

HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS: FUNDAMENTOS Y APLICACIONES

Mariana García¹

Se exponen en primer lugar las bases estructurales de los ácidos nucleicos como portadores de la información genética y a continuación se explican diversos aspectos de la desnaturalización del ADN y de las técnicas de hibridación, así como las aplicaciones de las sondas genéticas al estudio de los ácidos nucleicos y el diagnóstico de ciertas enfermedades hereditarias o infecciosas.

Los avances recientes en biología molecular han generado una serie de pruebas de diagnóstico y una terminología correspondiente que todavía no se ha estabilizado en nuestro idioma. La variabilidad en la traducción de términos al español es desconcertante. Por otra parte, las técnicas de ADN recombinante y de enzimas de restricción, los métodos de hibridación y el uso de sondas para la detección de agentes infecciosos ya se encuentran al alcance de muchos clínicos e investigadores. Este trabajo de revisión tiene como objeto familiarizar al lector con el vocabulario, los fundamentos y las aplicaciones prácticas de esta nueva tecnología.

ÁCIDOS NUCLEICOS

Estructura y función

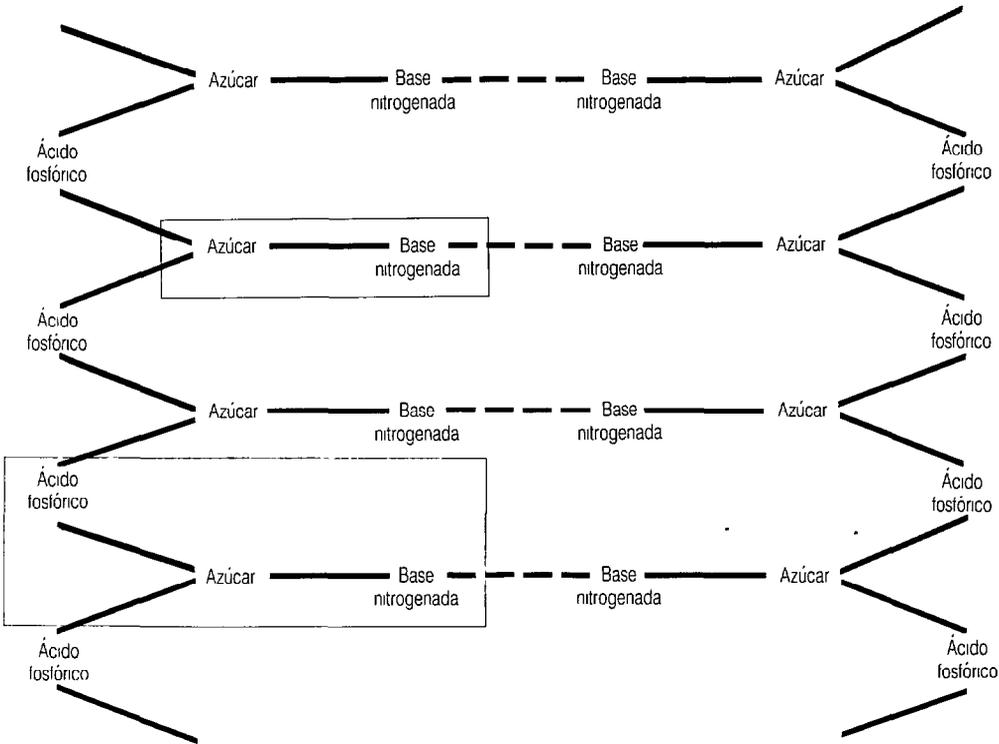
El esqueleto de una molécula de ácido nucleico está formado por una cadena de azúcares pentacarbonados alternados con moléculas de ácido fosfórico. Las moléculas

de azúcar se unen con las de ácido mediante enlaces tipo éster (1). Cada azúcar está unido a una base nitrogenada púrica o pirimidínica. La unión de una base con un azúcar se denomina *nucleósido* y la unidad formada por un nucleósido y un ácido fosfórico se denomina *nucleótido* (figura 1). El ácido desoxirribonucleico (ADN) está constituido por dos cadenas helicoidales de nucleótidos unidas entre sí por enlaces o puentes de hidrógeno localizados entre las bases nitrogenadas. El ácido ribonucleico (ARN) está formado por una sola cadena de nucleótidos.

El ADN contiene el azúcar 2'-desoxirribosa. Las bases nitrogenadas presentes en su molécula pueden pertenecer a la categoría de las purinas, (adenina [A] y guanina [G]), o a la de las pirimidinas (citosina [C] y timina [T]). Se dice que A y T son bases complementarias porque se asocian mediante la formación de enlaces o puentes de hidrógeno; con G y C ocurre lo mismo. Esta capacidad de apareamiento basada en la formación de enlaces de hidrógeno entre bases complementarias (A-T y G-C) constituye el fundamento de la transmisión de la información genética y de la síntesis de proteínas.

¹ Anteriormente: Laboratorio Conmemorativo Gorgas, Panamá, Panamá. Actualmente: Digene Diagnostics, 2301-B, Broadbirch Drive, Silver Spring, MD 20904, Estados Unidos de América.

FIGURA 1. Esquema de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico*



* Cada cadena está formada por miles de unidades denominadas nucleótidos. Cada nucleótido (recuadro grande) está formado por un azúcar, una base y una molécula de ácido fosfórico. Las subunidades formadas por un azúcar con la base adyacente se denominan nucleósidos (recuadro pequeño). Las dos cadenas se unen entre sí por enlaces de hidrógeno débiles localizados entre bases complementarias.

La información genética se encuentra en el ADN. Durante la vida de una célula, la información contenida en su ADN es transcrita en forma de ARN para uso temporal (2). Estos ARN difieren del ADN en que el azúcar que contienen es la ribosa en vez de la desoxirribosa y en que la base pirimidínica uracilo se utiliza como base complementaria de la adenina (3). Los ARN se forman mediante copia de una sola cadena del ADN.

La porción mínima de la doble cadena de ADN con capacidad funcional para dar lugar a la síntesis de una proteína es lo

que suele denominarse gen. El ADN que constituye un gen determina el ARN mensajero, que a su vez codifica la síntesis de una proteína. Estas proteínas controlan las reacciones químicas y las características estructurales de los organismos. Con la excepción de algunos virus que contienen la enzima transcriptasa inversa, la información genética va del ADN al ARN y de este a la síntesis de proteínas (4, 5).

Desnaturalización del ADN

El calentamiento del ADN en ciertos medios iónicos produce la ruptura de los enlaces de hidrógeno entre las dos cadenas de la doble hélice. En este proceso llamado desnaturalización o fusión (en inglés

melting) la doble cadena de ADN se separa en dos cadenas complementarias sencillas. Esto genera un incremento en la absorción ultravioleta y una disminución de la capacidad de rotación óptica y de la viscosidad de la solución (6).

