

Trabajos de revisión

Hibridación de ácidos nucleicos. Aplicación al diagnóstico

S. A. BARCELONA

Laboratorio de Diagnóstico por Hibridación de Ácidos Nucleicos, Agrupación de Vacunas y Medios de Diagnóstico, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en enero de 1988

INTRODUCCION

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos aumentan las posibilidades diagnósticas modernas, sobre todo en aquellas aplicaciones no cubiertas por los métodos de diagnóstico inmunoquímico.

En la presente revisión se consideran algunos aspectos principales de la hibridación de ácidos nucleicos: la reacción con participación de las cadenas nucleotídicas, las cualidades estrictas de la reacción, el procesamiento de las muestras, la obtención de las sondas diagnósticas, los tipos de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, la sensibilidad del método, y sus aplicaciones diagnósticas. Se considera que deben resolverse algunas dificultades antes de lograr la introducción del método al diagnóstico clínico de rutina.

La hibridación de ácidos nucleicos se fundamenta en la formación de una doble cadena a partir de dos secuencias nucleotídicas de simple cadena complementarias (Marmur y Doty, 1961). Una de las secuencias de simple cadena es la de la muestra que se quiere identificar, y la otra cadena está marcada para facilitar la revelación del resultado de la reacción de complementación por pareo de bases. Esta complementación, así como su estabilidad, se emplean para analizar secuencias nucleotídicas relacionadas, y también se aplican a un amplio rango de otros problemas biológicos (Nygaard y Hall, 1964; Gillespie y Spiegelman, 1965; Moseley *et al.*, 1982; Gee y Roberts, 1983; Kremsdorf *et al.*, 1983; Cheley y Anderson, 1984; Gadler *et al.*, 1984; Dobbs y Phillips, 1985; McDougall *et al.*, 1986).

La información genética para una función biológica determinada está contenida en el genoma, y cualquier fragmento nucleotídico particular de este puede ser sometido a hibridación e identificado en ausencia de productos del gen, independientemente de la actividad metabólica que él represente. El desarrollo de tecnologías de ADN recombinante, así como de síntesis química de ácidos nucleicos han permitido producir sondas con la especificidad deseada, para la hibridación en solución, sobre filtro o *in situ*.

REACCION DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

La reacción de hibridación de ácidos nucleicos depende de la colisión, al azar, de dos secuencias de simple cadena complementarias, en presencia de condiciones de fuerza iónica

y temperatura que permiten la formación de moléculas de doble cadena. El evento inicial es una reacción de nucleación por pareo de bases, seguida por un rápido proceso de cierre como lo haría un *zipper*, generando la molécula de doble cadena (Marmur y Doty, 1961, Wetmur y Davidson, 1968).

El tiempo de la reacción en solución está determinado por la concentración de las especies reactantes y por una constante de velocidad de segundo orden (Hames y Higgins, 1985). El tiempo de reacción requerido es proporcional a la longitud de las distintas secuencias (su complejidad) del ácido nucleico que participa en la reacción (Britten y Kohne, 1968; Anderson y Young, 1985; Britten y Davidson, 1985).

Es importante considerar la temperatura de fusión (T_f) y el valor de $C_0 \cdot T_f$ es la temperatura en la cual las cadenas de ácido nucleico están disociadas o desnaturalizadas a la mitad, por lo que mide la estabilidad de la doble cadena de ADN o del híbrido ADN-ARN (Britten y Davidson, 1985). El valor C_0 es el producto de la concentración inicial del ácido nucleico, en moles por litro y por segundo, y se usa para estimar el completamiento de la reacción de hibridación entre moléculas de ácido nucleico de talla conocida (Britten y Davidson, 1985).

Resulta necesario indicar que los cálculos hechos para la reacción de hibridación de ácidos nucleicos en solución no se cumplen necesariamente para la hibridación sobre filtro, aunque es probable que los cambios en las condiciones de reacción tengan un efecto cualitativo similar (Hames y Higgins, 1985; Young y Anderson, 1985). La reasociación de las secuencias de ADN puede ser monitoreada por varios métodos como son la unión a hidroxapatita, la resistencia a la digestión con nucleasa S1 y por hipercromicidad atípica (Anderson y Young, 1985). Comúnmente se usan la autorradiografía, el conteo por centelleo, así como procedimientos colorimétricos y fluorimétricos para detectar los híbridos en una reacción de hibridación (Renz y Kurz, 1984; Arrand, 1985; Syvanen, 1986).

ESTRINGENCIA

La estringencia de las condiciones de una reacción de hibridación determina la especificidad de esta. Cuando en una reacción de hibridación las condiciones escogidas solo permiten la formación de híbridos con un grado elevado de complementaridad, se dice que son estringentes, mientras que cuando las condiciones de reacción permiten la formación de híbridos a pesar de que la falta de pareo de bases es elevada, se dice que son permisivas, relajadas o de baja estringencia (Anderson y Young, 1985).

Se ha encontrado que una reacción de hibridación estringente, seguida de un lavado estringente, es lo indicado para detectar miembros muy relacionados de una familia de secuencias de ácidos nucleicos. Así, con un proceder estringente sólo se formarán los híbridos más estables, mientras que con un proceder relajado se formarán los híbridos con menor estabilidad (Beltz *et al.*, 1983).

Es posible detectar la sustitución de una sola base en una molécula de ácido nucleico empleando sondas de oligonucleótidos de 15 a 20 bases, a causa de que existe una marcada diferencia en estabilidad entre aquellos híbridos con homología total y los que muestran homología incompleta (Wallace *et al.*, 1979; Anderson y Young, 1985).

MUESTRAS

Para que sea útil al diagnóstico por hibridación, el ácido nucleico bicatenario de la muestra debe ser extraído de las células, microbios y del medio intersticial, y finalmente convertido

a la forma de simple cadena por desnaturalización a una temperatura por encima de su temperatura de fusión. Cuanto más purificado sean el ADN y el ARN de la muestra, mejores serán los resultados de la hibridación (Davis *et al.*, 1980; Rosenthal *et al.*, 1983; Linne T., 1986)*.

SONDA

Cualquier tipo de ácido nucleico, clonado o no, y el obtenido por síntesis química, pueden ser empleados como sonda, si es que puede ser marcado adecuadamente. La elección de la sonda depende de la estrategia de hibridación, de la factibilidad de encontrar una fuente de material que pueda ser usada como sonda, y del grado con que el ácido nucleico en cuestión pueda ser marcado.

Las técnicas de secuenciación, de mapeo por enzimas de restricción, y de mapeo empleando la nucleasa S1, proveen un conocimiento detallado de la organización de un fragmento particular de ácido nucleico. Esto ayuda en el clonaje del fragmento nucleotídico de interés diagnóstico que va a ser empleado como sonda (Arrand, 1985; Anderson y Young, 1985).

