

# HIBRIDIZAÇÃO

A técnica de hibridização de ácidos nucleicos surgiu entre as décadas de 1960 e 1970, e usava isótopos radioativos para marcar as sondas de interesse. Nessa época, os resultados eram analisados por autorradiografias, diferentemente das atuais análises com microscopia de fluorescência. A hibridização é uma técnica que tem o princípio da complementariedade das bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos como base (adenina com timina e citosina com guanina). Essa técnica consiste, de forma básica, em localizar sequências de interesse no genoma de quaisquer organismos, hibridizando-as ao próprio DNA da espécie. Assim, a hibridização é definida como sucessivos tratamentos químicos e enzimáticos que fazem com que a dupla fita de DNA-alvo seja aberta (desnaturada) pela ruptura das pontes de hidrogênio, e unida (hibridizada) inteira ou parcialmente com uma sonda de ácidos nucleicos marcada com fluorocromos. A sonda consiste em uma sequência de DNA complementar à dupla fita desnaturada que se pretende localizar no genoma do organismo de interesse por meio da emissão de sinais luminosos que são detectados por microscópio de fluorescência. Para isso, a sonda de ácidos nucleicos recebe uma marcação com reagentes químicos (fluorocromos) antes da hibridização. Esses fluorocromos são visualizados perante a excitação causada por algumas faixas de comprimentos de onda luminosos emitidas pelo microscópio óptico de fluorescência.

O sucesso da hibridização depende da capacidade do DNA de se anelar às sequências complementares após a desnaturação (período em que a fita de DNA é simples). Dessa forma, o ponto de fusão do DNA, ou seja, o momento em que ocorre a ruptura das pontes de hidrogênio e a abertura da dupla fita de DNA, varia de um organismo para outro. O ponto de fusão do DNA também depende da quantidade de pares de base G-C e A-T, sendo que, quanto mais pares G-C, maior o ponto de fusão do

genoma. Isso ocorre porque o par G-C é mais estável, apresentando três pontes de hidrogênio, enquanto o par A-T conta com apenas duas. Após o anelamento da sonda com sua sequência-alvo complementar, o padrão de hibridização é visto em microscópio de fluorescência.

Os fatores que interferem no anelamento da hibridização são: temperatura de fusão; pH; concentração de cátions monovalentes; presença de solventes orgânicos. O pH alto deve ser usado para produzir condições de hibridização rigorosas. Já os cátions monovalentes, como o sódio, interagem eletrostaticamente com os ácidos nucleicos, fazendo com que concentrações de sal elevadas aumentem a estabilidade do híbrido. Assim, eles devem ser removidos da mistura de hibridização ou complexados com agentes como citrato ou EDTA. Por outro lado, os solventes orgânicos reduzem a estabilidade térmica de polinucleotídeos de fita dupla, fazendo com que a hibridização ocorra em temperaturas mais baixas na presença de formamida.

Em cromossomos, podem ser feitas a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) ou a hibridização genômica comparativa (CGH); em sequências diretamente dispostas sobre uma lâmina, a hibridização genômica comparativa de *array* (CGH *array*). Suas aplicações médicas e biológicas são diversas. Na FISH, as sondas podem ser constituídas de microssatélites, de *loci* específicos, ou, ainda, de cromossomos inteiros. Os microssatélites podem ser constituídos por: fragmentos de DNA; diferentes tipos de subunidades de RNA (5S e 18S, por exemplo); ou sequências encontradas nos telômeros (estruturas responsáveis por proteger o final dos cromossomos da degradação durante a replicação do DNA). Esse tipo de sonda é formado por sequências curtas de material genético repetitivo organizado em *tandem* (ou seja, sequências que ficam uma ao lado da outra), capaz de indicar, de forma simplificada, eventos como heterocromatinização genômica e movimentação de RNA, além de fissão e fusão cromossômica, por exemplo.