La desnaturalización térmica del ADN es un proceso reversible. Si ha sido solo parcial, cada molécula puede renaturalizarse mediante una reacción rápida cuando disminuye la temperatura. Si el ADN se encuentra completamente desnaturalizado, las dos cadenas complementarias pueden reasociarse por un proceso lento (6).

La desnaturalización puede producirse también mediante tratamientos químicos.

HIBRIDACIÓN

El término *híbrido*, de origen latino, se usó tradicionalmente para denominar animales o vegetales generados a partir de dos individuos de distinta especie. La *hibridación* era así la producción de seres híbridos, y por extensión se denominaba híbrido a cualquier producto de elementos de distinta naturaleza.

Como se dijo anteriormente, las dos cadenas de ADN separadas por desnaturalización pueden renaturalizarse, volviendo a formar la doble cadena. Si los ácidos nucleicos que se reacomplan son de orígenes distintos como, por ejemplo, cuando una preparación contiene ADN y otra ARN, el proceso se denomina *hibridación*. La hibridación de ácidos nucleicos puede ocurrir entre dos cadenas sencillas de ADN, entre una cadena sencilla de ADN y una cadena de ARN, o entre dos cadenas de ARN (7).

Parámetros relacionados con la desnaturalización y la hibridación

La desnaturalización térmica del ADN se denomina a menudo "fusión". Se llama temperatura de fusión o T_m (*melting temperature*) a la temperatura en la que el

50% del ADN se encuentra desnaturalizado, o lo que es lo mismo, cuando la mitad del ADN se halla en forma monocatenaria y la otra mitad en forma bicatenaria (8). Los ADN de distinto origen poseen diferentes valores de T_m .

La T_m depende del contenido de bases nitrogenadas del ADN y puede resultar modificada por factores tales como la concentración de formamida y la fuerza iónica del medio (8-10).

Cuanto mayor es el contenido de pares G-C del ADN, más alta es la temperatura de transición entre la forma helicoidal natural de doble cadena y la forma monocatenaria. Esto se debe a que la unión de los pares G-C está constituida por tres puentes de hidrógeno, mientras que la de los pares A-T solo está formada por dos.

La formamida es un compuesto orgánico que reduce la T_m del ADN en 0,72 °C por cada 1% contenido en la disolución. Su efecto es debido a que debilita los puentes de hidrógeno. En la práctica, grandes concentraciones de formamida tienen un efecto similar a altas temperaturas (8).

La fuerza iónica del medio modifica grandemente la T_m , que aumenta al incrementarse la concentración de cationes de Na^+ . En la hibridación, a mayor concentración de estos cationes, mayor es la velocidad de la reacción y la estabilidad de la doble cadena que se forma. El sulfato de dextrano también se utiliza para acelerar la velocidad de hibridación.

Por ejemplo, para el virus del papiloma humano la T_m es de 61 °C en condiciones estrictas (11).

Cuando se habla de hibridación bajo condiciones "estrictas" o "no estrictas" lo que se hace es describir en conjunto parámetros como la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de formamida. Variando estos parámetros se consiguen condiciones estrictas o no estrictas, que indirectamente

tamente afectan el grado de acoplamiento entre los nucleótidos de las dos cadenas. La temperatura de incubación para la hibridación en condiciones estrictas es unos 20 °C inferior a la temperatura de fusión o Tm. En estas condiciones solo se hibridan muestras con un 85% o más de homología, es decir, de correspondencia entre sus bases (8). Sin embargo, la hibridación estricta no produce los mejores resultados cuando el propósito es estudiar el grado de homología que existe entre diferentes ácidos nucleicos. Muchas veces lo que se busca es detectar regiones de menor homología (del 60 al 80%) y es necesario hacer la hibridación a temperaturas más bajas, es decir, bajo condiciones menos estrictas. Este es el caso cuando se trata de evaluar la evolución de los diferentes ácidos nucleicos o cuando se estudian los genes que codifican la misma proteína (figura 2).

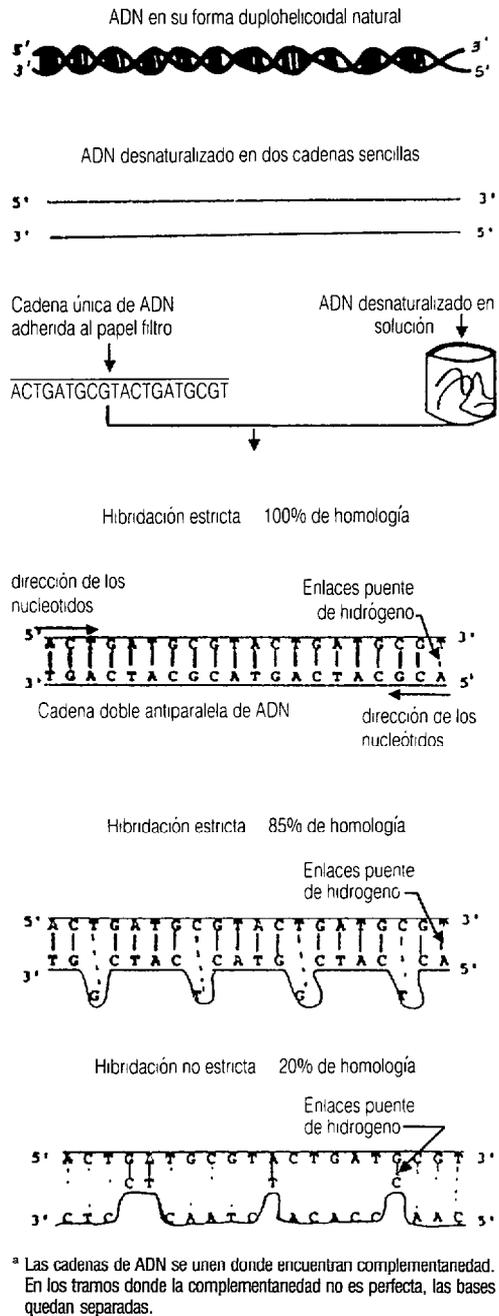
Enzimas de restricción

Actualmente se conoce una gran variedad de técnicas para el análisis de los ácidos nucleicos. En todas se utilizan de una forma u otra la hibridación y las enzimas de restricción.

