

Técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en dosimetría biológica

Fernández Martín C¹, Moreno Domene M², Prieto Rodríguez MJ²

¹Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Laboratorio de Dosimetría Biológica, Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.

²Laboratorio de Dosimetría Biológica, Servicio de Oncología Radioterápica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.

RESUMEN

La hibridación in situ con fluorescencia (FISH) es una técnica que permite detectar secuencias concretas de ADN en células mediante marcadores (sondas) fluorescentes. En su aplicación para el estudio de translocaciones en dosimetría biológica, hace posible "colorear" varios cromosomas para observar los intercambios de material genético (translocaciones) que se han producido entre estos y el resto de cromosomas. Este tipo de alteraciones se producen de forma espontánea a lo largo de la vida y cuando no son letales permanecen en las células. Se ha demostrado que la radiación ionizante aumenta su frecuencia lo que permite su uso en dosimetría biológica, especialmente para la estimación de dosis en exposiciones crónicas o retrospectivas.

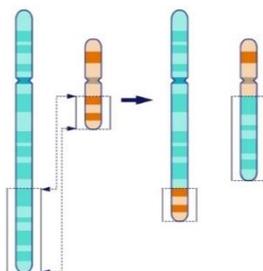
INTRODUCCIÓN

Los diferentes escenarios en los que una sospecha de sobreexposición a radiaciones ionizantes haya tenido lugar requieren del desarrollo de herramientas especializadas. La dosimetría biológica es una de ellas, estimando la dosis absorbida (Gy) tras la exposición a radiaciones ionizantes. Una respuesta rápida es fundamental en la atención a personas con sospecha de sobreexposición, sin embargo pueden producirse retrasos inesperados o situaciones que sugieran una cronicidad en la exposición. En estos casos, las técnicas citogenéticas clásicas de dosimetría biológica, al analizar aberraciones cromosómicas letales para la célula, el resultado podría subestimar la dosis absorbida real.

Estas situaciones hacen necesario el análisis de alteraciones más estables en el tiempo, como las translocaciones¹. Las translocaciones tienen lugar tras la ruptura de dos o más cromosomas que se reparan de manera errónea provocando un intercambio del material genético entre ellos (*Figura 1*). Estas alteraciones que se observan en los cariotipos con bandeado G no se pueden aplicar para dosimetría biológica ya que implica el análisis de un elevado número de metafases, resultando un proceso excesivamente largo y laborioso. La aplicación de la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) al análisis de translocaciones permite diseñar un procedimiento específico para estudios de dosimetría biológica.

Figura 1 Translocación recíproca entre dos cromosomas.

Fuente: Darryl Leja, NHGRI.



La técnica FISH fue descrita por primera vez por dos grupos de investigación de manera independiente en 1969. Consiste en la detección de secuencias específicas de ADN mediante

marcadores o sondas constituidos por fragmentos de ADN unidos a fluorocromos homólogos a las secuencias de interés. La sonda se une por especificidad de bases (A-T, C-G) a la secuencia de ADN complementaria de la muestra. Existen diferentes técnicas que se aplican según el tipo de ADN de la sonda. Para su aplicación a dosimetría biológica, cuyo objetivo es determinar el número de intercambios cromosómicos en un elevado número de metafases, se utiliza el FISH de "pintado cromosómico", que colorea el cromosoma seleccionado

DESARROLLO

1. Consideraciones previas: elección de los cromosomas a hibridar

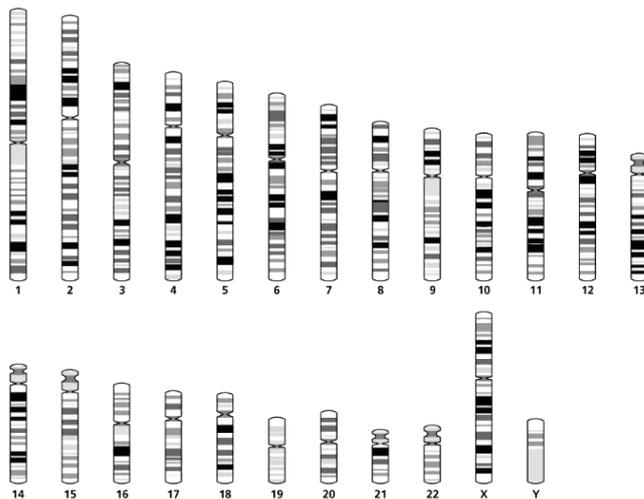
A diferencia de otras técnicas de biodosimetría, que permiten analizar la totalidad de los cromosomas de una célula, en la técnica de FISH solo se observan intercambios entre los cromosomas "pintados" con el resto de cromosomas. Es por ello que es fundamental establecer cuantos y qué cromosomas utilizar para poder extrapolar la frecuencia de translocaciones observadas a todo el genoma, y determinar la eficiencia del sistema diseñado mediante el nº de metafases que deben ser analizadas.