Existen distintas vías para obtener una sonda, como aquella en la cual se conoce la secuencia de aminoácidos del producto de un gen, y se sintetiza el ADN a partir de ella, mediante el empleo del código genético. También se pueden sintetizar secuencias de ADN a partir de ARN purificado, empleando la enzima reverso transcriptasa. Otra vía es la conocida como "caminar a lo largo del genoma" en la cual una secuencia conocida se mapea en relación con otras secuencias de la genoteca (Arrand, 1985; Simmons, 1985; Williams y Mason, 1985).

El conocimiento detallado de las secuencias de muchas proteínas ha permitido construir secuencias homólogas de ácidos nucleicos, y estas sondas de oligonucleótidos sintéticos pueden ser marcados y usados para identificar cADN, así como el gen que codifica la proteína de interés en la genoteca (Mason y Williams, 1985; Wallace, 1986).

Los ARN mensajero, ribosomal, de transferencia, y viral, también pueden ser usados como sondas. En relación con esto, los ARN transcritos obtenidos por acción de la polimerasa SP6 se muestran como excelentes sondas (Loorey *et al.*, 1984; Anderson y Young, 1985).

En nuestros días se dedican grandes esfuerzos a lograr la obtención de sustancias con cualidades cada vez mejores para marcar la sonda, sin necesidad de emplear radioisótopos, como es el caso de la utilización del sistema biotina-estreptoavidina. Este método se basa en que dichas sustancias, además de estar libres de riesgo biológico, pueden ser empleadas en concentraciones elevadas para aumentar la velocidad de la reacción de hibridación, y que además, es posible poder incorporarlas al diagnóstico clínico.

Otra ventaja de las sondas no radioactivas es que los grupos químicos introducidos en la secuencia nucleotídica pueden ser empleados no sólo para detectar secuencias específicas del ácido nucleico, sino también como marcadores de afinidad para aislar secuencias de interés. Las desventajas de estas sondas son que el proceso metodológico está compuesto por múltiples etapas, y la sensibilidad que se alcanza está por debajo de la obtenida con el empleo de radioisótopos (Arrand, 1985; Kempe *et al.*, 1985).

* Comunicación personal. Ver referencias.

TECNICAS DE HIBRIDACION DE ACIDOS NUCLEICOS

El método de hibridación de ácidos nucleicos puede ser considerado como compuesto por tres etapas: *prehibridación*, durante la cual se seleccionan las condiciones para evitar que la sonda se fije inespecíficamente; *hibridación*, durante la cual la sonda formará la doble cadena híbrida con el ácido nucleico simple cadena de la muestra; y *lavado*, para eliminar la sonda que no hibridizó. Habitualmente se incorporan a la técnica controles de ácidos nucleicos positivos y negativos de referencia, así como los controles de las muestras a identificar.

Las etapas de hibridación y de lavado dependen de parámetros distintos: la etapa de hibridación depende de la frecuencia de nucleación, mientras que el lavado depende de la estabilidad térmica (T_c) de los híbridos (Anderson y Young, 1985).

Existen distintos tipos de técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. La técnica de hibridación en solución está representada por la colección del híbrido en una columna de afinidad. La cadena de ácido nucleico muestra la forma de una doble cadena híbrida con un par de cadenas de ácidos nucleicos sonda en solución. Cada simple cadena de ácido nucleico sonda, "híbrida" con secuencias nucleotídicas vecinas del ácido nucleico muestra. Una de las sondas ha sido modificada con un ligando que permite colectar el híbrido sobre una matriz de afinidad, y la otra sonda está marcada para revelar el resultado de la hibridación (Anderson y Young, 1985; Young y Anderson, 1985; Syvanen, 1986).

La técnica de hibridación en filtro (Gillespie y Spiegelman, 1965; Hall *et al.*, 1980) consiste en fijar el ADN o ARN de simple cadena de la muestra, sobre un soporte inerte. Las secuencias fijadas quedan expuestas para "hibridizar" con la sonda de ácido nucleico marcado. Posteriormente se elimina la sonda que no reaccionó, mediante un lavado extenso.

La técnica de mancha de punto o *dot blot* (figura 1) se refiere a la hibridación sobre filtro, y se usa para la demostración semicuantitativa de la presencia o ausencia de una secuencia particular de ácido nucleico (Anderson y Young, 1985).

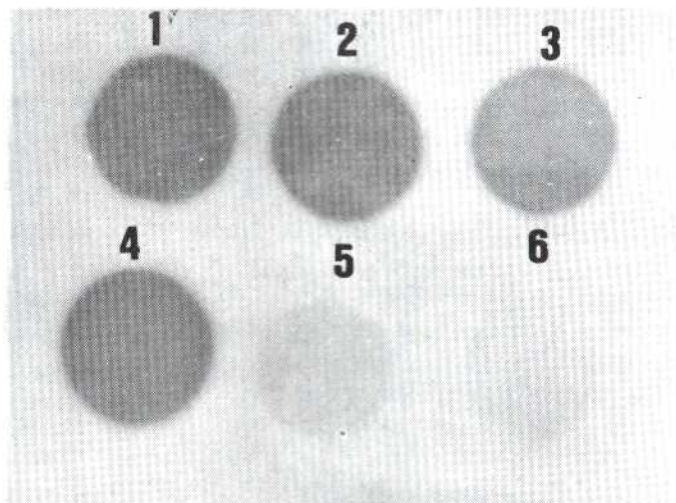


FIG. 1. Hibridación por mancha de punto (*dot blot*). Autorradiografía. Los filtros 1, 2 y 3 tienen fijados el ácido nucleico extraído de muestras de pacientes diagnosticados clínicamente como portadores de conjuntivitis causada por adenovirus. El filtro 4 tiene ADN purificado a partir de partículas de una cepa de referencia de adenovirus. El filtro 5 tiene fijado ADN de fago λ , y el filtro 6 no tiene ácido nucleico fijado al filtro.

La técnica de *southern* para ADN, o de *northern* (figura 2) para ARN, son modificaciones de la técnica de hibridación sobre filtro, y se emplean cuando se requiere información sobre la talla de fragmentos específicos del ácido nucleico (Maniatis *et al.*, 1982; Law *et al.*, 1984; Anderson y Young, 1985; Sauls y Caskey, 1985; Syvanen, 1986).

