

Patología molecular

Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomopatológico

M.E. Leonart, R. Sánchez, P. Martín-Duque y S. Ramón y Cajal

Departamento de Anatomía Patológica, Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

TÉCNICAS DE HIBRIDACIÓN MOLECULAR

Las técnicas de hibridación molecular se basan en el estudio de secuencias específicas del DNA o RNA, tanto para su identificación como para su eventual cuantificación. Para realizarlas se parte de sondas que son secuencias de DNA o de RNA, complementarias a aquellas que se quieren detectar. La hibridación o acoplamiento de la secuencia génica diana y la sonda complementaria se puede reconocer con métodos radiactivos y colorimétricos. En general, se utilizan sondas previamente marcadas con sustancias radiactivas o fluorescentes.

Las técnicas más utilizadas son la hibridación por disolución, la hibridación por filtración y la hibridación *in situ* y sus variantes. Existen otras técnicas nuevas de hibridación, como la hibridación genómica comparativa, que en un futuro pueden servir para la posible caracterización de secuencias desconocidas implicadas en diferentes patologías.

– La hibridación por disolución se utiliza para evaluar la asociación de una molécula de un ácido nucleico en la formación de dobles cadenas de DNA, DNA-RNA o doble RNA. Esta técnica es muy sensible, pero sólo sirve para cuantificar el contenido de un ácido nucleico específico.

– La hibridación por filtración consiste en la desnaturalización del DNA o RNA, inmovilizándolo en un soporte inerte como la nitrocelulosa, para hibridarlo posteriormente con una sonda marcada y así facilitar su detección. Estas técnicas se conocen con los nombres de *Southern blot* y *Northern blot*, y sirven para analizar las cadenas de DNA y RNA, respectivamente.

– La técnica de hibridación *in situ* consiste en utilizar una sonda marcada de DNA o RNA y unirla al DNA o al RNA de una preparación citológica o histológica. Recientemente se ha optimizado la técnica de hibridación *in situ* usando fluorescencia, lo que permite detectar alteraciones puntuales y anomalías cromosómicas tanto en interfase como en metafase, tras hacer crecer previamente las células *in vitro*. Con la caracterización del cariotipo y los rasgos morfológicos de los cromosomas se pueden detectar anomalías en los mismos y numerosas translocaciones (1, 2) (Tablas 1 y 2).

Hibridación *in situ* (HIS)

La hibridación *in situ* es un método clásico y básico que combina las técnicas de biología molecular con los análisis

Tabla 1. Ventajas y desventajas de las técnicas de hibridación.

	Ventajas	Inconvenientes
HIS/FISH	Localización de la sonda en la célula o en el tejido Utilización en muestras preservadas en parafina Uso de marcado radiactivo o con digoxigenina Permite simultanear el estudio citológico y genético de las lesiones	Resultados variables según la fijación del tejido Utilización de radiactividad en algunas sondas El FISH como técnica de inmunofluorescencia no permite ver en ocasiones la integridad tisular y en su contexto patológico
HGC	Permite estudiar las alteraciones groseras en el DNA, tanto amplificaciones como deleciones Los resultados de las imágenes con análisis digital muestran una elevada precisión en la identificación de genes diana en carcinogénesis	No permite el estudio citológico y genético de las lesiones No es aplicable a RNA

histológicos y citológicos. La hibridación *in situ* o citológica consiste en desnaturalizar el DNA cromosómico por calor (95 °C) y posteriormente añadir una solución que contiene la sonda con el DNA o RNA marcado, que hibridará con sus secuencias complementarias. El marcado de las sondas se puede hacer por radiactividad con P³², S³⁵ o I¹²⁵ y posteriormente detectarse por autorradiografía. El marcado por biotina o digoxigenina se visualiza mediante una reacción colorimétrica. Con esta técnica se pueden ver al microscopio los fragmentos de DNA o de RNA dentro del contexto histológico (3, 4).

Esta técnica puede mejorar los resultados de métodos clásicos de patología, por ejemplo en infecciones por papilomavirus humano (HPV). En estos casos, el DNA viral está presente en aproximadamente unas 20 copias por célula, pero con escasa proteína de la cápside, que es lo que detecta la inmunohistoquímica. Sin embargo, la hibridación *in situ* da una señal mucho mayor a la que se detecta con el uso de anticuerpos.

La hibridación *in situ* se utiliza en patología tumoral y en el estudio de infecciones (5), por ejemplo en neoplasias endocrinas, en neuroblastomas con sobreexpresión de *N-myc*, *bcl-2* en linfomas foliculares, *erb-2* en cáncer de

mama, o presencia de virus o genomas virales como HPV, EBV (virus de Epstein-Barr), citomegalovirus, etc. (5) (Fig. 1).