Al igual que con el análisis de dicéntricos, se deben analizar 500 *equivalentes genómicos*³, que equivale a un determinado número de células según la cantidad de ADN hibridado.

Al elegir 2 o 3 de los cromosomas de mayor tamaño (cromosomas 1 a 12, ver *Figura II*), lo que corresponde a alrededor del 20 % del genoma (*Tabla I*)², se consigue detectar las translocaciones con una eficiencia del 33 % cuando se realiza pintado cromosómico con solo un color.

Figura II Ideograma del cariotipo humano. Fuente: elEsemble

Tabla I Contenido relativo de ADN de cada cromosoma en la especie humana



Cromosoma nº	Sexo masculino	Sexo femenino
1	8.28	8.15
2	8.04	7.9
3	6.74	6.63
4	6.39	6.29
5	6.11	6.01
6	5.77	5.68
7	5.39	5.3
8	4.88	4.8
9	4.57	4.49
10	4.53	4.46
11	4.54	4.46
12	4.5	4.43
13	3.59	3.53
14	3.43	3.38
15	3.34	3.29
16	3.09	3.04
17	2.9	2.85
18	2.68	2.63
19	2.11	2.08
20	2.27	2.23
21	1.58	1.55
22	1.76	1.74
X	2.58	5.08
Y	0.93	
TOTAL	100	100

El porcentaje de genoma pintado por cada combinación, respecto del total del genoma, se calcula a partir de la longitud física de los cromosomas². La frecuencia total de translocaciones se estiman según una fórmula estándar propuesta por Lucas et al.³, que se aplica admitiendo el supuesto de que los intercambios son emparejamientos simples:

$$F_G = \frac{F_p}{2,05 f_p (1 - f_p)}$$

Donde:

F_G es la frecuencia de aberraciones del genoma entero,

F_p es la frecuencia de translocaciones detectada con FISH, y

f_p es la fracción del genoma que se ha hibridado, teniendo en cuenta el sexo de la persona (Tabla I)⁴.

En nuestro laboratorio al pintar los cromosomas 1 y 2, nos da una eficiencia del 28%, aplicando la fórmula para determinar el nº de metafases por equivalente genómico debemos analizar un mínimo de 2000 metafases.

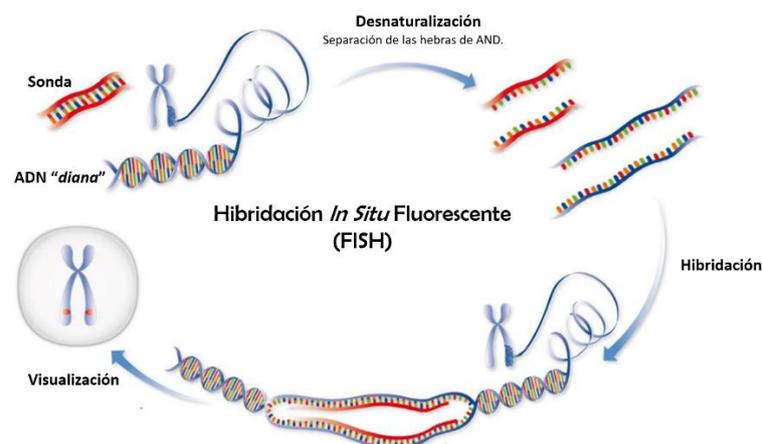
2. Cultivo celular y procesamiento

El cultivo celular para la técnica de FISH no difiere del empleado en citogenética convencional. Los cultivos se procesan para obtener extensiones celulares con una densidad celular adecuada: deben extenderse con un número elevado de células para facilitar el análisis posterior, pero no tanto que las metafases queden demasiado próximas unas de otras o poco extendidas, lo cual dificultaría la visualización de los cromosomas. De este modo se optimiza tanto el tiempo de análisis como el coste del ensayo. Los portaobjetos y las suspensiones celulares no extendidas se mantienen refrigeradas para tratar de frenar el deterioro de las metafases.