Por outro lado, as sondas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs) podem ser formadas por uma infinidade de sequências, geralmente curtas, que, após clonadas, geram plasmídeos, que mesclam o DNA de interesse ao cromossomo bacteriano. Esse tipo de sondas provém de pequenas regiões cromossômicas portadoras de genes específicos, os *loci* cromossômicos. Cromossomos inteiros considerados normais, da

mesma espécie do organismo-alvo, são usados como sondas, comparando divergências em sua composição cromossômica estrutural interna e/ou externa. Esse tipo de hibridização também pode usar cromossomos de uma espécie diferente do alvo, indicando conservação, quando o cromossomo é pintado inteiro, ou presença de rearranjo, quando isso não ocorre.

A técnica de cariótipo espectral, também conhecida pela sigla SKY, combina a FISH com bandeamentos cromossômicos. Ela permite detectar aberrações estruturais complexas e translocações escondidas, porém não é capaz de identificar mutações pequenas. Visualmente, mostra todos os pares de cromossomos de determinada espécie em cores diferentes em um único experimento de hibridização. As sondas, nessa técnica, são geradas por DOP-PCR e marcadas por PCR com biotina, digoxigenina e fluoresceína, por exemplo. Os cromossomos são contracorados com 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Com uso de um filtro especial triplo (RGB), diferentes cores de fluorocromos podem ser vistas ao mesmo tempo. A principal diferença entre uma análise de FISH convencional e uma SKY é que, na FISH convencional, apenas um alvo pode ser visualizado de cada vez e, na SKY, o uso de cinco fluorocromos distintos permite visualizar cerca de trinta alvos.

Já na CGH, o genoma completo do organismo é usado como sonda e jogado contra o DNA-alvo para detectar poliploides, indivíduos com mais de dois conjuntos cromossômicos, podendo ser triploides ou tetraploides (quando portam três ou quatro conjuntos cromossômicos, respectivamente). Para detectar células tumorosas, a CGH usa o genoma extraído do tumor marcado com um fluorocromo como sonda. Em seguida, essa sonda é hibridizada ao conjunto cromossômico completo normal em metáfase do organismo-alvo, também marcado, mas com outra cor de fluorocromo.

A CGH foi uma das primeiras técnicas de hibridização realizadas em laboratórios de citogenética oncológica e clínica. Entre as aplicações das diferentes técnicas de hibridização, está a detecção de alterações gênicas e cromossômicas estruturais, como: inversões, translocações, inversões e deleções. Além disso, também é possível traçar o perfil de alterações no número de cópias de DNA em genomas tumorais ao longo dos cromossomos. Por outro lado, aberrações cromossômicas, como monossomias, podem

ser detectadas por sondas de DNA satélite. Como exemplo, pode-se citar uma monossomia detectada com sondas de DNA satélite alfa extraídas de sequências das regiões centroméricas nos cromossomos 10 e 16 em linhagens de células cancerosas de pulmão em humanos. Além disso, as sondas de DNA satélite hibridizam com várias cópias da unidade de repetição presente nos centrômeros, em regiões heterocromáticas ou terminais dos cromossomos. São adequadas, também, para a detecção de trissomias, como a de linhagem de leucemia detectada no cromossomo 12 em humanos e outros tipos de aneuploidias e tumores sólidos.

Já a técnica de CGH *array* é capaz de rastrear genes dentro de amplicons ou regiões consistentes de deleção, possibilitando a triagem automatizada de alta resolução para desequilíbrios cromossômicos. Também é possível identificar alterações em uma única cópia de células tumorais, ou rastrear doenças durante exames pré-natais. Na CGH *array*, o DNA-alvo e o DNA tumoral são sequenciados com auxílio de sondas BACs, formando bibliotecas. As sequências-alvo são, então, marcadas com fluorocromos e mapeadas de acordo com sequências-padrão disponíveis em bancos de dados e hibridizadas ao DNA de referência.