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

En la hibridación *in situ* con fluorescencia se utilizan sondas específicas para determinados cromosomas o secuencias de ellos. Al igual que en el caso anterior, la técnica consiste en desnaturalizar el DNA con calor, incubar las muestras con formamida y tampón salino para mantener las cadenas desnaturalizadas e hibridarlas posteriormente con sondas específicas de determinados fragmentos de DNA que se quieren estudiar. Si la sonda no estaba marcada con fluorescencia se añade un intermediario que haga de puente, marcado con una sustancia fluorescente que a su vez reconozca a la sonda (2).

La FISH pone de manifiesto las alteraciones genéticas, a la vez que permite la visualización de las células en el contexto histológico. Este método se puede utilizar tanto para cromosomas en metafase como en interfase. Si se

Tabla 2. Aplicación de las técnicas de hibridación.

HIS	FISH	HGC
Neoplasias endocrinas	Detección de virus	Comparación de muestras normales y tumorales
Detección de virus	Detección de anomalías de muestras prenatales	Análisis comparativo de diferentes variantes en la población
Estudio de alteraciones oncogénicas	Alteraciones oncogénicas (aneuploidías, translocaciones, etc.) Monitorización de tejidos procedentes de trasplantes	

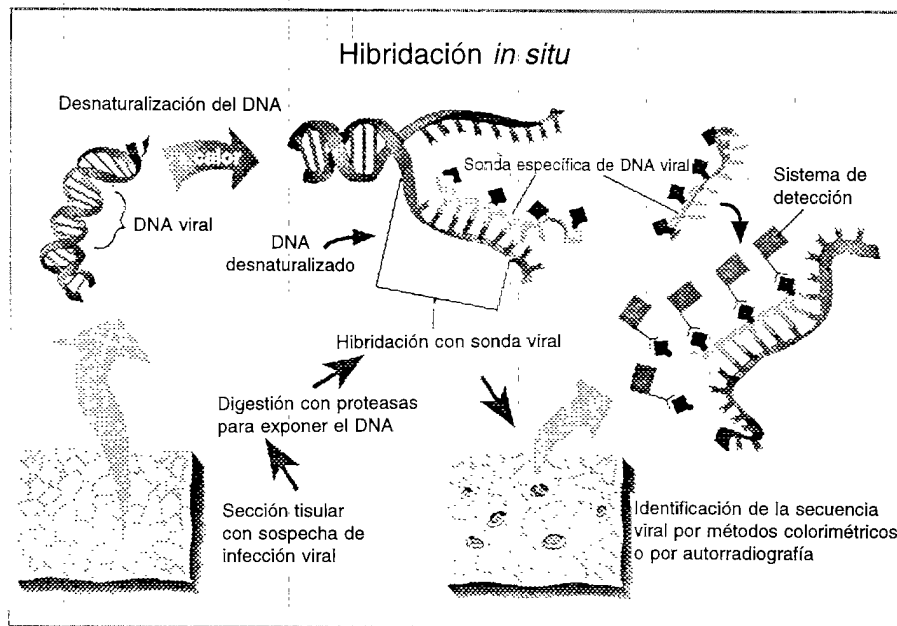


Figura 1. Esquema representativo del mecanismo molecular de la hibridación *in situ*: se desnaturaliza el DNA de la sección tisular a analizar y se hibrida con una sonda específica, en este caso frente a un DNA viral. La sonda se une a un sistema de detección (métodos colorimétricos o autorradiografía) para observar la localización del virus en la sección tisular analizada (esquema tomado del libro *Anatomía patológica* de F.J. Pardo).

desean estudiar pequeñas translocaciones cromosómicas, con sondas completas de un determinado cromosoma, la técnica tiene que efectuarse a partir de células en metafase donde los cromosomas están separados. De este modo es posible hacer un cariotipo e identificar el punto de la translocación.

La FISH tiene muchas aplicaciones: en carcinomas (6), en la leucemia mieloide t(9:22), en tumores sólidos como los de ovario (alteraciones en el cromosoma 12). También se pueden detectar amplificaciones de oncogenes, como el *neu* en el cáncer de mama o de próstata (7).

Es importante su aplicación en las muestras prenatales para la identificación de anomalías cromosómicas, como la del síndrome de Down.

Las limitaciones de la FISH vienen dadas por las condiciones de la hibridación y las derivadas de la preservación del tejido (6-8).

Asimismo, para la detección en metafase es preciso cultivar las células en placas, lo que dificulta bastante el proceso e impide su tipificación en muchas ocasiones.

Hibridación genómica comparativa (HGC)

La finalidad de esta técnica radica en la evaluación del número total de aberraciones del genoma de la muestra a

analizar (9). Se introdujo para obtener información grosera, sobre ganancias (amplificaciones) y pérdidas (deleciones) de DNA de tumores sólidos. Está basada en la capacidad del DNA para hibridar con secuencias homólogas. El método radica en una hibridación diferencial entre el DNA normal y el tumoral sobre células normales. Se utiliza en el estudio del cáncer de mama y de pulmón, además de extenderse en la actualidad a diversos tipos de tumores (10).