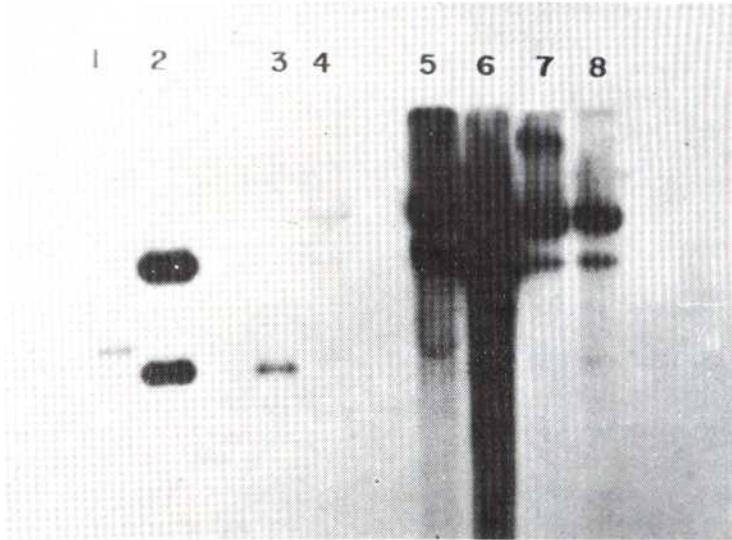


FIG. 2. Hibridación por *northern*. Autorradiografía. Los carriles 1 y 2 con ARN ribosomal de ratón (18 S) y de bacteria (16 S y 23 S). Los carriles 3 y 4 con preparaciones de ARN mensajero de células de ratón C 127 transformadas con el virus papiloma de reno. Los carriles 5, 6, 7 y 8 con preparaciones de ADN de papilomavirus humano tipo 6 digerido con enzimas de restricción.

La técnica de hibridación por emparejado o *sandwich* (figura 3) emplea dos sondas, cada una con una secuencia nucleotídica que "hibridará" con una secuencia complementaria vecina del genoma de la muestra. Una de las sondas queda fijada al filtro, a Sefacril S-500 (Langdale y Malcolm, 1985), o a polipropileno (Polsky-Cynkin *et al.*, 1985) y su función es capturar el ácido nucleico de la muestra, permitiendo analizar directamente el ácido nucleico sin purificar. La otra sonda está marcada y se incorpora a la solución de hibridación, donde se encuentra el híbrido formado por el ácido nucleico de la muestra y la sonda fijada al filtro (Parkkinen *et al.*, 1986*; Syvanen, 1986).

La hibridación *in situ* (figura 4) se emplea para identificar el ácido nucleico que se investiga directamente en las células o tejidos fijados sobre portaobjetos. El ácido nucleico sonda "hibrida" con el ADN nuclear o con el ARN citoplasmático, y después de lavados, las células o tejidos pueden ser coloreados por los métodos empleados en citología e histología, y observar el resultado de la hibridación con el microscopio de luz ordinaria (Kafatos *et al.*, 1979; Gerhard *et al.*, 1981; Robbins *et al.*, 1981; Venezky *et al.*, 1981; Brigati *et al.*, 1983; Gee y Roberts, 1983; Leary *et al.*, 1983; McAllister *et al.*, 1984; Pardue, 1985; Sauls y Caskey, 1985).

* Comunicación personal. Ver referencias.

En las técnicas de hibridación pueden emplearse filtros construidos con distintos materiales. Los filtros de nitrocelulosa fijan el ácido nucleico de una manera no covalente, y sólo fijan pobremente los fragmentos de ADN menores de 200 a 300 pares de bases. Los filtros hechos a base de nailon fijan covalentemente los fragmentos de ácido nucleico hasta de 10 pares de bases. Los filtros fabricados con papel activado químicamente se usan para seleccionar híbridos, pero es necesario emplear ácido nucleico muy purificado (Maniatis *et al.*, 1982; Mason y Williams, 1985).

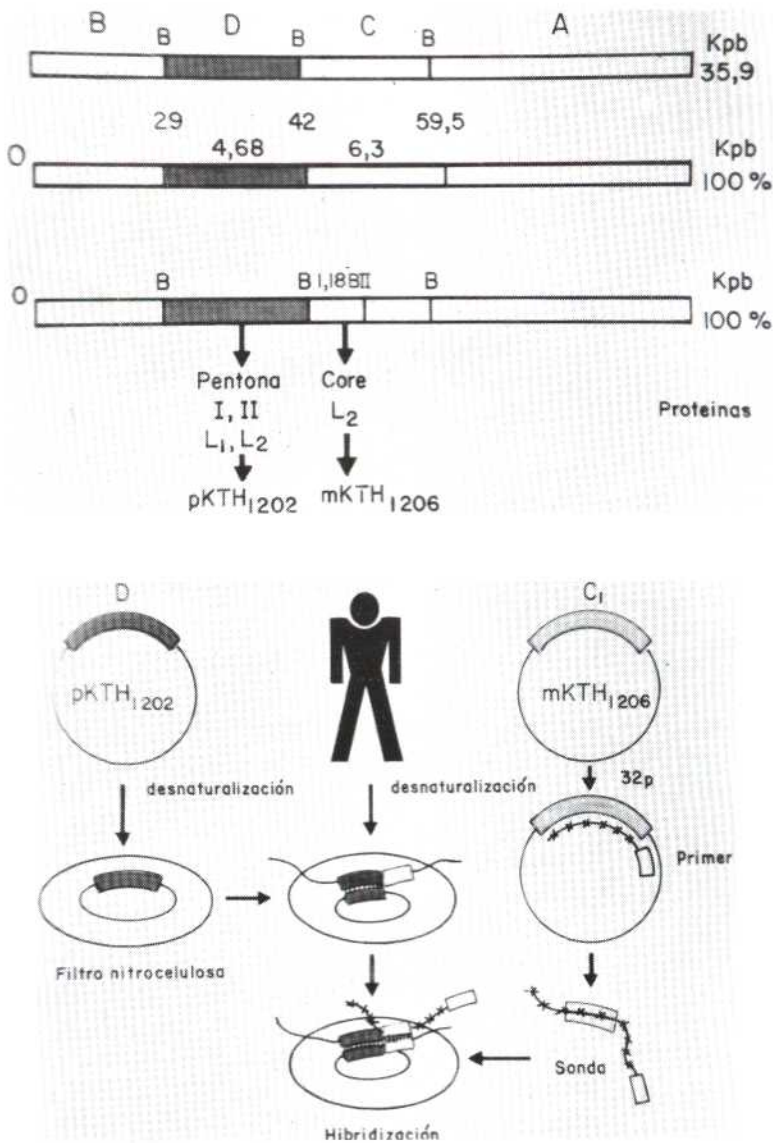


FIG. 3. a) Hibridación por emparejamiento (*sandwich*). El esquema muestra las distintas etapas del procedimiento de clonaje de segmentos nucleotídicos de interés diagnóstico del genoma de adenovirus; b) Método que se aplica para lograr la identificación del genoma viral a partir de muestras de pacientes.

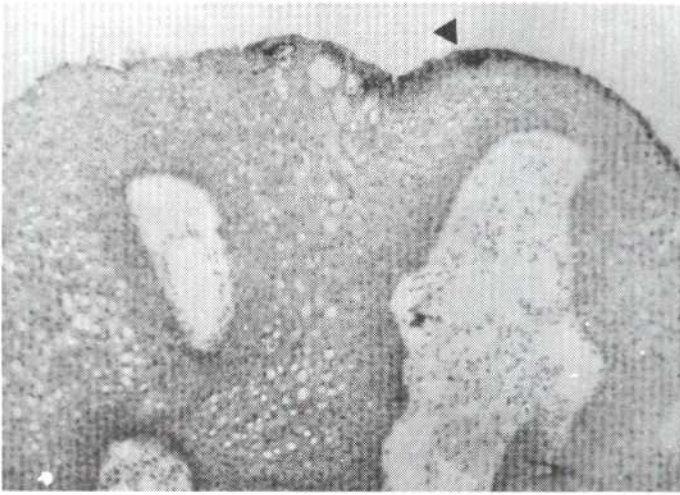


FIG. 4. Hibridación *in situ*. Identificación del genoma infectante del papilomavirus en células del cuello uterino humano.