A técnica de hibridização pode ser detectada de forma direta ou indireta. Na detecção direta, a sonda é marcada com fluorocromo, que, após a hibridização, já pode ser visualizado em microscopia de epifluorescência. Por outro lado, na detecção indireta, são usados anticorpos que se ligam ao fluorocromo após a hibridização, para que ele seja detectado (como exemplo, pode-se citar o sistema biotina-estreptoavidina). Desse modo, a marcação das sondas é feita por reagentes químicos fluorescentes não radioativos. Para detecção direta (FITC), rodamina, Cy3 e Cy5 são as moléculas marcadoras usadas com mais frequência, enquanto biotina, estreptoavidina e digoxigenina são os marcadores mais usados para métodos de detecção indireta (IHC). É importante salientar que sistemas de detecção direta são mais eficazes com sondas com mais pares de bases, como as de cromossomos inteiros. Já a detecção indireta é eficaz em sondas com poucos pares de bases, como as de microssatélites.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BI, Weimin *et al.* Rapid prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and oligonucleotide array CGH. **Prenatal diagnosis**: published in affiliation with the International Society for Prenatal Diagnosis, v. 28, n. 10, p. 943-949, 2008.

BISHOP, Ryan. Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. **Bioscience Horizons**, v. 3, n. 1, p. 85-95, 2010.

CHIRINO, Mónica G. *et al.* Chromosomal distribution of interstitial telomeric sequences as signs of evolution through chromosome fusion in six species of the giant water bugs (Hemiptera, *Belostoma*). **Ecology and Evolution**, v. 7, n. 14, p. 5227-5235, 2017.

D'AMOURS, Guylaine. Évaluation du caryotype moléculaire en tant qu'outil diagnostique chez les enfants avec déficience intellectuelle et/ou malformations congénitales. Tese – Université de Montréal, Montréal, 2013.

DORRITIE, Kathleen *et al.* Advanced molecular cytogenetics in human and mouse. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 4, n. 5, p. 663-676, 2004.

EISEL, D. *et al.* DIG application manual for filter hybridization. **Editorial Roche Diagnostics GmbH**, v. 204, 2008.

FERGUSON-SMITH, Malcolm A.; YANG, Fengtang; O'BRIEN, Patricia C. M. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. **Ilar Journal**, v. 39, n. 2-3, p. 68-76, 1998.

GALLO, Raquel Bozini *et al.* A new approach to chromosomal evolution in the giant water bug (Heteroptera: Belostomatidae). **Journal of Heredity**, v. 108, n. 2, p. 184-193, 2017.

JOHN, H. A.; BIRNSTIEL, M. L.; JONES, K. W. RNA-DNA hybrids at the cytological level. **Nature**, v. 223, n. 5206, p. 582-587, 1969.

KEARNEY, Lyndal. Molecular cytogenetics. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 14, n. 3, p. 645-668, 2001.

KIECHLE-SCHWARZ, Marion *et al.* Detection of monosomy in interphase nuclei and identification of marker chromosomes using biotinylated alpha-satellite DNA probes. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 51, n. 1, p. 23-33, 1991.

LIEHR, Thomas. Homemade locus-specific FISH probes: bacterial artificial chromosomes. *In*: LIEHR, Thomas (ed.). **Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)**. Springer: Berlin, Heidelberg, 2017. p. 101-106.

MACVILLE, Merryn *et al.* Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 141-150, 1999.

NAKAYA, K. *et al.* Identification of homozygous deletions of tumor suppressor gene FAT in oral cancer using CGH-array. **Oncogene**, v. 26, n. 36, p. 5300-5308, 2007.

SUMNER, A. T. Euchromatin and the longitudinal differentiation of chromosomes. *In*:  
SUMNER, A. T. **Chromosomes**: organization and function. [S. l.]: Blackwell Publishing,  
2003. p. 117-32.