Tras recibir un tratamiento térmico y desecar su superficie con etanol los portaobjetos están listos para la hibridación. Las sondas FISH son fotosensibles, por lo que su manejo y el de los portaobjetos hibridados debe hacerse siempre en semi oscuridad con luz amarilla. Se prepara la mezcla de sondas y extiende sobre el portaobjetos, tapando con un cubreobjetos de vidrio y sellando los bordes con pegamento flexible. Una vez el pegamento ha secado, los portaobjetos se introducen en el termociclador. El termociclador somete a los portaobjetos a una serie de ciclos de temperatura que permiten la hibridación del ADN cromosómico (*Ilustración I*):

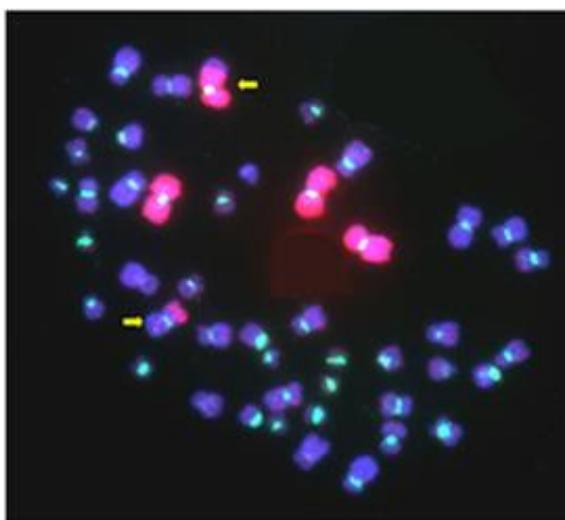
1. Desnaturalización a 70-80°C: la doble cadena de ADN se separa, de modo que la sonda puede unirse a la secuencia de ADN diana. Esta fase suele durar 10-15 minutos.
2. Hibridación a 37-50°C: se produce la unión por complementariedad de bases entre la sonda y el ADN diana. Esta fase dura varias horas.

Ilustración I Hibridación de ADN con sonda fluorescente. Fuente: <https://www.cytocell.com/>



Una vez finalizada la hibridación se retira el pegamento y se lava la superficie del portaobjetos para eliminar los restos de sonda. Se repite el tratamiento secante y se deposita una tinción de contraste para teñir el material no hibridado, por ejemplo DAPI, que tiñe todo el material de azul. Se coloca un cubreobjetos de nuevo para contener el DAPI en la superficie del portaobjetos. Tras unos 15 minutos de reposo la preparación está lista para ser observada al microscopio de fluorescencia. Las sondas fluorescentes emiten luz a diferentes longitudes de onda, de manera que aplicando los filtros adecuados a la luz del microscopio se puede observar la fluorescencia de cada una. En nuestro laboratorio se utiliza el rojo (Texas RED) para los cromosomas 1 y 2 y el verde (FITC) para la sonda pancentromérica que tiñe todos los centrómeros de los cromosomas (*Ilustración II*).

Ilustración II Metáfase tras FISH observada al microscopio de fluorescencia. Los cromosomas 1 y 2 están marcados en rojo, los centrómeros en verde y el resto del material genético en azul. Se observa una translocación (felchas amarillas).



3. Criterios de elección de las células a analizar

No existe un consenso sólido a la hora de considerar qué células son válidas para examen. Algunos investigadores consideran válida cualquier metáfase en la que se encuentre material hibridado, mientras que otros establecen que la metáfase debe presentar todo el material hibridado. Sin embargo, en cualquiera de los supuestos las células deben estar suficientemente bien extendidas en los portaobjetos de manera que su visualización sea óptima⁴.