SENSIBILIDAD DE DETECCION

El método de hibridación de ácidos nucleicos es capaz de detectar hasta fentogramos del ácido nucleico de la muestra (Ranki *et al.*, 1983; Law *et al.*, 1984; McNamara *et al.*, 1987).

Ha sido posible aumentar la sensibilidad de detección del método por distintas vías. Una de ellas se efectúa usando sondas cuyas secuencias identificadoras son complementarias a las de la secuencia nucleotídica presente en múltiples copias en las células (Franzen *et al.*, 1974). Otra posibilidad es aumentar *in vitro* el número de secuencias nucleotídicas de interés de la muestra, empleando oligonucleótidos "primers" y ADN polimerasa (Saiki *et al.*, 1985).

Para aumentar la sensibilidad de detección puede emplearse dextrán sulfato, que incrementa el signo de detección hasta 30 veces en virtud de la formación de mallas de doble cadena.

La estreptoavidina, que forma complejos con polímeros de fosfatasa alcalina, permite amplificar 10 a 50 veces el signo de detección de ADN biotinilado (Anderson y Young, 1985; Syvanen, 1986).

Los signos de detección enzimática han podido ser amplificados usando ciclos de enzima-sustrato o de reacciones en cascada, que son disparadas por el producto de la primera reacción enzimática (Self, 1985).

También se ha logrado aumentar hasta 30 veces la capacidad de detección, empleando sondas de oligonucleótidos a los que se les introduce una prolongación de oligonucleótidos marcados en el extremo 5' (Collins y Hunsaker, 1985). Otra vía para aumentar la capacidad de detección consiste en emplear marcadores con mayor actividad específica (signo detectable/unidad de masa). En este sentido, los marcadores fluorescentes podrían llegar a ser más sensibles que los enzimáticos, pues son tributarios del empleo de detectores de mayor sensibilidad. Usando la fluorescencia de tiempo de resolución retardado mediante el empleo de europio, se ha logrado aumentar hasta 10 veces la sensibilidad, comparado con un proceder enzimático (Soini y Hemmila, 1979; Soini y Kojola, 1983; Syvanen *et al.*, 1986).

Hasta el momento, la mayor sensibilidad de detección del signo de hibridación se ha obtenido empleando ^{32}P como marcador, y la autorradiografía como sistema detector. El límite más bajo de detección está en el rango de 10^4 moléculas ($2 \cdot 10^{-20}$ moles) de ácido nucleico de la muestra cuando se realiza la hibridación toda la noche y 24 horas de exposición de la película radiográfica.

Cuando se mide la radioactividad empleando contadores *beta* o *gamma*, la sensibilidad cae a un orden de magnitud más bajo. Los procedimientos de detección enzimática son alrededor de 10 veces menos sensibles que cuando se emplea la medición radioactiva directa (Syvanen, 1986).

APLICACIONES AL DIAGNOSTICO*

Se considera que el método de hibridación de ácidos nucleicos será aplicado ampliamente en el diagnóstico de agentes microbianos y parásitos, en el diagnóstico perinatal, en el diagnóstico de enfermedades endocrinas y neoplásicas, así como en la medicina forense.

Las técnicas de hibridación también resultan útiles en otros campos, como son el diagnóstico aplicado a los animales y a las plantas, para detectar bacterias ambientales y en el seguimiento de genes clonados usados en los procesos biotecnológicos (Dobbs y Phillips, 1985; Sauls y Caskey, 1985; Syvanen, 1986).

TABLA DE APLICACION AL DIAGNOSTICO

Diagnóstico de enfermedades microbianas

Virus

- Adenovirus (Ranki *et al.*, 1983; Virtanen *et al.*, 1983; Hyypia, 1985).
- Citomegalovirus (Chou y Merigan, 1983; Virtanen *et al.*, 1984; Kahan y Landers, 1985).
- Herpes virus (Peden *et al.*, 1982; Schrier *et al.*, 1985).
- Virus Hepatitis B (Gowans, E. J., 1985; Rijntjes, P. J. M. *et al.*, 1985; Barcelona *et al.*, 1986; Lee, S. D. *et al.*, 1986; Nair, P. V. *et al.*, 1986; Sherlock, S., 1986; Liaw, Y. F. *et al.*, 1987).
- Rotavirus (Flores *et al.*, 1982; Flores *et al.*, 1983).
- Virus Epstein Barr (Andiman *et al.*, 1983; Hochberg *et al.*, 1983; Lancaster *et al.*, 1983).
- Papilomavirus (Kremsdorf *et al.*, 1983; Syrjanen, K. J., 1984; Wagner *et al.*, 1984; McDougall *et al.*, 1986; Syrjanen *et al.*, 1986; Vayrynen, 1986; Ostrow *et al.*, 1987).
- Virus HTLV-I (Manzari *et al.*, 1983).
- Virus HTLV-III (Gallo *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984; Schupback *et al.*, 1984).
- Papovavirus (Grinnell *et al.*, 1983).
- Enterovirus (Hyypia *et al.*, 1984; Hyypia, 1985).
- Otros (Belak, S. y Linne, T., 1986**; Caballero y Tabares, 1986; Linne, T., 1986**).
- Bacterias, clamidias y parásitos
- E. coli* (Moseley *et al.*, 1982; Palva, 1983; Pettersson y Hyypia, 1985; Trevors, 1985).
- Neisseria* (Pettersson y Hyypia, 1985).
- Yersinia* (Hill *et al.*, 1983; Trevors, 1985).
- Salmonella* (Trevors, 1985).
- Clamidia y Micoplasma (Hyypia, 1985; Palva, 1985; Pettersson y Hyypia, 1985; Syrjanen *et al.*, 1986).
- Plasmodio, Leishmania, Legionella, Tripanosoma (Franzen *et al.*, 1984; Pettersson y Hyypia, 1985).

Diagnóstico perinatal

- Siclemia (Clang y Kan, 1982; Conner *et al.*, 1983).
- Beta-thalassemia (Efstadiatis *et al.*, 1980; Orkin *et al.*, 1981; Weatherall y Clegg, 1982; Thein *et al.*, 1985).
- Deficiencia del factor IX (hemofilia B) (Wiginton *et al.*, 1983).
- Fenilcetonuria (Robson *et al.*, 1982; Nussbaum *et al.*, 1983).

* Ver tabla.