Las enzimas denominadas nucleasas pueden catalizar la ruptura de la cadena de los ácidos nucleicos, es decir, la hidrólisis específica del ADN o el ARN. Las nucleasas se clasifican en exonucleasas y endonucleasas. Las exonucleasas tienen que comenzar su actividad hidrolítica por el final de una cadena; las endonucleasas pueden hidrolizar el interior de un polinucleótido en uno o varios lugares. Tanto endonucleasas como exonucleasas pueden discriminar entre cadenas sencillas y estructuras de doble cadena. Las endonucleasas poseen especificidad para una determinada secuencia de bases; las desoxirribonucleasas de restricción poseen especificidad por una base y escinden la molécula de ADN en el punto correspondiente (12).

El descubrimiento de las endonucleasas específicas de secuencia o enzimas de restricción ha permitido grandes adelantos en la biología molecular. Estas enzimas se ex-

FIGURA 2. Hibridación de ácidos nucleicos^a



^a Las cadenas de ADN se unen donde encuentran complementariedad. En los tramos donde la complementariedad no es perfecta, las bases quedan separadas.

traen de muchos microorganismos y actúan generalmente como vigilantes de la integridad genética del huésped, degradando cualquier ADN extraño al mismo.

El ácido nucleico es hidrolizado por la enzima en los lugares donde esta reconoce un determinado orden de nucleótidos en el que radica su especificidad. Los fragmentos que se produzcan dependerán de la enzima que se use y del número de veces que los nucleótidos específicos se encuentren en la cadena. Dos ADN iguales o bastante parecidos, tratados de la misma forma y con la misma enzima, deberán producir fragmentos iguales.

Técnicas de hibridación

La hibridación puede llevarse a cabo en solución (1), en soporte sólido (13) o *in situ* (14).

Las técnicas en soporte sólido más usadas son el Southern blot (15), el Northern blot (16) y el dot blot (1). Las técnicas de hibridación *in situ* (14) también se utilizan bastante.

Existen diferentes tipos de soportes sólidos como el papel de nitrocelulosa, las membranas de nailon y los filtros Whatman No 541 (1).

El papel de nitrocelulosa ha sido el soporte sólido más usado. A pesar de que es muy quebradizo y de manipulación muy delicada, es fácil separar de él la sonda radiactiva (v. más adelante) para usarlo nuevamente. Una vez añadido el material genético que se quiere investigar, es necesario incubar el soporte durante algún tiempo en la estufa para conseguir que el ADN quede fijado.

En el Southern blot (procedimiento denominado según el nombre de quien lo describió) pueden usarse membranas de nailon que son menos frágiles, utilizables varias veces y no requieren incubación en la estufa. Sin embargo, se han observado

grandes diferencias respecto a la calidad de las membranas y, ocasionalmente, la sensibilidad de la señal de hibridación no es tan buena como cuando se utiliza papel de nitrocelulosa (1).

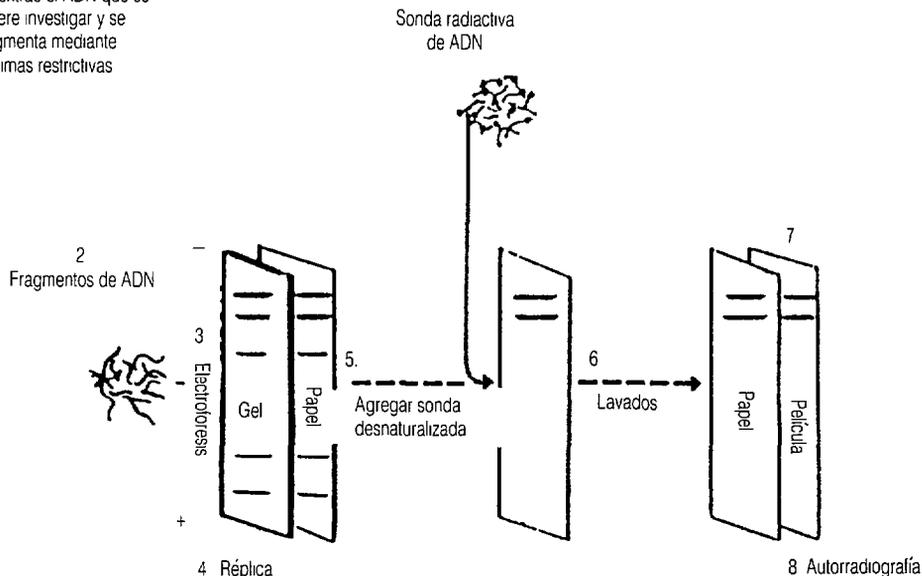
El procedimiento para el Southern y el Northern blot es el mismo; la única diferencia consiste en que en el Southern se usa ADN y en el Northern, ARN. En el Southern blot el ADN que se pretende investigar, una vez aislado se hidroliza con enzimas de restricción y los fragmentos son separados según su tamaño por electroforesis en gel de agarosa. Luego se hace una réplica del gel en papel de nitrocelulosa, al que el ADN se adhiere firmemente, y se agrega una sonda radiactiva, que se hibrida al ADN en el papel cuando encuentra una cadena complementaria. La sonda (en inglés *probe*) es un fragmento de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos conocida, tipificada y caracterizada como propia de un agente infeccioso determinado. La sonda debe tener uno de los nucleótidos marcado mediante un isótopo radiactivo como el fósforo 32 (^{32}P) (o mediante un compuesto como la biotina). Los fragmentos no hibridados se eliminan con una serie de lavados. Finalmente se expone el papel de nitrocelulosa a una película de rayos X. La película, al ser revelada, está expuesta en los lugares donde ha habido hibridación específica (15) (figura 3).

El Southern blot es una técnica de mucha sensibilidad mediante la cual se llegan a detectar cantidades de ADN inferiores a un picogramo (15). En el Southern blot se hibridan fragmentos específicos de ADN separados por electroforesis. Es la técnica que se utiliza por excelencia para caracterizar molecularmente a los virus.

El dot blot es un método de hibridación más rápido. Con esta técnica el ácido nucleico no se hidroliza mediante enzimas de restricción ni es sometido a electroforesis. La muestra celular del paciente se aplica directamente al papel filtro de nitrocelulosa. El papel recibe una serie de tratamientos y luego se procede a la hibridación (explicación detallada más adelante en el texto).

FIGURA 3. Método Southern blot^a

1 Se extrae el ADN que se quiere investigar y se fragmenta mediante enzimas restrictivas



^a El ADN que se quiere investigar se fragmenta mediante enzimas de restricción y los trozos se separan según sus tamaños por electroforesis (1-3) Luego se hace una réplica del gel en papel especial de nitrocelulosa al que el ADN se adhiere firmemente (4) Se agrega la sonda radiactiva de ADN (5). Esta se hibrida al ADN del papel si encuentra una cadena complementaria. Los fragmentos no hibridados se eliminan con una serie de lavados (6). Finalmente se expone el papel a película de rayos X (7). En las zonas donde la sonda se hibridó porque había cadenas complementarias la película aparece expuesta al ser revelada.

