

## **Hibridación de los ácidos nucleicos. Fundamento teórico**

Pedro L. Fernández Ruiz  
Hospital Clínico/ IDIBAPS/Universidad de Barcelona  
Barcelona

La hibridación es la construcción artificial de ácidos nucleicos bicatenarios a partir de dos monocatenarios usando la complementariedad de bases. Se trata, por tanto, de un proceso de unión de dos cadenas complementarias de ADN, ARN o de ADN y ARN para formar una molécula de ácido nucleico de doble cadena. Es un método muy versátil que permite estudiar el grado de relación genética entre dos ácidos nucleicos. También permite la detección de fragmentos de DNA que son complementarios a fragmentos monocatenarios de secuencia conocida (sondas).

### **MODULADORES DE LA HIBRIDACIÓN**

La calidad en la unión de las cadenas de ácidos nucleicos en un proceso de hibridación viene determinada por unos moduladores que imponen una mayor o menor exigencia de perfección o “astringencia” (“stringency”).

#### **Complementariedad (secuencia de bases):**

Una purina siempre está encarada a una pirimidina. Las dos cadenas de polinucleótidos de la doble hélice están conectadas mediante uniones hidrógeno entre bases. En condiciones normales, una G se une específicamente con una C, mientras que una A solamente se puede unir con una T. El par de bases GC tiene tres uniones hidrógeno, mientras que el par AT tiene solamente dos. Como consecuencia, se necesita más energía para romper el par GC que el par AT. El hecho de que una cadena de ADN sea complementaria a la otra permite una reproducción exacta del material genético; así, cada cadena puede servir como molde (“template”) para la síntesis de otra. Cualquier hibridación en la que la complementariedad sea

inferior al 70% se considerará como no-homóloga y, por tanto, ocurre en condiciones de baja astringencia (temperatura baja y/o concentración alta de sales).

### **Temperatura:**

La temperatura elevada rompe los puentes de hidrógeno y separa las hebras del ADN (desnaturalización). Esto ocurre alrededor de los 90° (temperatura de fusión). Cuando una solución de DNA que ha sido calentada se enfría lentamente se produce la rehibridación dando lugar a la estructura inicial. Tal reasociación ocurre sólo si las secuencias de bases son complementarias. Por lo tanto, la hibridación permite la formación de complejos bicatenarios no naturales de DNA:DNA y ADN:ARN.

### **pH y productos químicos:**

El pH alto ( $\text{pH} > 11$ ) rompe los puentes de hidrógeno, por lo que se produce desnaturalización. Esto también pueden producirlo agentes químicos como la urea y la formamida e incluso el agua destilada, que impide la neutralización de los grupos fosfato de la molécula por sales de sodio y magnesio; al ser los grupos fosfato de marcado carácter negativo, su repulsión causa la separación física de las hebras y, por tanto, su desnaturalización.

La concentración baja de sales en una solución donde se produce una hibridación impone una condición de alta astringencia, permitiendo sólo uniones de gran complementariedad.

## **TÉCNICAS BASADAS EN LA HIBRIDACIÓN:**

### **I. Blotting: Southern blot, Northern blot**

#### **I.1. Southern blot**

El método tipo Southern o Southern blot fue desarrollado por E. M. Southern para la detección de genes específicos en el ADN celular. El ADN es digerido

con una enzima de restricción y los fragmentos son separados por tamaños mediante una electroforesis en un gel. Se realiza tinción con bromuro de etidio para comprobar la calidad de la electroforesis y del ADN (Fig. 1). A continuación los fragmentos de ADN de doble cadena son parcialmente hidrolizados con un ácido débil y desnaturalizados con NaOH para permitir la transferencia. Posteriormente, el ADN es transferido a un filtro de nitrocelulosa, con lo que en el filtro queda representada una réplica de la disposición de los fragmentos de ADN presentes en el gel. A continuación el filtro se incuba durante un tiempo con la sonda marcada (radiactivamente o con un fluorocromo); durante la incubación la sonda se va hibridando a las moléculas de ADN de cadena sencilla de secuencia complementaria (o muy parecida). La sonda unida al fragmento de ADN complementario se puede visualizar en el filtro de una forma sencilla mediante una exposición a una película de rayos X para el caso de sondas radiactivas o con una película sensible a la luz, para el caso de sondas con fluorocromo.