En nuestro laboratorio el criterio de elección es que las metafases resultantes deben tener todo el material genético de interés hibridado, es decir, los dos pares de cromosomas 1 y 2, además de aparentemente 46 estructuras cromosómicas.

4. Nomenclatura y recogida de datos

A la hora de contabilizar las alteraciones encontradas es necesario describirlas. Puede realizarse un esquema, en el que se represente todo el material cromosómico pintado, para posteriormente proceder al análisis de la metáfase. Para describir las aberraciones cromosómicas se han desarrollado principalmente tres sistemas: el sistema convencional⁵, el propuesto por Savage & Simpson (sistema S&S)⁶ y el sistema PAINT⁷ que es el sistema más ampliamente utilizado y el que seguimos en nuestro laboratorio.

En este sistema, a los cromosomas que presenten translocaciones se les asigna una letra según si están pintados o no (por ejemplo, B pintados y A no pintados). La letra deberá estar en mayúscula si la

porción de ese color presenta centrómero y minúscula si no. Un objeto t(Ab) indicaría un cromosoma marcado con dos colores que posee una porción centromérica de un cromosoma no pintado y una porción no centromérica de un cromosoma pintado. En cambio, t(Ba) indicaría lo opuesto, un cromosoma con una porción centromérica pintada y una no centromérica sin pintar. La pareja de cromosomas se nombraría t(Ab)t(Ba) y se observaría como en la *Figura III*. En Tucker *et al.*⁷ se puede encontrar la descripción completa de todas las abreviaciones utilizadas en el sistema para cada posible configuración.

*Figura III Translocación t(Ab)t(Ba) según la nomenclatura PAINT.
Fuente: NHGI*



Por otro lado, las aberraciones cromosómicas se pueden clasificar en:

- Simples: la técnica no permite identificar el origen de los fragmentos coloreados, por lo que en realidad estas translocaciones son **aparentemente simples**. Se necesitan menos de 3 roturas en 2 cromosomas para producirlas.
- Complejas: se necesitan 3 o más roturas en 2 o más cromosomas.
- Completas: cuando todos los fragmentos pintados se han vuelto a unir.
- Incompletas: cuando aparece sólo algún fragmento pintado.

Volviendo a la *Figura III*, nos encontraríamos ante una translocación completa aparentemente simple.

A su vez, las células con aberraciones cromosómicas se clasifican en:

- Estables: Las aberraciones cromosómicas observadas no son letales para la célula.
- Inestables: cuando en la célula aparecen aberraciones cromosómicas potencialmente letales, como fragmentos, anillos, dicéntricos...

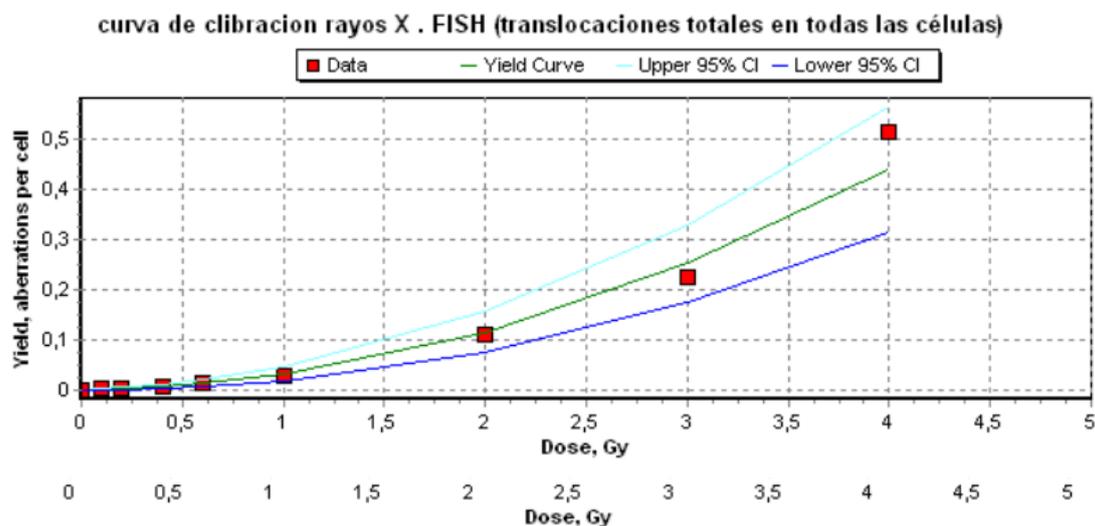
5. Estimación de dosis

Factores a tener en cuenta:

