza para la detección de reordenamientos cromosómicos y fusiones, tales como la fusión de ALK tyrosine quinasa dominio con el promotor y 5 'región de EML4 en el cáncer de pulmón. Los tumores ALK positivos son un subgrupo clínicamente relevante, ya que pueden tratarse muy eficazmente con el inhibidor de ALK Crizotinib.

Aparte de los cánceres, CISH también ha demostrado ser útil en la detección de infecciones por virus del papiloma humano.

34.3.7. Variaciones.

34.3.7.1. Silver-enhanced in situ hybridization (SISH). Hibridación in situ reforzada con plata.

SISH utiliza un método similar a CISH, pero un precipitado de plata es el producto final en lugar de un producto marrón. En este método, una sonda marcada con dinitrofenol (DNP) se une a la secuencia diana. A continuación, se añade un anticuerpo anti-DNP primario seguido de un anticuerpo secundario conjugado con HRP. El acetato de plata, la hidroquinona y el peróxido de hidrógeno se añaden posteriormente al anticuerpo secundario y HRP cataliza la polimerización de plata en presencia de peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, el metal plateado se deposita en los núcleos de la célula. La amplificación de HER-2 / neu se ve como puntos negros.

34.3.7.2. DuoCISH.

DuoCISH es una variación de CISH que aborda la necesidad de dos sondas diferentes en la misma diapositiva. Es una técnica bien establecida para la detección de la amplificación de HER-2 / neu, aunque a veces se informa que es menos eficaz que FISH. En esta técnica, una sonda se une a la referencia que, en el caso de la detección de amplificación de HER-2 / neu, es CEN17 (el centrómero del cromosoma 17) mientras que la otra sonda se une a la secuencia diana que es HER- 2 / neu.]. DuoCISH combina FISH y CISH en que convierte las señales de las sondas FISH a sustratos cromogénicos. Funciona sobre el principio de que el colorante de cianina azul es un sustrato para HRP y el colorante rojo es un sustrato para AP (fosfatasa alcalina). Por ejemplo, las señales de isotiocianato de fluoresceína verde (FITC) se convierten en precipitados cromogénicos azules a través de un anticuerpo anti-FITC conjugado a HRP (peroxidasa de rábano) y las señales de Texas Red se convierten en precipitados cromogénicos rojos a través de un anticuerpo anti-Texas Red conjugado con AP. Una ventaja de DuoCISH es que es posible distinguir entre la aneuploidía cromosómica y la amplificación génica, ya que el gen de referencia también se amplificará en aneuploidía, pero no en la detección de amplificación génica.

34.3.8. Otros métodos.

34.3.9. PCR con hibridación in situ.

Se usa para la amplificación de secuencias específicas de ADN o ARN en células o secciones de tejido, de forma que el número de copias se incrementen en PCR in situ a niveles detectables por métodos estándar de hibridación in situ. Su principal utilidad se da para identificar secuencias de ADN que no son fáciles de detectar usando hibridación in situ estándar. Sin embargo, esta técnica posee una baja eficiencia de amplificación y una mala reproducibilidad. PCR in situ directo suele resultar en falsos positivos debido a la incorporación de oligonucleótidos no marcados específicos en fragmentos de DNA. Estos artefactos exhiben señales nucleares y son evidentes en células apoptóticas. Los artefactos resultantes de la técnica se reducen por la acción de una exonucleasa o por reparación de estos fragmentos de DNA con T4 DNA ligasa o mediante el uso de ciclos con sondas marcadas. Los falsos positivos no se eliminan por completo, pero, el grado de detección específica aumenta.

Los métodos indirectos proveen máxima especificidad. Usualmente se usan sondas largas completas o sondas genómicas que incrementan el número de moléculas reporteras para obtener una buena señal. La naturaleza de los sistemas reporteros influye en la especificidad de la técnica.

Las sondas radioactivas presentan alta estabilidad, sin embargo, son muy costosas. Los sistemas colorimétricos basados en fosfatasa alcalina o peróxidos resultan en una señal pobre. Los sistemas de detección basados en fluorescencia no son recomendables dado que no conservan la morfología del tejido.

34.3.10. FISH Multicolor.

En el FISH multicolor, se usa dos o más sondas marcadas específicamente, las cuales luego de hibridarse con las secuencias de la muestra, son identificadas con diferentes colores fluorescentes. Esta es una técnica eficaz para buscar anomalías cromosómicas, que, a pesar de ser cara, presenta la ventaja de permitir pueden evaluar múltiples sitios cromosómicos.¹ Los tipos de FISH multicolor incluyen FISH multiplex, cariotipaje espectral, bandas de color entre especies (cross-species color banding) e hibridación genómica comparativa, estas técnicas se describen a continuación:

En el multiplex-FISH, el cariotipo espectral del genoma humano se realiza con 24 colores diferentes. La técnica de multiplex-FISH permite la detección de muchos cambios cromosómicos en el genoma en una sola reacción de hibridación y es considerado un método fiable para el diagnóstico de anomalías cromosómicas. Los dos sistemas de multiplexado-FISH y cariotipo espectral tienen diferentes maneras de adquirir y procesar imágenes de cromosomas, pero ambos proporcionan la misma información.

Otro tipo de FISH Multicolor es cross-species color banding, el cual combina la sensibilidad del método tradicional de bandas G con la objetividad y la eficiencia de una técnica molecular. Este método utiliza una sonda procedente de una especie de mono, el gibón, para examinar los cromosomas humanos.

La Hibridación genómica comparativa es un buen método para investigar la composición genética de las células a partir de dos fuentes diferentes. Este enfoque se utiliza para la investigación de las variaciones en el número de copias de ADN y se caracteriza por su capacidad de revelar alteraciones genéticas en todas las áreas del genoma en un experimento por FISH y análisis de imágenes por computadora.

34.3.11. Hibridación in situ genómica (GISH).

Se utiliza con el fin de distinguir los cromosomas de diferentes progenitores o de diferentes genomas en híbridos interespecíficos o aloploidos. La característica principal de esta técnica es que mientras FISH utiliza secuencias específicas de ADN como sondas, GISH utiliza ADN genómico de una especie como sonda.