La hibridación *in situ* puede hacerse en preparaciones de cromosomas, secciones de tejidos congelados, especímenes citológicos y secciones de tejidos en parafina. Es similar al dot blot, ya que las sondas se agregan directamente a la muestra, cuyo ácido nucleico está inmovilizado. Los tejidos o células son previamente tratados con una proteinasa para permitir que la sonda tenga acceso al ácido nucleico previamente desnaturalizado por medio de alcaloides (1, 14).

SONDAS GENÉTICAS

Gracias a los adelantos de la biología molecular, en la actualidad se conoce la secuencia de bases o nucleótidos del material genético de muchos agentes infecciosos. Una aplicación de este conocimiento son las pruebas de diagnóstico para organismos como los

virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (17) y del papiloma humano (18) y el agente causal de la leishmaniasis cutánea (19).

En mi experiencia en el Laboratorio Conmemorativo Gorgas, estas técnicas se han aplicado sobre todo al virus del papiloma humano, específicamente a los tipos 6c, 11, 16 y 18, que son los más directamente relacionados con cáncer cervicouterino, sobre el que Arosemena *et al.* publicaron estudios preliminares realizados en prostitutas (20).

Preparación y detección de la sonda

La elucidación del código genético y el desarrollo de técnicas para la manipulación de genes permite la producción de sondas genéticas en el laboratorio. Estas son-

das genéticas son fragmentos específicos de ADN susceptibles de hibridación y generados por la acción de enzimas de restricción. Se denominan también clones subgenómicos, ya que derivan directamente del ADN genómico (1).

Otra posibilidad para generar sondas de ADN es utilizar la secuencia del ARN mensajero (ARNm). Mediante la enzima transcriptasa inversa, el ARNm, una vez aislado, es transcrito a ADN complementario (ADNc). La enzima hace copias del ADN utilizando como patrón el ARN. Luego se clona el ADNc, es decir, se obtienen múltiples copias del mismo insertándolo en el material genético de una bacteria (generalmente en un plásmido, en *Escherichia coli*) y haciendo que esta se multiplique. Generalmente se usa el plásmido recombinante PBr 322 (21).

Una última posibilidad cuando se conoce la secuencia exacta de nucleótidos es la síntesis química *in vitro* de pequeñas sondas de ADN. Estas sondas sintéticas de oligonucleótidos son muy específicas. Utilizándolas en pruebas de hibridación bajo condiciones estrictas permiten detectar mutaciones causadas por la sustitución o el apareamiento anómalo de una base (22).

Independientemente del método de hibridación que se escoja, es necesario usar una sonda, ya que esta posee una secuencia conocida de nucleótidos. La forma de saber si ha habido o no hibridación es marcando ciertos nucleótidos en la sonda. Comúnmente se utilizan como marcadores isótopos radiactivos como el fósforo 32 (en forma de α - ^{32}P -desoxicitidinotri-fosfato, [α - ^{32}P -dCTP]) (23). A pesar de su alta sensibilidad, los problemas generales asociados al uso de radioisótopos han hecho que se desarrollen otros métodos de marcaje. Enzimas como la peroxidasa o la fosfatasa alcalina pueden ser unidas químicamente a sondas sintéticas de oligonucleótidos. Las sondas así marcadas pueden detectarse con gran sensibilidad por la acción catalítica de la enzima en el sustrato apropiado (24).

La sonda puede marcarse también con biotina (vitamina H). Posteriormente a la hibridación, la preparación es tratada con un complejo avidina-enzima. Como la avidina tiene gran avidez por la unión con biotina, la sonda queda marcada con un complejo biotina-avidina-enzima cuya acción catalítica es fácil de detectar (25).

La acción enzimática muchas veces se detecta visualmente por un cambio de color (26).

De las diversas técnicas de marcaje del ADN se detalla a continuación una de las más usadas, en la que la doble cadena de ADN se marca radiactivamente por el procedimiento denominado síntesis y reparación (en inglés *nick translation*) (23) en el que se utiliza la enzima ADN polimerasa. En este método, mediante desoxirribonucleasa pancreática se hace una muesca en una de las cadenas del ADN viral. Luego la ADN polimerasa inicia la síntesis a partir de la muesca, eliminando fragmentos de la cadena vieja y sustituyéndolos con nucleótidos nuevos. La radiactividad se obtiene de un α - ^{32}P -dCTP. Como las muescas que genera la desoxirribonucleasa se distribuyen al azar, la radiactividad queda distribuida de manera bastante uniforme en ambas cadenas (figura 4).

Preparación de la muestra y métodos de hibridación en el dot blot

La muestra que contiene el ADN que ha de investigarse debe ser inmovilizada como cadena sencilla en un material inerte tal como papel filtro de nitrocelulosa. Mediante un distribuidor múltiple, conectado a una bomba de vacío, las muestras pueden ser rápidamente servidas o dispensadas directamente al papel de nitrocelulosa (figura 5). Para lisar las células de la muestra y liberar el ADN y desnaturalizarlo, se coloca el papel de nitrocelulosa sobre una bandeja junto con tres hojas de papel secante impregnadas en hidróxido de sodio (0,5 mol/L) y cloruro de sodio (1 mol/L). Luego se neutralizan con una solución de Tris-cloruro de sodio (0,5 y 3 mol/L). Para eliminar cualquier resto de proteína

FIGURA 4. Marcado del ADN por síntesis y reparación (*nick translation*). Explicación en la p. 250 del texto