## I.2. Northern blot

Es esencialmente idéntica al método de Southern blot, salvo que las moléculas de ácido nucleico de la muestra, en este caso de ARN (total, mensajero, vírico, etc.), se separan por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de formaldehído, que forma parte de la composición del gel). Esto es debido a que, a pesar de ser una molécula de una sola cadena, se forman complejas estructuras secundarias que dificultan la migración. Al igual que en el Southern blot, el ARN se transfiere a la membrana de filtro y se hibridan con sondas de ADN marcada. Durante la electroforesis se pueden observar grandes cantidades de ARNm correspondiente a ribosomal (unidades 28S y 18S) (Fig.2).

Tanto la técnica de Southern como de Northern blot se usan poco hoy en día al haber sido sustituidas por técnicas derivadas de la PCR.

## II. CGH (hibridación genómica comparada):

La hibridación genómica comparada es una técnica citogenética para detectar regiones cromosómicas que están amplificadas o delecionadas en una muestra, especialmente en tumores. En la CGH, dos muestras de DNA genómico (una tumoral y una normal) se marcan con diferentes fluorocromos y se hibridan simultáneamente sobre una extensión de cromosomas metafásicos. La relación de intensidad entre las dos señales fluorescentes proporciona una medida de la relación entre el número de copias de las dos muestras de DNA genómico. Una técnica derivada de la anterior es la matriz de CGH (CGH-array), en la que los DNAs marcados se hibridan sobre una matriz de fragmentos de DNA bien definidos, inmovilizados sobre un soporte sólido. Como resultado, la resolución obtenida se incrementa enormemente, ya que existe una gran cantidad de fragmentos génicos representados y de relativamente pequeño tamaño. La alta resolución de esta técnica permite la detección de desequilibrios genómicos submicroscópicos (Fig.3).

### **III. Microarrays de ADN**

Es el tipo de microarray al que suele referirse cuando se habla de forma general y sirven para analizar el nivel de expresión de miles (o todos) los genes de una muestra. Los hay de dos tipos principales: aquellos que utilizan como sondas fragmentos de cDNA y los que usan fragmentos más pequeños de ADN (oligonucleótidos). A estas sondas, colocadas sobre el soporte, se les lanzará el ARN de la muestra que ha sido previamente transformado en cDNA, de tal manera que aquellos genes muy expresados (con gran cantidad de ARN en la muestra original) darán una mayor señal al unirse (hibridación) a su sonda correspondiente, lo cual se detecta por medio de fluorescencia con un lector de luminosidad (Fig.4).

El resultado del experimento es una “fotografía” del estado de expresión del ARN de los genes de la muestra (tumoral o normal). Se trata por tanto de un método de screening masivo para detectar aquellos genes que se sobre- o infraexpresan en una muestra.

Utilidad en Patología Molecular:

- Detección de mecanismos o vías estimulados o reprimidos

en el metabolismo celular (neoplasias o no neoplasias)

- Detección de marcadores tumorales útiles para el diagnóstico y clasificación de las neoplasia
- Detección de marcadores tumorales útiles para el pronóstico y predicción de respuesta terapéutica de las neoplasia.
- Detección de dianas terapéuticas

#### **IV. Hibridación in situ**

Es una técnica de hibridación que se realiza directamente sobre tejido, células o cromosomas localizados sobre un soporte sólido, habitualmente un portaobjetos. La visualización puede realizarse por medios isotópicos , enzimáticos o con fluorescencia , siendo evaluada en un microscopio. Su gran virtud es que permite identificar las células donde se produce la hibridación que detecta la alteración genómica o transcripcional.

La visualización de resultados puede realizarse por marcaje con fluorescencia de la sonda (FISH) o cromogénico (CISH, SISH). Este último tiene la ventaja de poder realizarse en microscopio de campo claro y poder almacenarse casi indefinidamente las preparaciones(Fig. 5).