** Comunicación personal. Ver referencias.

Alfa 1-antitripsina (Kurachi *et al.*, 1981).
 Deficiencia de Lesh-Nyhan (Brennand *et al.*, 1982; Nussbaum *et al.*, 1983).
 Hipoparatiroidismo (Simmons, 1985).
 Retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (Simmons, 1985).
 Distrofia muscular de Duchenne (Murray *et al.*, 1982).
 Enfermedad de Huntington (Gusella *et al.*, 1983; Cantor, 1984).
 Fibrosis quística (Simmons, 1985).
 Deficiencias de arginino succinato liasa (Su *et al.*, 1981).
 Deficiencias de insulina (Bell *et al.*, 1980).
 Arterioesclerosis (Chan *et al.*, 1985; Hobbs *et al.*, 1985; Buraczynska *et al.*, 1986; Huang Li-Shin *et al.*, 1986).

Enfermedades neoplásicas

Linfoma de Burkitt (Dalla-Favera *et al.*, 1982).
 Leucemia mielocítica crónica positiva al cromosoma Filadelfia (Rowley *et al.*, 1977).
 Leucemia promielocítica aguda (Rowley *et al.*, 1977; Van den Berghe *et al.*, 1979).
 Retinoblastoma (Murphree y Benedict, 1984).
 Tumor de Wilms (Fearson *et al.*, 1984; Orkin *et al.*, 1984).

Diagnóstico microbiológico

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas se ha beneficiado a partir del empleo de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Los virus infecciosos que no expresan las proteínas virales o cuyo genoma se inserta en el cromosoma celular, tienen en el método de hibridación de ácidos nucleicos la única vía para ser diagnosticados.

Otro tanto ocurre con los viroides. Genes bacterianos específicos como son los toxigénicos y los que codifican factores de patogenicidad o resistencia a antibióticos, pueden ser identificados por hibridación de ácidos nucleicos a partir de muestra clínica.

Diagnóstico de fragmentos polimórficos de restricción

El método de hibridación de ácidos nucleicos puede ser usado en el diagnóstico de enfermedades hereditarias mediante la detección de mutaciones puntuales y de deleciones génicas, así como para estudiar los fragmentos polimórficos de restricción asociados a alteraciones genéticas (Sauls y Caskey, 1985).

Los fragmentos polimórficos de restricción se producen por la digestión del genoma con una sola enzima, generando fragmentos de talla variada que son identificados por la técnica de Southern empleando una sola sonda. Estas variaciones en la talla de los fragmentos son hereditarias, y su identificación permite determinar cuáles miembros de una familia son portadores asintomáticos del gen, pudiendo extender el pronóstico al diagnóstico anterior al nacimiento en algunos casos. Este conocimiento ha sido explotado para diagnosticar numerosas hemoglobinopatías (Efstradiatis *et al.*, 1980; Weatherall y Clegg, 1982; Sauls y Caskey, 1985).

Tanto las sondas clonadas como las sintetizadas químicamente, constituyen poderosas herramientas para diagnosticar los fragmentos polimórficos de restricción. Estos resultan particularmente útiles en aquellas enfermedades en las que se carece de información acerca del gen y aun del cromosoma involucrado (Sauls y Caskey, 1985).

En los estudios de ligazón genética a los fragmentos polimórficos de restricción, se han usado sondas para genes y secuencias de función desconocida llamadas "secuencias anónimas".

Las técnicas de fragmentos polimórficos de restricción combinadas con las de hibridación cromosomal *in situ*, pueden determinar cuál cromosoma porta el fragmento que se encuentra íntimamente ligado al gen asociado a la enfermedad (Murray *et al.*, 1982; Gusella *et al.*, 1983).

Diagnóstico de enfermedades neoplásicas

Muchas enfermedades neoplásicas están asociadas a aberraciones cromosómicas, incluyendo el linfoma de Burkitt, los casos positivos al cromosoma Filadelfia de la leucemia mielocítica crónica, la leucemia promielocítica aguda, el retinoblastoma, el tumor de Wilms, y otros (Leder *et al.*, 1983; Yunis, 1983).

En otros tumores se han identificado anomalías genéticas moleculares aun cuando se desconoce alguna lesión citogenética previa. Las sondas dirigidas a identificar el virus *Epstein Barr* proveen una fuerte evidencia acerca de la asociación de este virus con los linfomas (Hochberg *et al.*, 1983).

Se ha demostrado una relación entre la infección causada por los papilomavirus y la ocurrencia de displasias del cuello uterino (Lancaster *et al.*, 1983). El virus de los linfocitos T humano tipo 1 (HTLV1) vinculado a la ocurrencia de leucemias y linfomas, es el primer retrovirus asociado convincentemente a la neoplasia maligna humana (Manzari *et al.*, 1983).

PERSPECTIVAS

Para que sea útil el empleo de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico de rutina, deben quedar resueltos los siguientes requerimientos:

Cumplir protocolos de trabajo en los que las etapas y manipulaciones sean simples, y los resultados se obtengan en horas.

Emplear sondas estables y libres de riesgo biológico.

Emplear detectores más poderosos de identificación del resultado de la hibridación.

Es evidente la necesidad de continuar realizando investigaciones que superen estas dificultades, pues los protocolos de trabajo para el empleo de sondas radioisotópicas son más simples, y la sensibilidad es mayor que cuando se emplean sondas no radioisotópicas (Pettersson y Hyypia, 1985; Syvanen, 1986).

AGRADECIMIENTOS

Expongo mi agradecimiento al licenciado Sergio Pérez y al doctor Luis Herrera, a los licenciados Alejandro Silva, Manuel Selman y Lidia I. Novoa, así como al técnico Juan C. Teruel (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba); a los doctores Marjut Ranki y Hans Soderlund (Universidad de Helsinki); a los doctores Rauno Mantyjärvi, Stina Syrjänen, Kari Syrjänen y Sinikka Parkkinen (Universidad de Kuopio, Finlandia); al doctor Hans Strander (Hospital Karolinska, Suecia), y a los doctores Ulf Pettersson, Jorge Moreno, Per Bergman y Tommy Linne (Biomedical Center, Suecia).

REFERENCIAS

- ANDERSON, M. L. M. y B. D. YOUNG (1985). "Quantitative filter hybridisation", en: *Nucleic Acid Hybridisation. A Practical Approach*, Capítulo 4: 73-111. Editado por D. Rickwood y B. D. Hames, IRL Press, USA.
- ANDIMAN, W.; L. GRADOVILLE y L. HESTON (1983). *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.
- ARRAND, J. E. (1985). "Preparation of nucleic acid probes", en *Nucleic Acid Hybridisation. A Practical Approach*. Capítulo 2: 17-45. Editores D. Rickwood y B. D. Hames, IRL Press, USA.
- BARCELONA, S.; A. GONZALEZ y S. PEREZ (1986). *Diagnosis of viral hybridization*. *Journal of Interferon Research*. **6**: 121.
- BELAK, S.; A. VIRTAMEN; J. ZABIELSKI; M. RUSVAL; G. BERENCSI y U. PETTERSSON (1986). *Subtypes of bovine adenovirus type 2 exhibit major differences in region E3*. *Virology* **153**: 262-271.