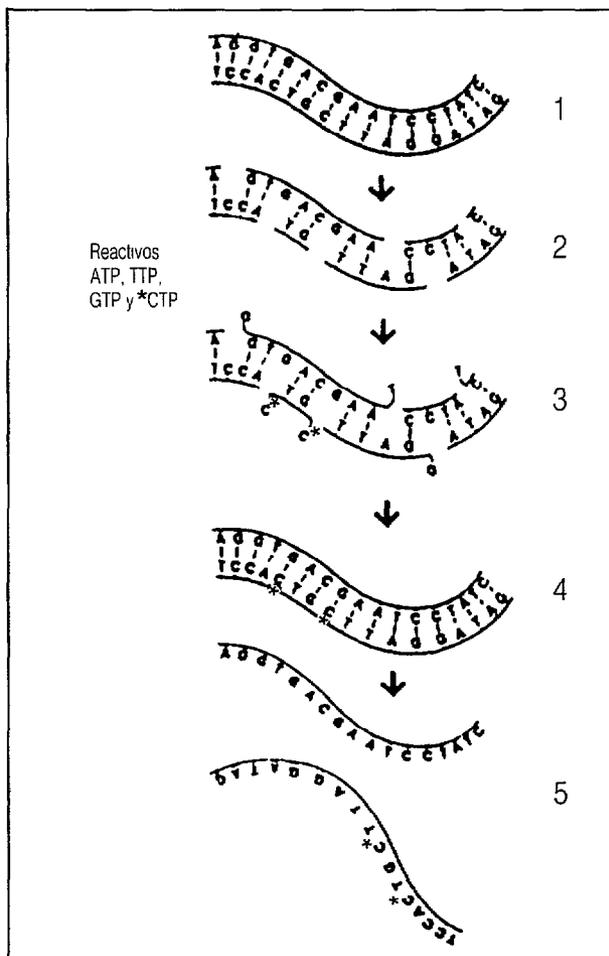
1 Sonda viral purificada

2 La desoxirribonucleasa pancreática hace muescas distribuidas al azar en la doble cadena de ADN

3 La ADN polimerasa I inicia la síntesis en las zonas de corte eliminando nucleótidos viejos y sustituyéndolos por nucleótidos nuevos

4 ADN de doble cadena marcado

5 ADN desnaturizado y marcado sonda radiactiva



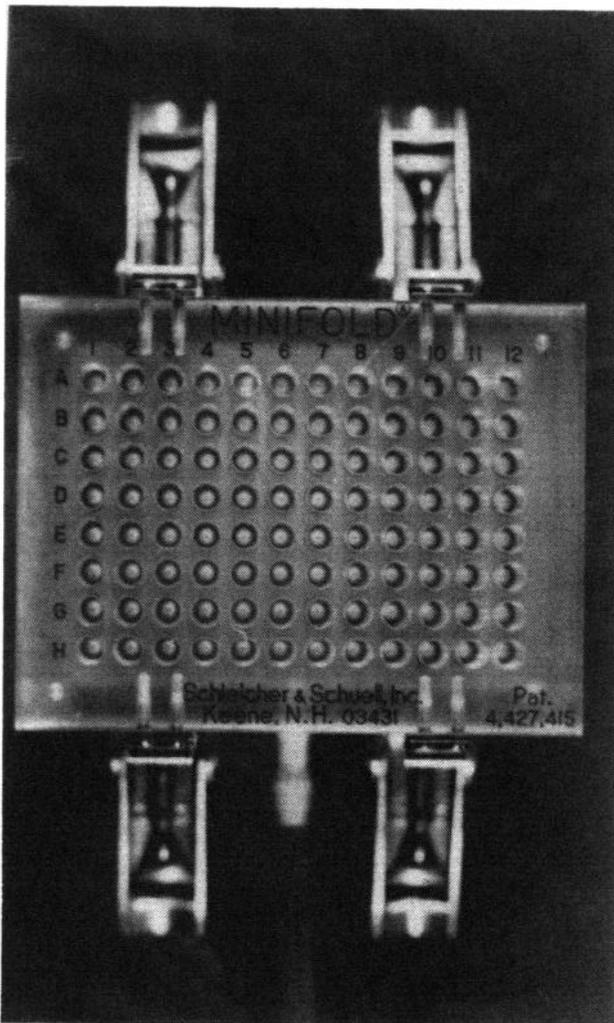
*Los asteriscos indican nucleótidos radiactivos.

se agrega primero la enzima proteinasa K y después cloroformo. El cloroformo se elimina con varios lavados en citrato-solución salina (2X SSC) y el papel queda listo para proceder a la hibridación. Es necesario desnaturizar el ADN, es decir, separar sus cadenas para que estas puedan hibridarse con el ADN de la sonda (26).

La prehibridación es un proceso de preparación de la hibridación cuyo objetivo es impedir el llamado fenómeno de fondo. Si la hibridación se hace directamente,

la sonda marcada se une específicamente al ácido nucleico complementario e, inespecíficamente, a otros ácidos nucleicos no complementarios. De esta manera, tras el lavado —que no arrastra a la sonda específica o inespecíficamente hibridada—, la exposición de la película de rayos X y el revelado de la misma, se obtiene un gran fenómeno de fondo (*background*), es decir, la aparición

FIGURA 5. Soporte múltiple Minifold^{®a}



^a El soporte se utiliza para servir o filtrar hasta 96 muestras. La filtración generalmente se hace a través de papel de nitrocelulosa y el área de filtración para cada muestra es de 0,32 cm². Este instrumento fue diseñado específicamente para la inmovilización y concentración de ADN y ARN en soluciones de gran volumen. Puede ser usado para una gran variedad de técnicas de ADN, ARN y Western blot.

de radiactividad difusa más o menos débil que puede enmascarar las zonas en las que había mayor cantidad de la sonda porque esta se había hibridado con el material genético complementario. En la prehibridación se añade ADN de otra especie, generalmente esperma de salmón, a concentraciones muy bajas, al material genético que se quiere investigar. Este ADN se hibrida inespecíficamente con todo el material genético presente en la muestra. Luego, cuando se añade la sonda, esta desplaza al ADN de salmón de

los puntos en los que hay material genético complementario, ya que su afinidad por estos es mucho mayor. Pero así se consigue que no haya hibridación inespecífica de la sonda, de forma que tras lavar, esta solo queda hibridada a los puntos en los que hay complementariedad, que van a ser los que aparezcan luego en la autorradiografía, sin fenómeno de fondo. La prehibridación se lleva a cabo durante un mínimo de dos horas y a una temperatura de 42 °C, es decir, una temperatura 20 °C inferior a la de fusión del ADN del virus del papiloma (8).

Finalmente, utilizando la técnica de autorradiografía, que consiste en la detección de radioisótopos en preparados citológicos y bioquímicos mediante la exposición a películas de revelado, se definen las muestras positivas o negativas (27) (figura 6). Las secuencias homólogas unidas a la sonda viral se detectan como manchas o bandas negras en la película de rayos X, expuesta al papel de nitrocelulosa durante varios días y luego revelada (figura 7). La lectura se puede hacer macroscópicamente con la ayuda de un negoscopio (27).

Aplicaciones de las sondas

Originalmente los métodos descritos se desarrollaron para estudiar problemas tales como la expresión y la organización de los genes. Sin embargo, la gran sensibilidad y la rapidez con la que pueden practicarse las pruebas de hibridación con sondas ha favorecido que su uso se extienda fuera del laboratorio de investigación. Sus ventajas y utilidades abarcan tanto el diagnóstico microbiológico (cuadro 1) como la detección de enfermedades congénitas (cuadro 2).