Los usos más frecuentes en Patología molecular son la detección de amplificaciones (Ej. Her2 en cáncer de mama c-myc en linfoma de Burkitt), traslocaciones ( linfoma folicular, linfoma del manto, sarcomas) y presencia de virus (Epstein-Barr, HPV).

Fig. 1. Electroforesis de ADN previa a Southern blot. Cada carril contiene un ADN genómico problema que ha sido fragmentado con un enzima de restricción produciendo una mancha continua (“smear”). El primer carril de la izquierda corresponde a marcadores de ADN de diferente tamaño.

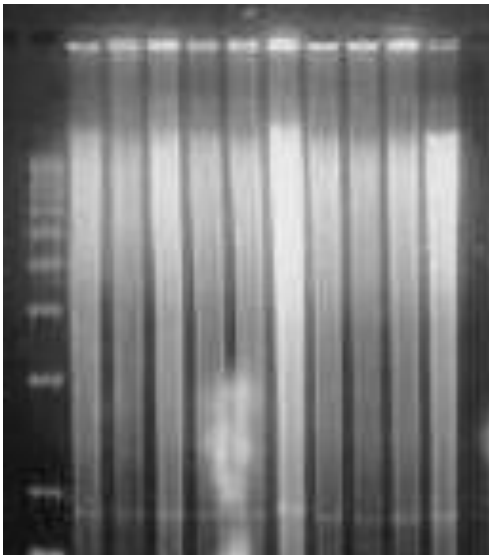


Fig. 2. Electroforesis de ARN donde destaca gran cantidad de ARN correspondiente a las unidades 28S y 18S ribosomales.

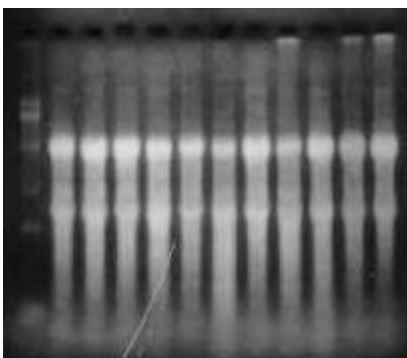


Fig.3. Esquema de la técnica de CGH y CGH-array.