- BELAK, S. y T. LINNE (1986). *Rapid detection of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus infection of pigs by direct filter hybridization of nasal and tonsillar specimens*. Comunicación personal.
- BELL, G. I.; R. I. PICTET y W. J. RUTTER (1980). *Sequence of the human insulin gene*. *Nature (London)* **248**: 26-32.
- BELTZ, G. A.; K. A. JACOBS; T. H. EICKBUSH; P. T. CHERBAS y F. C. KAFATOS (1983). *Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods*. *Methods Enzymol.* **100**: 266-285.
- BRIGATI, D. J.; D. MYERSON y J. J. LEARY (1983). *Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes*. *Virology* **126**: 32-50.
- BRENNAND J.; A. C. CHINAULT y D. S. KONECKI (1982). *Cloned cDNA sequences of the HPRT gene from a mouse neuroblastoma cell line found to have amplified genomic sequences*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* **79**: 1950-1954.
- BRITTEN, R. J. y D. E. KOHNE (1968). *Repeated sequences in DNA*. *Science* **161**: 52.
- BRITTEN, R. J. y E. H. DAVIDSON (1985). "Hybridisation strategy", *Nucleic Acid Hybridisation. A Practical Approach*. Capítulo 1: 3-15. Editores D. Rickwood y B. D. Hames. IRL Press, USA.
- BRYAN, R. N. y L. J. ARNOLD (1984). "Detection of HBV by hybridization with modified oligonucleotides containing radioactive and non-radioactive reporter groups", en *Fourth Annual Congress for Recombinant DNA Research. Abstract*, p. 124.
- BURACZYNSKA, M.; J. HANZLIK y M. GROZYWA (1986). *Apo-I related DNA polymorphism in humans with coronary heart disease*. *Hum. Genet.* **74**: 165-167.
- CABALLERO, R. G. y E. TABARES (1986). *Application of pRPEL2 plasmid to detect African Swine Fever Virus by DNA-DNA hybridization*. *Archives of Virology* **87**: 119-125.
- CANTOR, C. R. (1984). *Charting the path to the Huntington's gene*. *Nature (London)* **308**: 404.
- CHAN, L.; P. VAN TUINEN; D. H. LEDBETTER; S. P. DAIGER; A. M. J. GOTTO y S. H. CHEN (1985). *The human apolipoprotein B-100 gene: a highly polymorphic gene that is related to the short arm of chromosome 2*. *Biochemical and Biophysical Communications.* **133**: 248-255.
- CHANG, J. C. y Y. W. KAN (1982). *A sensitive new prenatal test for sickle cell anemia*. *N. Engl. J. Med.* **307**: 30-32.
- CHELEY, S. y R. ANDERSON (1984). *A reproducible microanalytical method for the detection of specific RNA sequences by dot-blot hybridization*. *Analytical Biochemistry* **137**: 15-19.
- CHOU, S. Y. T. C. MERIGAN (1983). *Rapid detection and quantitation of human cytomegalovirus in urine through DNA hybridization*. *N. Engl. J. Med.* **308**: 921-925.
- CHU, B. C. F.; F. R. KRAMER y L. E. ORGEL (1986). *Synthesis of an amplifiable reporter RNA for bioassays*. *Nucleic Acid Research* **14**: 5591-5603.
- COLLINS, M. L. y W. R. HUNSAKER (1985). *Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: a direct comparison with 5' end-labelled oligonucleotide probes and nick-translated plasmid probes*. *Anal. Biochem.* **151**: 211-224.
- CONNOR, B. J.; A. A. REYES y C. MORIN (1983). *Detection of sickle cell beta (s)-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides*. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **80**: 278-282.
- DALLA-FAVERA, R.; M. BREGNI y J. ERIKSON (1982). *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 7824-7827.
- DAVIS, R. W.; T. M. CAMERON; T. P. ST. JOHN; S. SCHERER y R. A. PADGETT (1980). *Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis*. *Methods in Enzymology* **65**: 404-411.
- DOBS, A. S.; y J. A. PHILLIPS III (1985). *Diagnosis of human endocrine disorders using recombinant DNA techniques*. *Clinics in Endocrinology and Metabolism.* **14**: 273-295.
- DUNN, D. C.; C. D. BLAIR; D. C. WARD y B. J. BEATY (1986). *Detection of bovine herpes virus-specific nucleic acids by in situ hybridization with biotinylated DNA probes*. *Am. J. Vet. Res.* **47**: 740-746.
- EFSTRADIATIS, A.; J. W. POSAKONY y T. MANIATIS (1980). *The structure and evolution of the human beta-globin gene family*. *Cell* **21**: 653.
- FEARSON, E. R.; B. VOLGELESTEIN y A. P. FEINBERG (1984). *Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilms' tumour*. *Nature (London)* **309**: 176-178.
- FLORES, J.; H. B. GREENBERG; J. MYSLINSKI; A. R. KALICA; R. G. WYATT; A. Z. KAPIKIAN y R. M. CHANOCK (1982). *Use of transcription for genotyping rotavirus reassortants*. *Virology* **121**: 288-295.
- FLORES, J.; E. BOEGGEMAN; R. H. PURCELL; M. SEREMO; I. PEREZ; L. WHITE; R. G. WYATT; R. M. CHANOCK y A. Z. KAPIKIAN (1983). *A dot hybridization assay for detection of rotavirus*. *The Lancet*, **12**: 555-558.
- FRANZEN, L.; G. WESTIN; R. SHABO, L. ASLUND; H. PERLMAN; T. PERSSON; H. WIGZELL y U. PETTERSSON (1984). *Analysis of clinical specimens by hybridization with probe containing repetitive DNA from Plasmodium falciparum*. *The Lancet* **10**: 525-527.
- GADLER, H.; A. LARSSON y E. SOLVER (1984). *Nucleic acid hybridization, a method to determine effects of antiviral compounds on herpes simplex virus type 1 DNA synthesis*. *Antiviral Research.* **4**: 63-70.