Como incluso minúsculas cantidades de ácidos nucleicos pueden ser detectadas por hibridación (28-41), la técnica resulta muy poderosa y sensible para el diagnóstico de microorganismos específicos cuyo aislamiento es imposible, como el virus del papiloma humano; o poco práctico, como el virus de la hepatitis B; o virus de difícil detección, como el VIH.

FIGURA 6. Procedimiento para efectuar la técnica de dot blot *in situ* en papel filtro de nitrocelulosa

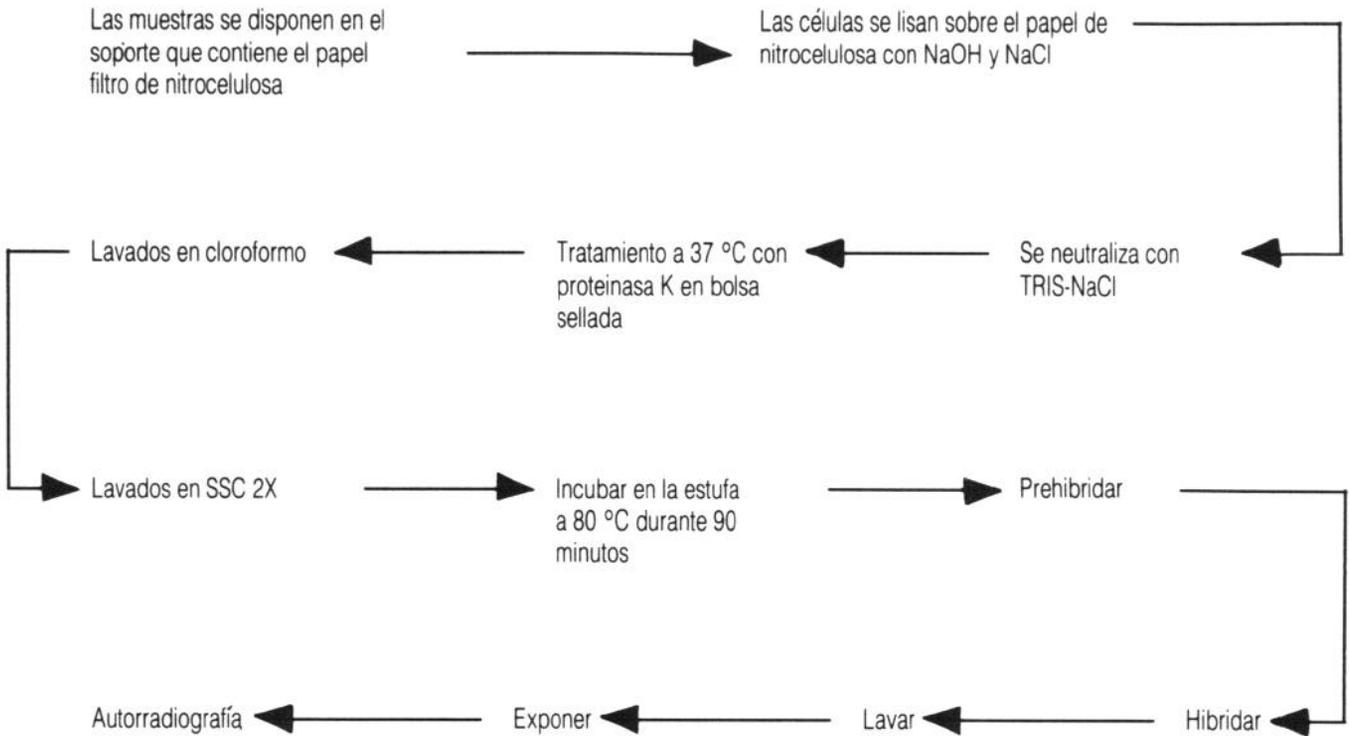
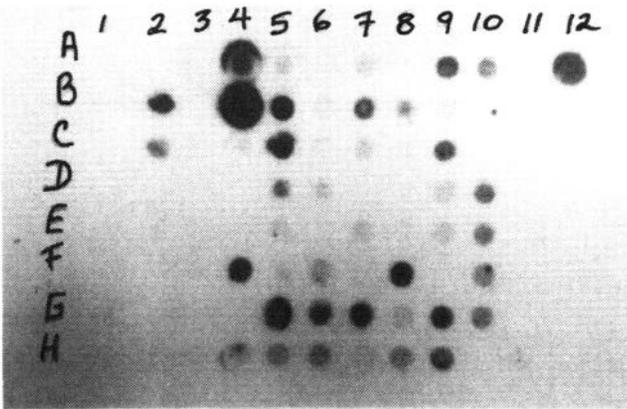


FIGURA 7. Autorradiografía obtenida mediante el método dot blot *in situ* en papel de nitrocelulosa^a



^a En las casillas formadas por las líneas A-H y las columnas 1-12 hay muestras clínicas. En la posición A12 hay un control positivo. En la posición B12 hay otro control, este negativo. Se observan muestras claramente positivas de gran intensidad de señal en las posiciones B4, B5, F8, G5, etc. No se observa ningún tipo de reacción en las posiciones A11, D1, D2, D3, etc. Todas las muestras de las columnas 1 y 11 corresponden a muestras negativas. En las posiciones H11, E8 y C4 se encuentran muestras difíciles de interpretar. A efectos de análisis se consideran negativas.

Con las actuales técnicas de hibridación se pueden detectar virosis latentes, es decir, infecciones víricas en las que no hay replicación del virus (1). En el diagnóstico de las enfermedades virales lo ideal es aislar el agente causal. Pero en casos como el del virus del papiloma humano, que no se puede cultivar en laboratorio, las nuevas técnicas de hibridación se convierten en el método estándar de diagnóstico microbiológico. Los requisitos para la obtención de la muestra clínica son mucho menos rigurosos para los estudios de ácidos nucleicos que para el aislamiento viral o los inmunoensayos. El ADN es bastante estable y puede ser detectado en la muestra mucho tiempo después de obtenida esta. En estudios epidemiológicos, mediante estas técnicas se pueden distinguir infecciones recurrentes o latentes de primoinfecciones por los virus del herpes (42), citomegalovirus (43) o varicela-zoster (44). Para ello, el ADN se trocea mediante enzimas de restricción y luego se hibridan los fragmentos. Cuando el virus está integrado en el ADN celular (infección recurrente) la hibridación que tiene lugar es diferente a la que ocurre cuando el

CUADRO 1. Microorganismos infecciosos cuyo diagnóstico microbiológico puede ser realizado mediante hibridación de sondas de ácidos nucleicos