Con la HGC se detectan diferencias cuantitativas del grado de hibridación de cada DNA empleado. Dado que las células diana de la hibridación y el DNA control son normales, todas las diferencias al comparar la hibridación control con la de la muestra tumoral se deben a anomalías presentes en el DNA del tumor.

Como el análisis final de estas muestras es cuantitativo, es necesario valorarlo con un análisis digital de imágenes. Uno de los grandes retos actuales es discernir entre las pequeñas diferencias visibles, prácticamente inexistentes debido a la precisión del *software*.

Southern blot

Esta técnica se basa en tratar el DNA con enzimas de restricción y separar los fragmentos con electroforesis en un gel de agarosa. Para su realización se parte de DNA aisla-

do del tejido en las mejores condiciones posibles. El DNA, tras cortarlo con enzimas de restricción, se desnaturaliza para obtener fragmentos de cadena sencilla que se transfieren del gel de agarosa a un filtro de nitrocelulosa sobre el cual quedan inmovilizados. Esta transferencia es necesaria para que pueda realizarse la reacción de hibridación. El DNA queda atrapado en la nitrocelulosa y es entonces cuando se puede hibridar con la sonda radiactiva o colorimétrica. Cada secuencia complementaria da lugar a una banda marcada que adquiere una posición determinada por el tamaño del fragmento del DNA. La reacción se puede detectar por autorradiografía, ya que las sondas se pueden marcar radiactivamente (11) (Figs. 2 y 3).

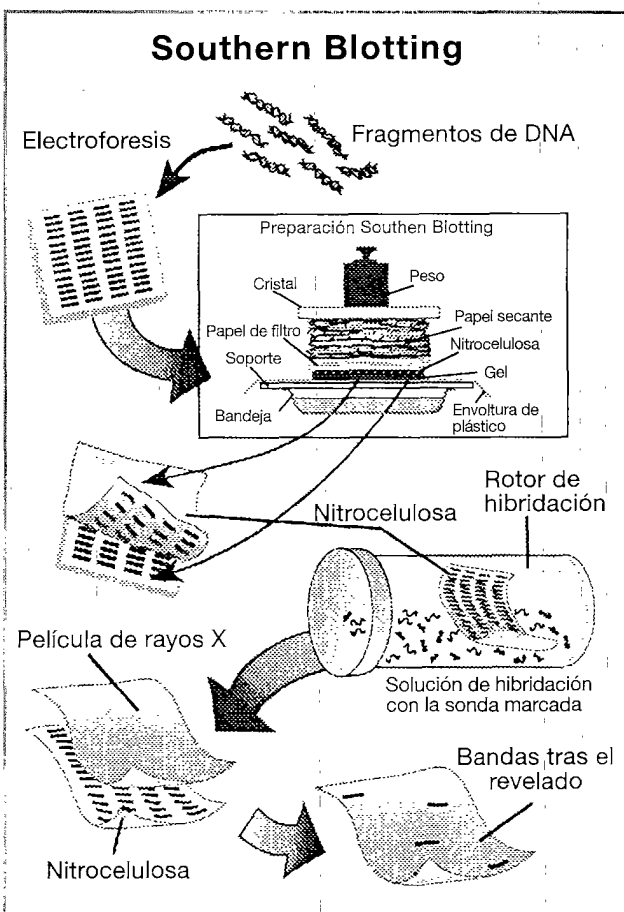


Figura 2. Esquema representativo del mecanismo molecular del *Southern blot* (o *blotting*). Los fragmentos de DNA cortados por enzimas de restricción se separan por electroforesis y se transfieren a un papel de filtro que posteriormente se somete a una solución de hibridación con la sonda marcada. El resultado de la transferencia en la nitrocelulosa se impresiona en una película de rayos X (esquema tomado del libro *Anatomía patológica* de F.J. Pardo).