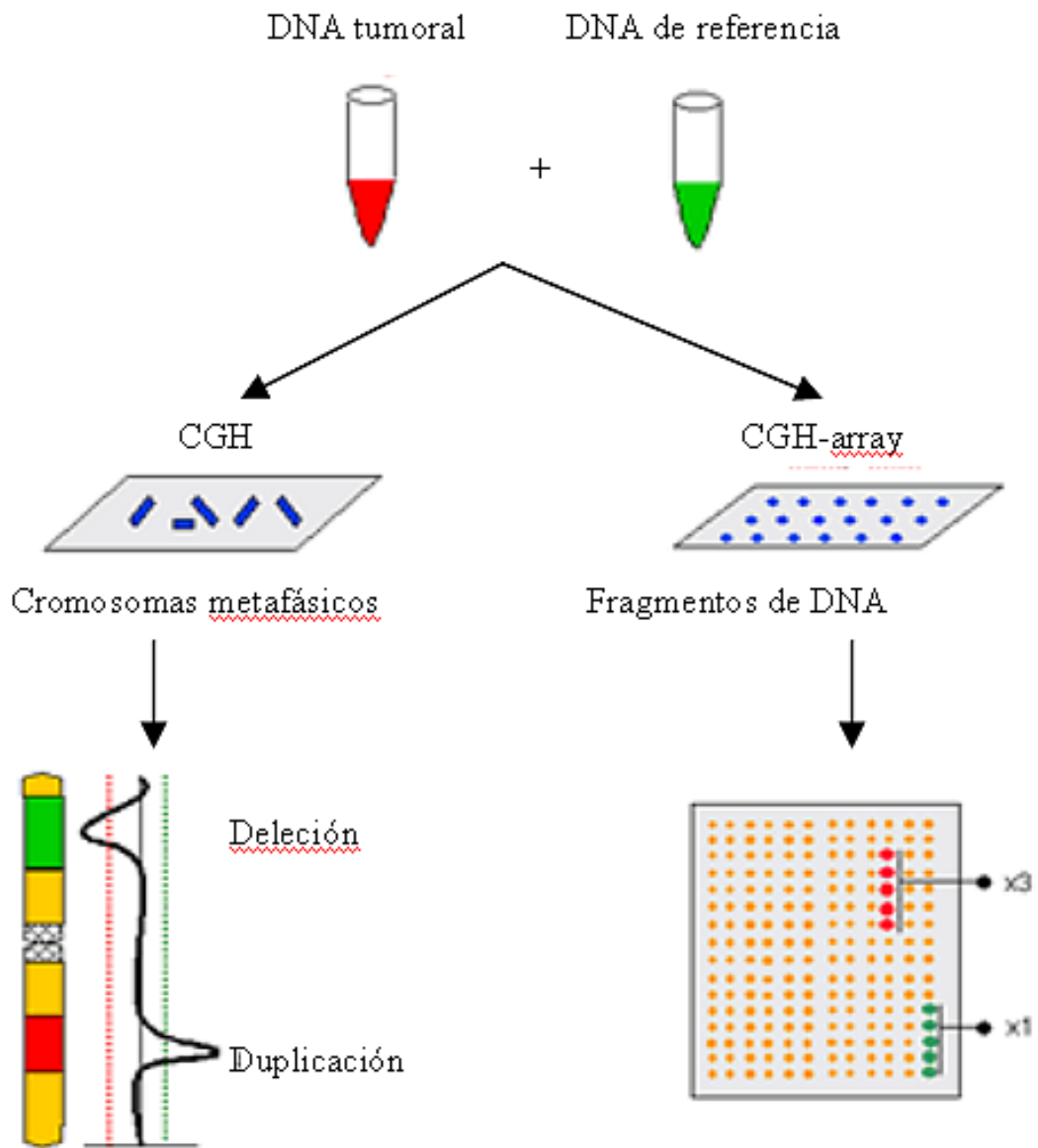


Fig. 4. Representación esquemática del análisis de expresión mediante microarrays de cDNA. Tras la extracción de ARN, este se transforma en cDNA y se co-hibrida sobre el microarray con sondas de ADN. Los diferentes colores tras la hibridación indican el nivel de expresión (rojo: sobreexpresión)

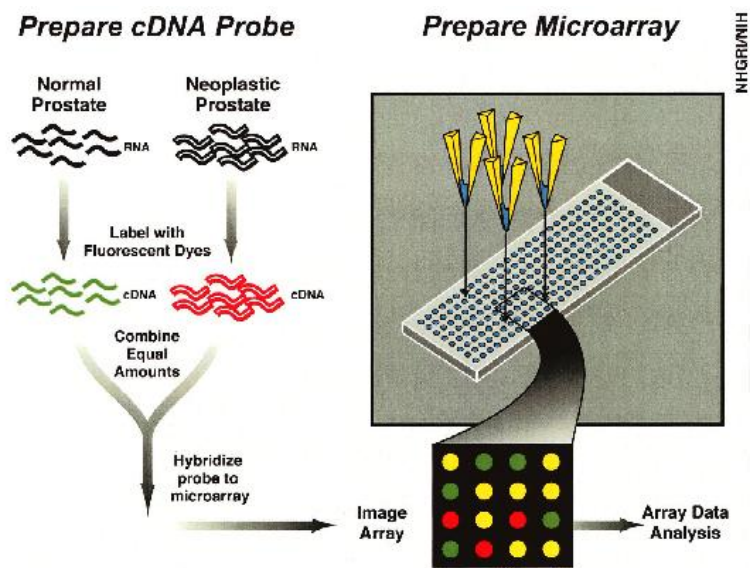


Fig.5. CISH positiva para amplificación de Her2 en cáncer de mama