Microorganismo	Tipo de muestra
Bacterias	
<i>Escherichia coli</i> , cepas enterotoxígenas	Agua, heces
<i>Escherichia coli</i> , cepas enteroinvasoras	Cultivos
<i>Salmonella</i>	Alimentos
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Exudados genitales o cultivos bacterianos
<i>Shigella</i>	Cultivos
<i>Campylobacter jejuni</i>	Leche, heces
<i>Campylobacter pylori</i>	Tejidos
<i>Legionella pneumoniae</i>	Esputo, tejidos, cultivos
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Esputo, tejidos, cultivos
Virus	
Varicela-zoster	Aspirado de las vesículas
Citomegalovirus	Orina, leucocitos, tejidos
Adenovirus	Mucosa y secreciones nasofaríngeas, heces
Virus de Epstein-Barr	Líneas celulares de tejidos linfáticos, células epiteliales
Rotavirus	Heces
Virus de la hepatitis B	Hígado, suero, leucocitos
Virus del miocardio	Biopsia de endomiocardio
Herpes simple	Cultivos, tejidos
Virus del papiloma humano	Biopsias de tejidos o verrugas
Enterovirus	Heces, cultivo de tejidos
Virus de la inmunodeficiencia humana	Linfocitos o tejidos
Otros	
<i>Chlamydia</i>	Tejidos, cultivos
<i>Leishmania</i>	Cultivos

CUADRO 2. Enfermedades congénitas que pueden diagnosticarse por técnicas de hibridación

Fenilcetonuria
Deficiencia de α -antitripsina
Hemofilia
Distrofia muscular de Duchenne
Fibrosis quística (mucoviscidosis)
Talasemia
Anemia falciforme
Síndrome de Lesch-Nyhan
Colagenosis

ADN vírico está en forma de episoma, es decir, no integrado en el ADN celular (primoinfección).

Las sondas también son prácticas para el diagnóstico pre y posnatal de defectos genéticos (45), para el diagnóstico de enfermedades hereditarias (40) y para la detección de otros gérmenes patógenos y virus (46).

Por medio de sondas se pueden detectar las mutaciones genéticas que causan enfermedades tales como anemia falciforme (47) y talasemia (48). Con métodos similares se han encontrado anomalías relacionadas con los genes que codifican la apolipoproteína A-1 íntimamente asociadas con las deficiencias de lipoproteínas de alta densidad que causan enfermedades coronarias prematuras e hipertrigliceridemia (49). El enanismo es

consecuencia de una sustitución en el gen que codifica la hormona de crecimiento (50).

Ya se han utilizado sondas para identificar microorganismos patógenos específicos que contienen ARN o ADN. Se pueden detectar rotavirus en muestras fecales (26), adenovirus en aspirados nasofaríngeos (51), leishmanias en lesiones cutáneas (19) y herpesvirus tipos 1 y 2 en secreciones genitales (52). Hay una gran promoción comercial de las sondas de ácidos nucleicos, que están teniendo gran aceptación. Comienzan a verse en el mercado equipos para el uso en laboratorios de investigación, por ejemplo, el "Vira Pap" para la detección del virus del papiloma humano (53). También existen sondas para citomegalovirus (54), virus Epstein-Barr (55) y hepatitis B (56). A continuación se indican algunos precios (por muestra) de los equipos de detección viral: virus del papiloma, \$US 15; citomegalovirus en cultivo celular, \$3; citomegalovirus en tejidos, \$10; virus de Epstein-Barr en tejidos, \$10; virus de la hepatitis B en tejidos, \$20.

La aparición de estas y otras sondas comerciales probablemente generará poco a poco el uso de estas técnicas para el diagnóstico de laboratorio de algunos procesos infecciosos.

AGRADECIMIENTO

Doy las gracias por su valiosa ayuda a Pauline H. Peralta, Rolando E. Sáenz y Nicanor Obaldía, que leyeron y comentaron el texto, y a William C. Reeves, Director del Laboratorio Conmemorativo Gorgas, que con sus valiosos consejos me estimuló a la realización de este trabajo. También agradezco a Edilma Cedeño su cooperación en la elaboración del manuscrito.

REFERENCIAS

- 1 Fenoglio-Preiser, C. M. y Willman, C. H. Molecular biology and the pathologist. *Arch Pathol Lab Med* 111:601-619, 1987.
- 2 Danishefsky, I. *Biochemistry for Medical Sciences*. Boston, Little, Brown, 1980. pp. 428-434.
- 3 Halkerston, I. D. K. *Biochemistry*. Media, PA, Harwal Publishing, 1984. p. 35.
- 4 Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Cuppels, D. A., Lane, L. C. y Vedaver, A. K. Semiconservative synthesis of single-stranded RNA by bacteriophage 6 RNA polymerase. *J Virol* 33:769, 1980.
- 5 Baltimore, D. Viral RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 226:1209, 1970.
- 6 Britten, R. J. y Kolune, D. E. Repeated sequences in DNA. *Science* 161:529, 1968.
- 7 Graham Purchase, H. Future applications of biotechnology in poultry. *Avian Dis* 30(1):47-59, 1986.
- 8 Meinkoth, J. y Wahl, G. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 138:267-284, 1984.
- 9 McConaughy, B. L., Laird, C. D. y McCarthy, B. J. Nucleic acid reassociation in formamide. *Biochemistry* 8:3289-3294, 1969.
- 10 Doty, P. Effect of temperature on different DNAs. *Biochem Soc Symp* (21):8, 1962.
- 11 Howley, P. M., Israel, M. A., Lae, M. F. y Martin, M. A. A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. *J Biol Chem* 254:4876-4883, 1979.
- 12 Roberts, R. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acid Res* 10:R117, 1982.
- 13 Brandsman, J. y Miller, G. Nucleic acid spot hybridization: Rapid quantitative screening of lymphoid cell lines for Epstein-Barr viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6851-6855, 1977.
- 14 McDougall, J. K. y Galloway, D. A. In situ cytological hybridization in diagnostic pathology. In: Fenoglio, C. M. y Wolff, M., eds. *Progress in Surgical Pathology*, vol. 4. Nueva York, Masson Publishing USA, 1982.
- 15 Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-517, 1975.