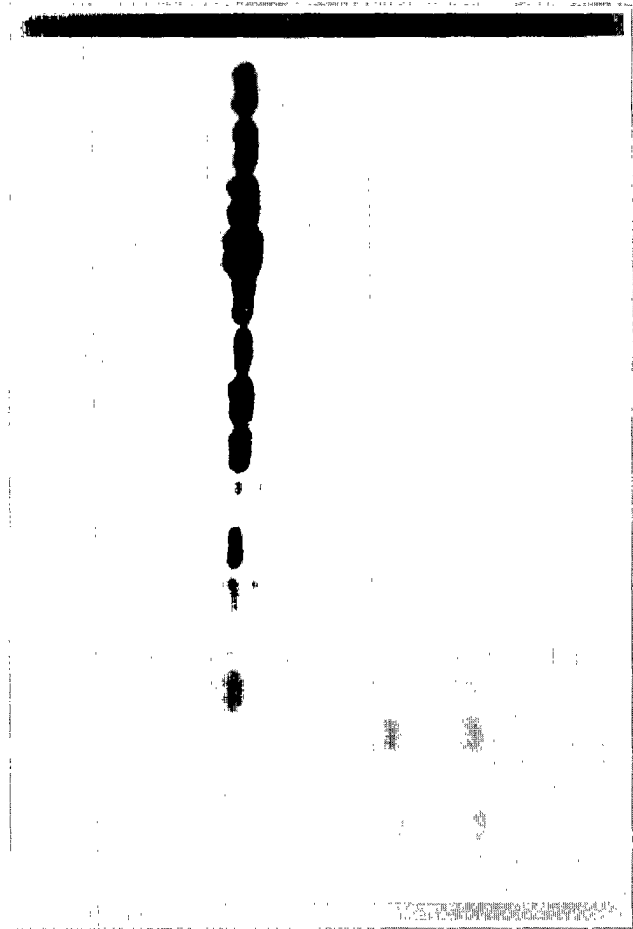


Figura 3. Imagen resultante de un *Southern blot*. La banda más intensa corresponde al reordenamiento del gen de las inmunoglobulinas con la sonda JH.

Esta técnica se utiliza en reordenamientos de procesos linfoproliferativos para determinar clonalidad a partir de los genes de las inmunoglobulinas en los linfomas B o de los receptores T en los linfomas T.

Northern blot

La técnica descrita para el *Southern blot* aplicada a RNA se denomina *Northern blot*. En este caso, para transferir RNA desde el gel de agarosa a un medio adecuado para la hibridación es necesario realizar algunas modificaciones, pero el fundamento del método es el mismo.

El hecho de que el RNA se degrade fácilmente es una limitación que obliga a que todas las manipulaciones haya que hacerlas de forma rápida y evitando el contacto de la muestra con ARNasas (por ejemplo, las ARNasas presentes en las manos). Con esta técnica se detecta amplificación de expresión génica, y es parcialmente cuantitativa.

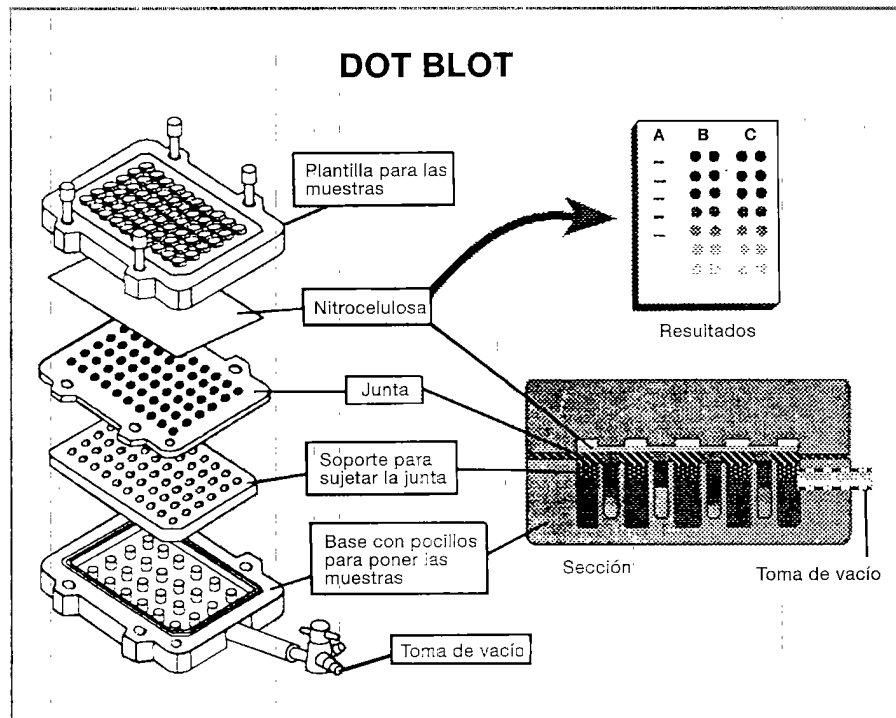


Figura 4. Esquema representativo del proceso de *Dot blotting*. El ADN se transfiere al filtro o papel y luego se adhiere gracias a la acción del vacío que aprovecha un adaptador.

Dot blotting

Otra variante de las técnicas de hibridación es el *Dot blotting*. Tiene la ventaja de que la transferencia del DNA al filtro o papel es muy eficiente por la acción de unos adaptadores, que mediante la acción del vacío facilitan dicha transferencia y adhesión al filtro (Fig. 4). Por otra parte, permite ensayar rápidamente muchas secuencias clonadas por su homología con una sonda radiactiva. Los DNA clonados a probar se colocan uno al lado del otro sobre un filtro que se hibrida con una sonda de RNA marcada radiactivamente y que corresponde a la secuencia problema. Si la secuencia está representada en un clon particular, la mancha que indica ese clon se pone de manifiesto con la autoradiografía (11).