- GALLO, R. C.; S. Z. SALAHUDDIN y M. POPOVIC (1984). *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science 224: 500-503.
- GEE, C. E. y J. L. ROBERTS (1983). *Laboratory Methods*. In situ hybridization histochemistry. A technique for the study of gene expression in single cells. DNA 2: 157-163.
- GERHARD, D.S.; E. S. KAWASAKI; F. C. BANCROFT y P. SZABO (1981). *Localization of a unique gene by direct hybridization in situ*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3755-3759.
- GILLESPIE, D. y S. SPIEGELMAN (1965). *A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane*. J. Mol. Biol. 12: 829-842.
- GISSMAN, L.; V. DIEHL; H. J. SCHULTZ-COULON y H. ZUR HAUSEN (1982). *Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma*. J. Virol. 44: 393-400.
- GRINNELL, B. W.; B. L. PADGETT y D. L. WALKER (1983). *Distinction of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy*. J. Infect. Dis. 149: 669-675.
- GOWANS, E. J. (1985). *Relationship between HBeAg and HBV DNA in patients with acute and persistent hepatitis B infection*. The Medical Journal of Australia 145: 439-441.
- GUSELLA, J. F.; N. S. WEXLER y P. M. CONNEALLY (1983). *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. Nature (London) 306: 234-238.
- HAMES, B. D. y S. J. HIGGINS (1985). "Preparation of nucleic acid probes," en: *Nucleic Acid Hybridisation. A Practical Approach*, p. 17. Editores D. Rickwood y B. D. Hames. IRL Press, USA.
- HALL, B. D.; L. HAARR y K. KLEPPE (1980). *Development of the nitrocellulose filter technique for RNA-DNA hybridization*. TIBS, oct. pp. 254-255.
- HILL, W. E.; W. L. PAYNE y C. C. G. AULISIO (1983). *Detection and enumeration of virulent Yersinia enterocolitica in food by DNA colony hybridization*. Applied and Environmental Microbiology. 46: 636-641.
- HOCHBERG, F. H.; G. MILLER y R. T. SCHOOLEY (1983). *Central nervous system lymphoma related to Epstein-Barr virus*. N. Engl. J. Med. 309: 746-748.
- HOBBS, H. H.; M. A. LEHRMAN; T. YAMAMOTO y D. W. RUSSELL (1985). *Polymorphism and evaluation of the Alu sequences in the human low density lipoprotein receptor gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7651-7655.
- HUANG, LI-SHIN; D. A. MILLER, G. A. BRUNS y J. L. BRESBOW (1986). *Mapping of the human APOB gene to the chromosome 2p and demonstration of a two allele restriction fragment length polymorphism*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 644-648.
- HYYPÄ, T.; P. STALHANDSKE; R. VAINIONPÄÄ y U. PETTERSSON (1984). *Detection of enteroviruses by spot hybridization*. J. Clin. Microbiol. 19: 436-438.
- HYYPÄ, T. (1985). *Detection of viruses and Chlamydia trachomatis in clinical specimens by nucleic acid spot hybridization*. Academic dissertation. Medical Faculty. University of Turku, pp. 4-38.
- KAHAN, B. D. y T. A. LANDERS (1985). *Rapid detection of cytomegalovirus infection using DNA probe*. Transplantation Proceedings. XVII: 989-992.
- KAFATOS, F. C.; C. WELDON-JONES y A. EFSTRATIADIS (1979). *Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure*. NAR 7: 1541-1552.
- KEMPE, T.; W. I. SUNDQUIST; F. CHOW y S. L. HU (1985). *Chemical and enzymatic biotin-labeling of oligonucleotides*. Nucleic Acids Res. 13: 45-57.
- KREMSDORF, D.; S. JABLONSKA; M. FARRE y G. ORTH (1983). *Human papillomavirus associated with epidermodysplasia verruciformis. II. Molecular cloning and biochemical characterization of human papillomavirus 3a, 8, 10, and 12 genomes*. J. Virol. 48: 340-351.
- KURACHI, K.; T. CHANDRA y S. J. F. DEGEN (1981). *Cloning and sequence of cDNA coding for alpha 1-antitrypsin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6826-6830.
- LANCASTER, W. D.; R. J. KURMAN y L. E. SANZ (1983). *Human papillomavirus: detection of viral DNA sequences and evidence for molecular heterogeneity in metaplasias and dysplasias of the uterine cervix*. Intervirology 20: 202-212.
- LANGDALE, J. A. y A. D. B. MALCOLM (1985). *A rapid method of gene detection using DNA bound to sephacryl*. Gene 36: 201-210.
- LAW, D. J.; P. M. FROSSARD y D. L. RUCKNAGEL (1984). *Highly sensitive and rapid gene mapping using miniaturized blot hybridization: application to prenatal diagnosis*. Gene 28: 153-158.
- LEARY, J.; D. J. BRIGATI y D. C. WARD (1983). *Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNAs immobilized on nitrocellulose: Bio-blots*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4045-4049.
- LEDER P.; J. BATTEY y G. LENDIR (1983). *Translocations among antibody genes in human cancer*. Science 222: 765-771.
- LEE, S. D.; K. J. LO; Y. T. TSAI; H. Y. WANG; L. P. TING y M. J. TONG (1982). *Prevention of maternal-infant hepatitis B virus transmission by immunization. The role of serum hepatitis B virus DNAs*. Hepatology 6: 369-373.