- 16 Thomas, P. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201-5205, 1980.
- 17 Harper, M. E., Kaplan, M. H., Marsella, L. M. et al. Concomitant infection with HTLV-I and HTLV-III in a patient with T8 lymphoproliferative disease. *N Engl J Med* 315:1073-1078, 1986.
- 18 Schneider, A., Hotz, M. y Gissmann, L. Increased prevalence of human papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int J Cancer* 40:198-201, 1987.
- 19 Wirth, D. F. y Pratt, D. M. Rapid identification of Leishmania species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6999-7003, 1982.
- 20 Arosemena, J. R., Guerrero, D. M., Caussy, D. et al. Prevalencia de infección en la endocérvix con el virus del papiloma humano en una población de prostitutas de la ciudad de Panamá. *Rev Med Panamá* 12:165-181, 1987.
- 21 Glover, D. M., ed. *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. 1. Washington, DC, IRL Press, 1985.
- 22 Steel, C. M. DNA in medicine. The tools. *Lancet* 15:908-911, 1984.
- 23 Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *J Mol Biol* 113:237-251, 1977.
- 24 Tchen, P., Fuchs, R. P. P., Sage, E., et al. Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3466-3470, 1984.
- 25 Langer-Safer, P. R., Levine, M. y Ward, D. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6633-6637, 1981.
- 26 Caussy, D., Orr, W., Daya, A. et al. Evaluation of methods for detecting human papillomavirus deoxyribonucleotide sequences in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 26:236-242, 1988.
- 27 Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- 28 Boileau, C. R., d'Hauteville, H. M. y Sansonetti, P. J. DNA hybridization technique to detect *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 20:959-961, 1984.
- 29 Echeverria, P., Seriwatana, J., Sethabutr, O. et al. DNA hybridization in the diagnosis of bacterial diarrhea. *Clin Lab Med* 5:447-461, 1985.
- 30 Edelstein, P. H. Evaluation of the DNA probe for the detection of *Legionellae* in culture. *J Clin Microbiol* 23:481-484, 1986.
- 31 Pollice, M. y Yang, H. L. Use of nonradioactive DNA probes for the detection of infectious bacteria. *Clin Lab Med* 5:463-473, 1985.
- 32 Huss, V. A. R., Festl, H. y Schleifer, K. H. Nucleic acid hybridization studies and deoxyribonucleic acid base compositions of anaerobic, gram-positive cocci. *Int J Syst Bacteriol* 34:95-101, 1984.
- 33 Barker, D. C., Gibson, L. J., Kennedy, W. P. K. et al: The potential of using recombinant DNA species specific probes for the identification of tropical Leishmania. *Parasitology* 91:5139-5174, 1986.
- 34 Rollison, D., Walker, T. K. y Simpson, A. J. G. The application of recombinant DNA technology to problems of helminth identification. *Parasitology* 91:553-571, 1986.
- 35 Anderson, A. Some clinical implications of recombinant DNA technology with emphasis on prenatal diagnosis of hemoglobinopathies. *Clin Biochem* 17:112-119, 1984.
- 36 Antonarakis, S. E., Waber, P. G., Kittur, S. D. et al. Hemophilia A: Detection of molecular defects and the carriers by DNA analysis. *N Engl J Med* 313:841-848, 1985.
- 37 Chang, J. C. y Kan, Y. W. A sensitive new prenatal test for sickle-cell anemia. *N Engl J Med* 307:30-32, 1982.
- 38 Conneally, M. P. Probe for muscular dystrophy. *Nature* 316:763-764, 1985.
- 39 Chui, D. H. K., Wong, S. C., Chung, S. W. et al. Embryonic globin chains in adults: A marker for alpha thalassemia-1 haplotype due to a 17.5 kb deletion. *N Engl J Med* 314:76-80, 1986.
- 40 Davies, K. A. y Williamson, R. Screening for genetic diseases with molecular probes. *Ann Biol Clin* 44:112-115, 1986.
- 41 Hall, J. G. Medical genetics. *JAMA* 254:2296-2298, 1985.
- 42 Kit, S., Trkula, D., Qavi, H. et al. Sequential genital infections by herpes simplex viruses types 1 and 2: Restriction nuclease analyses of viruses from recurrent infections. *Sex Transm Dis* 10:67-71, 1983.

- 43 Spector, S. A. Transmission of cytomegalovirus among infants in hospital documented by restriction endonuclease digestion analyses. *Lancet* 1:378-381, 1983.
- 44 Seidlin, M., Takiff, H. E., Smith, H. A. *et al.* Detection of varicella-zoster by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. *J Med Virol* 13:53-61, 1984.
- 45 Chervenak, F. A., Isaacson, G. y Mahoney, J. Advances in the diagnosis of fetal defects. *N Engl J Med* 315:305-308, 1986.
- 46 Flores, J., Purcell, R. H., Pérez, I. *et al.* A dot hybridization essay for detection of rotavirus. *Lancet* 1:555-558, 1983.
- 47 Waikan, Y. y Dozy, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:5631-5635, 1978.
- 48 Pirastu, M., Kan, Y. W., Cao, A. *et al.* Prenatal diagnosis of β -thalassemia. *N Engl J Med* 309:284-287, 1983.
- 49 Rees, A., Shoulders, C. C., Stocks, J. *et al.* DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-1 gene: relation to hypertriglyceridaemia. *Lancet* 1:444-446, 1983.
- 50 Phillips, J. A., Hjelle, B. L., Seeburg, P. H. *et al.* Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6372-6375, 1981.
- 51 Virtanen, M., Laaksonen, M., Soderlund, H. *et al.* Novel test for rapid viral diagnosis: Detection of adenovirus in nasopharyngeal mucus aspirates by means of nucleic-acid sandwich hybridization. *Lancet* 1:381-383, 1983.
- 52 Redfield, D. C., Richman, D. D., Albanil, S. *et al.* Detection of herpes simplex virus in clinical specimens by DNA hybridization. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1:117-128, 1983.
- 53 Vira Pap HPV DNA Detection Kit. Life Technologies, Inc., Molecular Diagnostics, P.O. Box 6009, 8717 Grovemont Circle, Gaithersburg, MD 20877, EUA.
- 54 Chou, S. y Merigan, T. C. Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N Engl J Med* 308:921-925, 1983.
- 55 Andiman, W., Gradoville, L., Heston, L. *et al.* Use of cloned probes to detect Epstein-Barr viral DNA in tissues of patients with neoplastic and lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 148:967-977, 1983.
- 56 Hino, O., Kitagawa, T., Koibe, K. *et al.* Detection of hepatitis B virus DNA in hepatocellular carcinomas in Japan. *Hepatology* 4:490-495, 1984.

SUMMARY

HYBRIDIZATION OF NUCLEIC ACIDS: BASIC PRINCIPLES AND APPLICATIONS

Following a review of the structural bases of nucleic acids as carriers of genetic information, various aspects of DNA denaturation and hybridization techniques are

explained, as well as the application of genetic probes to the study of nucleic acids and the diagnosis of certain hereditary and infectious diseases.