CLONACIÓN DE DNA

Esta técnica consiste en separar una secuencia del genoma para introducirla en un fago o en un plásmido (Fig. 5). Enzimas bacterianas o enzimas de restricción (actualmente unas 200) rompen el DNA por lugares específicos dando lugar a unos fragmentos cortados en sus dos extremos. Estas enzimas cortan la cadena de DNA de forma simétrica

o asimétrica. Tras la rotura de las hebras, los extremos 5' y 3' rotos son complementarios entre sí. En esta complementariedad está la base de la técnica del DNA recombinante, ya que permite ligar el DNA a plásmidos, cósmidos o virus donde luego es posible integrar una determinada secuencia de DNA (12).

El método general de clonación sigue las siguientes etapas:

- 1) Preparación del vector, con una determinada enzima de restricción.
- 2) Preparación del DNA a clonar, usando la misma enzima de restricción.
- 3) Ligadura del vector y del DNA a clonar mediante una ligasa.
- 4) Transformación a una cepa bacteriana para que ésta produzca masivamente el producto químico.

Los plásmidos son vectores que se multiplican en las bacterias y expresan sus genes en ellas (13). Estos vectores tienen capacidad para integrar DNA exógeno hasta 100 kb. Para clonar grandes fragmentos de DNA se usan los cromosomas artificiales de una levadura (YAC) (14). En los YAC es posible clonar fragmentos de DNA 100 veces mayores que en los plásmidos.

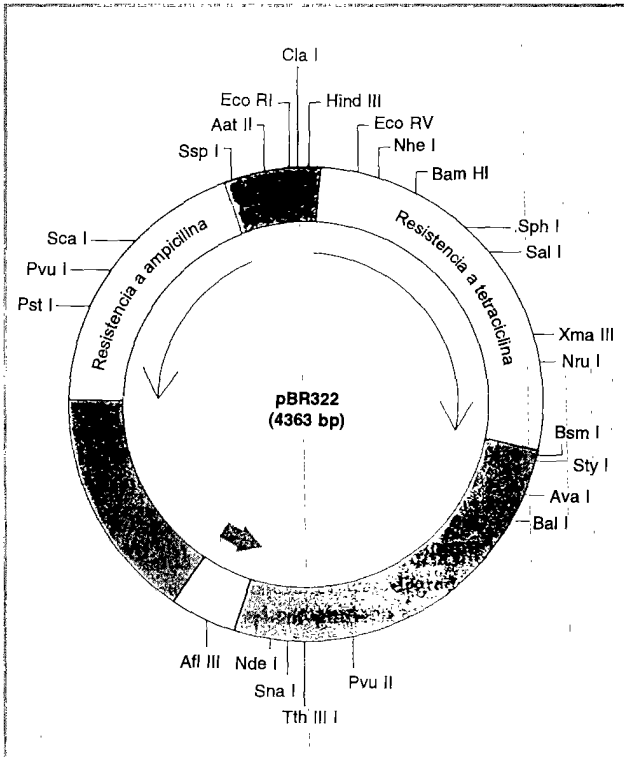


Figura 5. Estructura molecular del plásmido pBR322 que muestra los sitios de corte reconocidos por diversas enzimas de restricción. Las flechas finas indican la dirección de la transcripción de los genes de resistencia a ampicilina y a tetraciclina. La flecha gruesa indica la dirección de la replicación del DNA.

Entre las aplicaciones de la clonación en los YAC cabe destacar la posibilidad de estudiar genomas completos, elementos estructurales de los cromosomas, la expresión génica, la preparación de vectores lanzadera inespecíficos y el análisis comparativo de regiones cromosómicas completas de distintas especies.

La técnica del DNA recombinante también tiene aplicaciones industriales, como en la producción de proteínas humanas, hormonas de importancia médica como la insulina, la somatostatina, vacunas virales, etc. (15).

TÉCNICAS PARA CARACTERIZAR LA MUTACIÓN: SECUENCIACIÓN

Por secuenciación se entiende la identificación de la secuencia de las bases (nucleótidos) de una determinada región genómica. Es fundamental para corroborar la mutación que se haya podido detectar con PCR-SSCP, DGGE, ASO, etc. (16, 17).

Existen dos formas de secuenciar un producto de PCR: secuenciación directa y secuenciación indirecta.

De forma directa se secuencia el producto de PCR, una vez amplificado y purificado, sin necesidad de clonarlo.

Tras la amplificación por PCR existen una mezcla compleja de varios elementos, entre los que destacan el producto amplificado, cierto número de productos inespecíficos de amplificación que incluyen a los dímeros de oligonucleótidos, y por último sales, deoxinucleótido (dNTP), primers y *Taq*-polimerasa (18).

