

# **CISH: Chromogenic *in situ* hybridisation**

## **Situación práctica**

**Julián Sanz Ortega**

### **1.- Introducción**

#### **a) Las sondas:**

Las sondas de hibridación “in situ” se pueden marcar incorporando nucleótidos marcados con Fluoróforo (Fluoresceína, FITC, Cy3, Alexa488..) lo que daría lugar a FISH o un Hapteno (la molécula inmunogénica, BIOTINA o DIGOXIGENINA) que da lugar a CISH. Dentro del marcaje de sondas CISH, la Digoxigenina tiene la ventaja de ser una molécula que no ocurre naturalmente en mamíferos y además la posibilidad de detectar background es menor cuando se compara con la biotina. Las sondas suelen ser secuencias grandes usando BAC (bacterial artificial chromosomes) YAC (yeast artificial chromosomes), P1 u otros vectores con secuencias de Kbases. Para introducir los nucleótidos marcados en las sondas, tanto FISH como CISH, hay dos formas principales:

A.- “NICK TRANSLATION”: la ADNasa I introduce muescas (es la traducción de NICK) en ADN, creando una especie de brechas en las que la ADN polimerasa I introduce los nucleótidos marcados.

B.- La segunda forma mas comúnmente empleada es la RANDOM PRIMING. En esta oportunidad, al DNA desnaturalizado le son incorporados fragmentos de bases (hexámeros o decámeros, de secuencia aleatoria) mas nucleótidos marcados con las moléculas de fluorofobo o de Biotina/Digoxigenina y la DNA polimerasa I.

Existe también marcaje basado en PCR, que es similar en el sentido a que se usan nucleótidos marcados que luego son incorporados al DNA mediante PCR. Esta forma es Buena para sondas que no son tan grandes.

**b) La hibridación:** La técnica de hibridación es similar tanto en FISH como CISH, siendo la principal diferencia la amplificación de la señal (*inmunohistoquímica*):

- Si el hapteno es Biotina: Avidina-Biotina

- Si es Digoxigenina: Peroxidasa-antiperoxidasa, fosfatasa alcalina

Para la visualización de estas reacciones enzimáticas /inmunohistoquímicas se pueden emplear distintos **cromógenos**: diaminobencidina (marrón), tetramethyl benzidine (verde), New Fuchsin (rojo). De manera similar a la inmunohistoquímica, se puede realizar un **doblo marcaje** empleando dos de estas técnicas lo que se denomina: “dual colour CISH”.

También se pueden **convertir sondas de FISH en CISH**, para ello las moléculas de fluorescencia (FITC, Cy3, Alexa488 y otros) son utilizadas como determinantes antigénicos. Contra estas moléculas existen comercialmente anticuerpos mono o policlonales de tipo IgG que es el que se reconoce con los sistemas de detección basados en peroxidasa o Fosfatasa Alkalina. Esto se utiliza también en los llamados sistema de amplificación de inmunohistoquímica para proteínas poco abundantes.

## 2.- Optimización

Hay que ajustar las recomendaciones de la casa comercial que vende la sonda a nuestro laboratorio y en ocasiones pueden variar dependiendo del tipo de tejido que queremos analizar. Los aspectos más importantes para poner a punto las técnicas son:

- **Desparafinado** (dewaxing): relación inversa entre tiempo y temperatura (5-40 min)/ a t<sup>a</sup> ambiente, 42°C ó 58°C. Hay pérdida de señal si el desparafinado insuficiente (Ej: <3 veces durante 5–10 min en xilol a T<sup>a</sup>A)  
Recomendación: 55°C por 15 min (3 veces por 5 min) o 42°C por 15–30 min y luego segunda incubación de 5 min con xilol precalentado a 58°C.
- **Tiempo digestión**, (over or under digestion) entre 4 y 10 min. *Depende del tipo de tejido.* <4 min ausencia total de señales, >10 min mala morfología o señales borrosas, background, pérdida de sensibilidad

Otros elementos que pueden variarse son: Tampón hibridación y lavados post-hibridación, concentración sonda (20 -100 ng/ l),...

### 3.- Aplicaciones

Con sondas CISH tenemos las mismas aplicaciones que FISH. Podemos estudiar el ADN y el ARN. Es especialmente útil para detectar amplificaciones y traslocaciones genómicas, aunque también sirve para determinar deleciones...

Comparando FISH y CISH, CISH tiene mejor correlación con morfología, permite identificar mejor el componente neoplásico y no neoplásico del tejido, produce un marcaje permanente y no necesita microscopio de fluorescencia. Sin embargo hay un menor número de sondas CISH disponibles, siendo las más habituales actualmente las sondas para detectar el virus de Epstein Barr (EBERS), CMV, cadenas ligeras de inmunoglobulinas (kappa y lambda) o Her2. Se ha analizado especialmente la comparación entre FISH y CISH para detectar la amplificación de Her2/neu en cáncer de mama, observándose una alta concordancia entre ambas técnicas.

#### Referencias:

- Evans MF, Aliesky HA, Cooper K: "Optimization of biotinyl-tyramide-based in situ hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens". *BMC Clin Pathol* 2003;3:2.
- FISH vs CISH: Marc van de Vijver, M Bilous, W Hanna, M Hofmann, P Kristel, F P-Llorca and J Rüschoff: "Chromogenic *in situ* hybridisation for the assessment of HER2 status in breast cancer: an international validation ring study". *Breast Cancer Research* 2007 (*en prensa*).