- POLSKY-CYNKIN, R.; G. H. PARSONS; L. ALLERDT; G. LANDES; G. DAVIS y A. RASHTCHIAN (1985). *Use of DNA immobilized on plastic and agarose supports to detect DNA by sandwich hybridization.* Clin. Chem. 31: 1438-1443.
- POPOVIC, M.; M. G. SARNGADHARAN; E. REED y R. C. GALLO (1984). *Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.* Science 224: 497-500.
- RANKI, M.; A. PALVA; M. VIRTANEN; M. LAAKSONEN; H. SODERLUND (1983). *Sandwich hybridization as a conventional method for the detection of nucleic acids in crude samples.* Gene 21: 77-85.
- RANKI, M.; M. VIRTANEN; A. PALVA; M. LAAKSONEN; R. PATTERSSON; L. KAARIAINEN; P. HALONEN y H. SODERLUND (1983). *Nucleic acid hybridization in adenovirus diagnosis.* Current Topics in Microbiology and Immunology 140: 307-319.
- RENZ, M. y C. KURZ (1984). *A colorimetric method for DNA hybridization.* Nucleic Acids Res. 12: 3435-3444.
- RIJNTJES, P. J. M.; Th. J. M. VAN DITZHUIJSEN; A. M. VAN LOON; U. J. G. M. VAN HAELST; F. B. BRONKHORST y S. H. YAP (1985). *Hepatitis B virus DNA detected in formalin-fixed liver specimens and its relation to serologic markers and histopathologic features in chronic liver diseases.* A. J. P. 120: 411-418.
- ROBINS, D. M.; S. RIPLEY; A. S. HENDERSON y R. AXEL (1981). *Transforming DNA integrates into the host chromosome.* Cell 23: 29-39.
- ROBSON, K. J. H.; T. CHANDRA; R. T. A. MacGILLIVRAY; S. L. C. WOO (1982). *Polysome immunoprecipitation of phenylalanine hydroxylase mRNA from rat liver and cloning of its cDNA.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4701-4705.
- ROSENTHAL, L. J.; D. B. CRUTCHFIELD; P. J. PANITZ; D. J. CLANTON (1983). *Isolation of human cytomegalovirus DNA from infected cells.* Intervirology 19: 113-120.
- ROWLEY, J. D.; H. M. GOLOMB y C. DOUGHERTY (1977). *15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia.* Lancet i: 549-550.
- RUTH, J. L. (1984). "Chemical synthesis of non-radioactively-labelled DNA hybridization probes." *Fourth Annual Congress for Recombinant DNAs Research. Abstract*, p. 123.
- SAIKI, R. K.; S. SCHARF; F. FALOONA; K. B. MULLIS; G. T. HORN; H. A. ERLICH y N. ARNHEIM (1985). *Enzymatic amplification of beta-globin genome sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 230: 1350-1354.
- SARNGADHARAN, M. G.; M. POPOVIC; L. BRUCH (1984). *Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS.* Science 224: 506-509.
- SAULS, C. D. y T. CASKEY (1985). *Applications of recombinant DNA to pathologic diagnosis.* Clin. Chem. 31/6: 804-811.
- SCHNEIDER, A.; H. KRAUS; R. SCHUHMANN y L. GISSMAN (1985). *Papillomavirus infections of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs.* Int. J. Cancer 35: 443-448.
- SCHRIER, R. D.; J. A. NELSON y M. B. A. OLDSTONE (1985). *Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection.* Science 230: 1048-1050.
- SCHUPBACH, J.; M. POPOVIC; R. GILDEN (1984). *Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS.* Science 224: 513-506.
- SCHUPBACH, J.; M. G. SARNGADHARAN y R. C. GALLO (1984). *Antigens on HTLV-infected cells recognized by leukemia and AIDS sera are related to HTLV viral glycoprotein.* Science 224: 607-610.
- SELF, C. H. (1985). *Enzyme-amplification - a general method applied to provide an immunoassisted assay for placental alkaline phosphatase.* J. Immunol. Meth. 76: 389-393.
- SHERLOCH, S. (1986). *Viral hepatitis.* Digestive diseases and sciences. 31: 122S-132S.
- SIMMONS, K. (1985). *Diagnostic medicine gains from DNA probes.* JAMA 253: 16-18.
- SOINI, E. y I. HEMMILA (1979). *Fluoroimmunoassay: present status and key problems.* Clin. Chem. 25: 353-361.
- SOINI, E. y H. KOJOLA (1983). *Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - a new generation of nonisotopic immunoassays.* Clin. Chem. 29: 65-68.
- STALHANDSKE, P. (1986). *Application of gene technology in medical virology: development of new diagnostic methods and basic studies of the human pathogen coxsackievirus B3.* Acta Universitatis Upsaliensis 61: 1-80.
- SU, T. S.; H. GO. BOCK; W. E. O'BRIEN y A. L. BEAUDET (1981). *Cloning of cDNA for argininosuccinate synthetase mRNA and study of enzyme overproduction in a human cell line.* J. Biol. Chem. 256: 11326-11331.
- SYRJANEN, K. J. (1984). *Genital papillomavirus infections in the human. Infections in reproductive health.* Vol II. Uncommon Infections: an Special Topic. pp. 155-173. Editores L. G. Keith; G. S. Berger y D. A. Edelman, MTP Press Ltd., USA.
- SYRJANEN, K.; R. MANTYJARVI; M. VARYNEN; S. PARKKINEN; H. HOLOPAINEN; S. SYRJANEN; S. SAARIKOSKI y O. CASTREN (1986). *Coexistent chlamydial infections related to natural history of human papillomavirus lesions in uterine cervix.* Genitourin Med. 62: 345-351.

- SYRJANEN, S.; K. SYRJANEN; R. MANTYJARVI; S. PARKKINEN; M. VAYRYNEN; S. SAARIKOSKI Y O. CASTREN (1986). *Human papillomavirus (HPV) DNA sequences demonstrated by in situ DNA hybridization in serial paraffin-embedded cervical biopsies*. Arch. Bynecol. 239: 39-48.
- SYVANEN, A. C. (1986). *Nucleic acid hybridization: from research tool to routine diagnostic method*. Review Article. Medical Virology 64: 1-12.
- SYVANEN, A. C.; P. TCHEN; M. RANKI; H. SODERLUND (1986). *Time-resolved fluorometry: a sensitive method to quantify DNA-hybrids*. Nucleic Acids Res. 14: 1017-1028.
- THEIN, S. L.; J. S. WAINSCOAT; J. M. OLD; M. SAMPIETRO; G. FIORELLI y R. B. WALLACE (1985). *Feasibility of prenatal diagnosis of beta-thalassaemia with synthetic DNA probes in two Mediterranean populations*. The Lancet. August 17: 345-347.
- TREVORS, J. T. (1985). *DNA probes for the detection of specific genes in bacteria isolated from the environment*. Trends in Biotechnology 3: 291-293.
- VAYRYNEN, M. (1986). *Natural history of cervical HPV infections. Colposcopic assessment and biological considerations*. Original Reports. Publications of the University of Kuopio, pp. 1-69.
- VAN DEN BERGHE, H.; A. LOUWAGIE y A. BROECKAERT-VAN ORSHOVEN (1979). *Chromosomal abnormalities in acute promyelocytic leukemia*. Cancer 43: 558-562.
- VIRTANEN, M.; A. PALVA; M. LAAKSONEN; P. HALONEN; H. SODERLUND y M. RANKI (1983). *Novel test for rapid viral diagnosis: detection of adenovirus in nasopharyngeal mucus aspirates by means of nucleic acid sandwich hybridization*. The Lancet. Feb. 19: 381-383.
- VIRTANEN, M.; A. C. SYVANEN; J. ORAN; H. SODERLUND y M. RANKI (1984). *Cytomegalovirus in urine: detection of viral DNA by sandwich hybridization*. J. Clin. Microbiol. 20: 1083-1088.
- WAGNER, D.; H. IKENBERG; N. BOEHM y L. GISSMAN (1984). *Identification of human papillomavirus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization*. Obstetrics & Gynecology 64: 767-772.
- WALLACE, R. B.; J. SHAFFER; R. F. MURPHY; J. BONNER; T. HIROSE y K. ITAKURA (1979). *Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to OX 174 DNA: the effect of single base pair mismatch*. Nucleic Acids Res. 6: 3543-3557.
- WALLACE, R. B. (1986). *Use of oligonucleotides for diagnostic purposes*. Preparatory Committee on the Establishment of the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. Workshop on Biotechnology and Industrial Commodities, pp. 1-5, Trieste, Italy.
- WEATHERALL, D. J. y J. B. CLEGG (1982). *Thalassemia revisited*. Cell 29: 7-9.
- WETMUR, J. G. y N. DAVIDSON (1968). *Kinetics of renaturation of DNA*. J. Mol. Biol. 31: 349-370.
- WIGINTON, D. A.; G. S. ADRIAN y R. L. FRIEDMAN (1983). *Cloning of human adenosine deaminase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7481-7485.
- WILLIAMS, J. G. y P. J. MASON (1985). "Hybridization in the analysis of RNA", en: *Nucleic Acid Hybridization. A Practical Approach*, Capítulo 6: 139-160. Editado por D. Rickwood y B. D. Hames. IRL Press, USA.
- YOUNG, B. D. y M. L. M. ANDERSON (1985). "Qualitative analysis of solution hybridisation", en: *Nucleic Acid Hybridisation. A Practical Approach*. Chapter 3: 47-71. Editado por D. Rickwood y B. D. Hames. IRL Press, USA.
- YUNIS, J. J. (1983). *The chromosomal basis of human neoplasia*. Science 221: 227-236.