La purificación puede realizarse con fenol-cloroformo, mediante columnas que eliminan el exceso de oligonucleótidos o a través de geles de agarosa de bajo punto de fusión donde se corta la banda deseada para extraer el DNA con fenol y *shocks* térmicos. Esto mismo puede realizarse mediante el uso de *kits* comerciales.

Una vez obtenida la cadena molde, si el DNA es monocatenario ya se puede iniciar el protocolo de secuenciación; si es bicatenario hay que desnaturalizarlo, bien por calor o con álcali.

La forma indirecta se realiza tras la clonación del producto amplificado y su posterior secuenciación.

Secuenciación clásica: métodos enzimático y químico

Método enzimático

El método enzimático o método de los dideoxidos fue descrito en 1977 por Sanger (19), y consiste en sintetizar la cadena complementaria al DNA que se quiere secuenciar, en unas condiciones en las cuales se pueda detener su crecimiento de un modo controlado y en posiciones específicas. Se requiere un DNA molde de cadena simple al que se le une un oligonucleótido. La síntesis a partir del iniciador se realiza añadiendo a la mezcla de ensayo el fragmento mayor (Klenow) de la DNA polimerasa y los cuatro deoxinucleótidos trifosfato precursores, uno de ellos marcado radiactivamente para detectar así por autorradiografía los productos de la reacción. Para detener la síntesis de la cadena en cada uno de los cuatro nucleótidos diferentes se añade a la mezcla de reacción ddNTP (dideoxinucleótidos), que por faltarles el hidroxilo en posición 3' no pueden unirse a ningún otro dNTP.

Para secuenciar un fragmento de DNA se realizan cuatro reacciones independientes, añadiendo a cada una de ellas un ddNTP diferente. En las cadenas en crecimiento compiten dNTP y ddNTP con la misma probabilidad para cualquiera de las posiciones, de modo que en el resultado de la reacción habrá numerosas cadenas de diferentes ta-

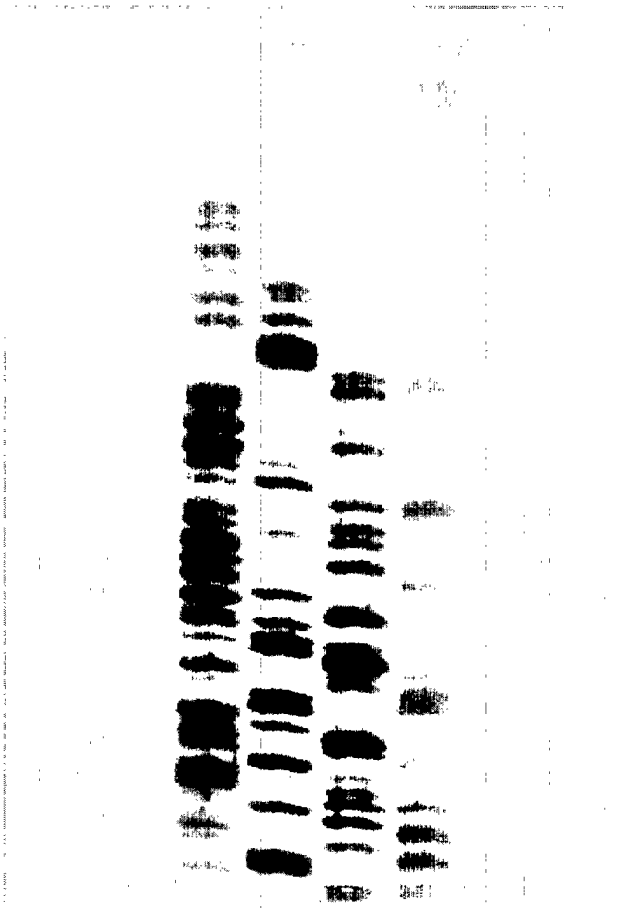


Figura 6. Imagen del resultado de la secuenciación manual por radiactividad de un fragmento de DNA. Cada uno de los cuatro carriles representa de izquierda a derecha las bases A, C, G y T. La lectura de la secuencia es de abajo hacia arriba.

maños y con variantes de dNTP y ddNTP de todas las clases (Fig. 6).

En general, el método de elección es la clonación del fragmento de DNA de cadena simple en el bacteriófago M13 o en el plásmido pUC.

M13 es un fago filamentosos que en su forma replicativa contiene DNA de cadena doble. Su interés como vector de secuenciación reside en el hecho de ser continuamente excretado por las células bacterianas durante la infección, en forma de virus de cadena simple. Así, para obtener DNA monocatenario del fragmento a secuenciar hay que clonarlo en M13, infectar células huésped adecuadas y purificar el DNA de los fagos excretados al medio de crecimiento.