- a. **Frecuencia de aberraciones:** está determinado por factores como los hábitos tóxicos (consumo de tabaco) el sexo, y principalmente la edad, en función de las características específicas del sujeto tendremos un nivel basal o *background* de translocaciones. Existen numerosos metaanálisis que han estimado la frecuencia de translocaciones en grandes muestras de población teniendo en cuenta estos factores⁴ siendo el análisis de *Sigurdson et al.*⁸ el empleado en nuestro laboratorio.

- b. Curvas de calibración: una vez que hemos analizado el número de metafases necesario, sustraemos la frecuencia basal del individuo a la encontrada en el análisis. Este número de aberraciones sería el inducido por radiaciones ionizantes. Interpolando el resultado con una curva de calibración in vitro, obtendríamos la dosis de radiación. En nuestro laboratorio, hemos realizado curvas para rayos X y gamma⁹ (Figura IV).

Figura IV Curvas de calibración para rayos X y gamma del HGUGM



$$Y = 0,0005 (+/- 0,0004) + 0,0055 (+/- 0,0039) D + 0,0261 (+/- 0,0030) D^2$$

$$Y = 0,0005 (+/- 0,0004) + 0,0030 (+/- 0,0033) D + 0,0201 (+/- 0,0025) D^2$$

CONCLUSIONES

La capacidad de estimar dosis ocurridas en el pasado o cuando no es posible la estimación de dosis rápidamente tras la exposición, hacen de la técnica FISH una herramienta de gran utilidad en el laboratorio de dosimetría biológica. Si bien el procedimiento técnico resulta sencillo en su ejecución, sus bases estadísticas y la elección de los diferentes métodos de estimación de dosis requieren de minuciosidad y planificación previa a su establecimiento en un laboratorio. La técnica forma parte de guías internacionales de respuesta a emergencias radiológicas⁴ y está definida mediante estándares internacionales (norma ISO 20046:2019).

REFERENCIAS

1. Darroudi F. Use of FISH-translocations Analyses for Retrospective Biological Dosimetry: How Stable are Stable Chromosome Aberrations?. Radiation Protection Dosimetry, Volume 88, Issue 1, 1 March 2000, Pages 101–109. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.rpd.a033013>
2. Morton NE. Parameters of the human genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(17):7474–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.17.7474>

3. Lucas JN, Awa A, Straume T, Poggensee M, Kodama Y, Nakano M, et al. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol.* 1992;62(1):53–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09553009214551821>
4. Organismo Internacional de Energía Atómica. Dosimetría citogenética: aplicaciones en materia de preparación y respuesta a las emergencias radiológicas, 2014.
5. Natarajan AT, Vyas RC, Darroudi F, Vermeulen S. Frequencies of X-ray-induced chromosome translocations in human peripheral lymphocytes as detected by in situ hybridization using chromosome-specific DNA libraries. *Int J Radiat Biol.* 1992;61(2):199–203. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/09553009214550821>
6. Savage JRK, Papworth DG. Constructing a 2B calibration curve for retrospective dose reconstruction, *Radiat. Prot. Dosim.* 88. 2000, 69–76.
7. Tucker JD, Morgan WF, Awa AA, Bauchinger M, Blakey D, Cornforth MN, et al. PAINT: a proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting. *Mutat Res.* 1995;347(1):21–4. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90028-4](http://dx.doi.org/10.1016/0165-7992(95)90028-4)
8. Sigurdson AJ, Ha M, Hauptmann M, Bhatti P, Sram RJ, Beskid O, et al. International study of factors affecting human chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2008;652(2):112–21. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571808000193>
9. Crespo RH, Domene MM, Rodríguez MJP. Biodosimetry and assessment of radiation dose. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2011;16(4):131–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S150713671100068X>