Método químico

El método químico fue descrito por Maxam y Gilbert en 1977 (20), y se basa en la utilización de una serie de reac-

tivos químicos que modifican específicamente las bases púricas y pirimidínicas del DNA mediante cuatro reacciones diferentes. Es posible romper la cadena de DNA de un modo selectivo en cada una de las posiciones ocupadas por las cuatro bases modificadas. La rotura del DNA se produce en primer lugar mediante una modificación de la base [por metilación, concentración elevada de sal, hidracina, dimetilsulfóxido (DMSO) o ácido fórmico], y posteriormente se rompe el enlace entre la base modificada y el azúcar o la molécula del DNA por la posición que ocupa el azúcar que ha quedado libre (mediante tratamiento alcalino con piperidina).

El DNA ha de marcarse con radiactividad en uno de sus extremos: el 5' mediante polinucleótido cinasa, y el 3' con DNA polimerasa de *Escherichia coli* o con transferasa terminal. Es necesario obtener moléculas marcadas exclusivamente en uno de sus extremos; para ello se han incorporado estrategias con vectores de clonación que facilitan la obtención del DNA marcado.

Secuenciación automática

Actualmente, estos protocolos están controlados por secuenciadores automáticos, que proporcionan gran rapidez y comodidad, incrementando la eficiencia de la secuenciación. La mayor parte de los datos de secuenciación se han obtenido a partir de secuenciadores automáticos (10).

El proceso lo realizan mediante la secuenciación enzimática, es decir, con la síntesis de una cadena de DNA. Una DNA polimerasa del bacteriófago T7, que se ha modificado químicamente para eliminar parte de la actividad exonucleásica en sentido 3'-5', sintetiza la cadena a partir de un oligonucleótido, de manera que va incorporando los nucleótidos complementarios del fragmento a secuenciar.

Los oligonucleótidos utilizados se separan en cuatro fracciones y en cada una de ellas los cebadores están marcados en su extremo 5' con un fluorocromo de un color diferente. Posteriormente, a cada una de estas fracciones se le añade un único ddNTP y se realiza una incubación. Todos aquellos fragmentos que hayan incorporado el mismo ddNTP estarán marcados por idéntico color. A continuación, las cuatro reacciones se mezclan y se someten a una electroforesis en un gel de poliacrilamida. Cada banda observada corresponde a un conjunto de fragmentos del mismo tamaño, y está marcada con el fluorocromo correspondiente al cebador que se ha utilizado en la síntesis de los fragmentos. La electroforesis se realiza de forma continua en un solo carril, y el color de la banda se determina cuando el fluorocromo es excitado por un rayo láser situa-

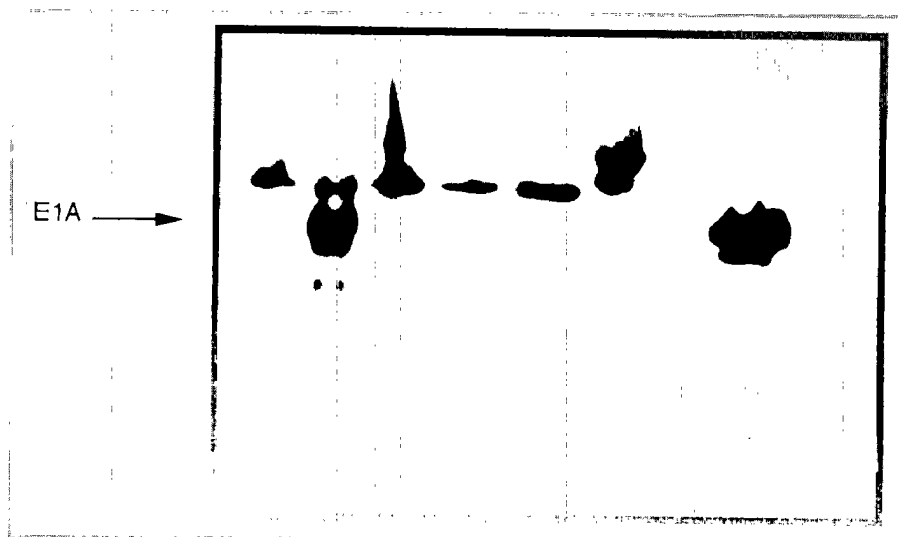


Figura 7. *Western blot*: expresión del gen E1a de adenovirus en tumores generados por líneas celulares con expresión de este gen. En el carril 2 puede apreciarse la banda correspondiente a la proteína de E1a. Como control positivo se utilizó un extracto de células en cultivo (carril 8). El método de revelado utilizado es la quimioluminiscencia.

do en la base del gel, produciendo una señal que la recibe un fotomultiplicador y se transmite a un ordenador que representa un cromatograma.

Secuenciación quimioluminiscente

La secuenciación enzimática puede llevarse a cabo con un cebador estándar (ni marcado radiactivamente ni biotinilado). Se realiza una reacción de secuenciación normal, la electroforesis, y después se transfieren y fijan los productos de la secuenciación a una membrana de nailon. Esta membrana se hibrida con un oligonucleótido biotinilado complementario al cebador utilizado en la reacción, y se inicia una reacción quimioluminiscente (estreptovidina, fosfatasa alcalina biotinilada y un sustrato para la fosfatasa alcalina).

TÉCNICAS PARA DETECTAR PROTEÍNAS: WESTERN BLOT O IMMUNOBLOT

Las bases de esta técnica son similares a las del *Southern blot* pero aplicadas a las proteínas. Para ello se han de aislar las proteínas del tejido o células a analizar, separarlas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y transferirlas a un papel de filtro donde se realiza su detección por anticuerpos específicos. Los pasos de detección de los antígenos son similares a la inmunohistoquímica, con el empleo

de anticuerpos y de sistemas de detección colorimétricos (fosfatasa-alcalina, avidina-biotina), por quimioluminiscencia o radiactivos. Sin embargo, no todos los anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica son aptos para *Western blot*.

Es importante reseñar que cada día se utilizan más los métodos basados en la quimioluminiscencia, que se centran en el estudio de un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa y la posterior reacción con luminol y perácido. La emisión de luz correspondiente se detecta en placas de autorradiografía con mayor sensibilidad.

La gran ventaja de este método respecto a otros es que permite conocer el peso molecular de la proteína en estudio y tiene una mayor fiabilidad en cuanto a la detección exacta, aunque no aporta información sobre su localización en el contexto celular y tisular de la lesión (12) (Fig. 7).

BIBLIOGRAFÍA

1. Busam, K.J., Fletcher, C.D. *The clinical role of molecular genetics in soft tissue tumor pathology*. *Cancer Metastasis Rev* 1997; 1: 207-227.
2. Fenoglio-Preiser, C., Willman, C.L. *Molecular biopsy and the pathologists: General principles and applications*. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111: 601.
3. Miles, J.S.W., Wolf, C.R. *Principles of ADN cloning*. *Br Med J* 1989; 299: 1019-1022.
4. Nuovo, G.J. *In situ hybridization*. En: Raven Press (Ed.). *PCR in situ hybridization. Protocols and Applications*. G.J. Nuovo, Nueva York 1994; 100-168.
5. Jin, L., Lloyd, R.V. *In situ hybridization: Methods and applications*. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 2-9.

6. Glassman, A.B. *Cytogenetics. An evolving role in the diagnosis and treatment of cancer*. Clin Lab Med 1997; 17: 21-37.
7. Ross, J.S., Sheehan, C.E., Hayner-Buchan y cols. *Prognosis significance of Her-2/neu gene amplification status by fluorescence in situ hybridization of prostate carcinoma*. Cancer 1997; 79: 2162-2170.
8. Sklar, J. *ADN hybridization in diagnostic pathology*. Hum Pathol 1985; 16: 654.
9. Heim, S., Mitelman, F. *Cancer cytogenetics*. Willey-Liss, 2ª ed. Nueva York 1995.
10. Levin, N.A., Brzoska, P.M., Warnick, M.L., Gray, J.W., Christman, M.F. *Identification of novel regions of altered ADN copy number in small cell lung tumors*. Genes-Chromosome-Cancer 1995; 13: 175-185.
11. Lewin, B. *El extraordinario poder de la tecnología del ADN*. En: Reverté (Ed.). Genes. 3ª ed. B. Lewin, Barcelona 1991; 379-393.
12. Ramón y Cajal, S., Matías, X., De Álava, E. *Patología molecular*. En: Mosby-Doyma (Ed.). Anatomía Patológica. F.J. Pardo, Barcelona 1996; 33-48.
13. Sternberg, N. *Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of ADN fragments as large as 100 kilobase pairs*. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 103-107.
14. Burke, D.T., Carle, G.F., Olson, M.V. *Cloning of large segments of exogenous ADN into yeast by means of artificial chromosomes vectors*. Science 1987; 236: 806-812.
15. Ayala, F.J., Kiger, J.A. *Replicación, reparación y recombinación del ADN*. En: Ayala, F.J., Kiger, J.A. (Eds.). Genética moderna. Omega, S.A., Barcelona 1984; 293-335.
16. Ben-Ezra, J.M. *Amplification methods in the molecular diagnosis of genetic diseases*. Clin Lab Med 1995; 15: 795-815.
17. Peters, J.A. *Applications of genetic technologies to cancer screening, prevention, diagnosis, prognosis, and treatment*. Semin Oncol Nurs 1997; 13: 74-81.
18. Frohman, M.A. *Cloning PCR products*. En: Mullis, K.B., Ferré, F., Gibbs, R.A. (Eds.). The Polymerase Chain Reaction. Boston 1994.
19. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. *ADN sequencing with chain terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 5463.
20. Maxam, A.M., Gilbert, W. *A new method for sequencing ADN*. Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 560.

