

UF7

Técnicas de hibridación

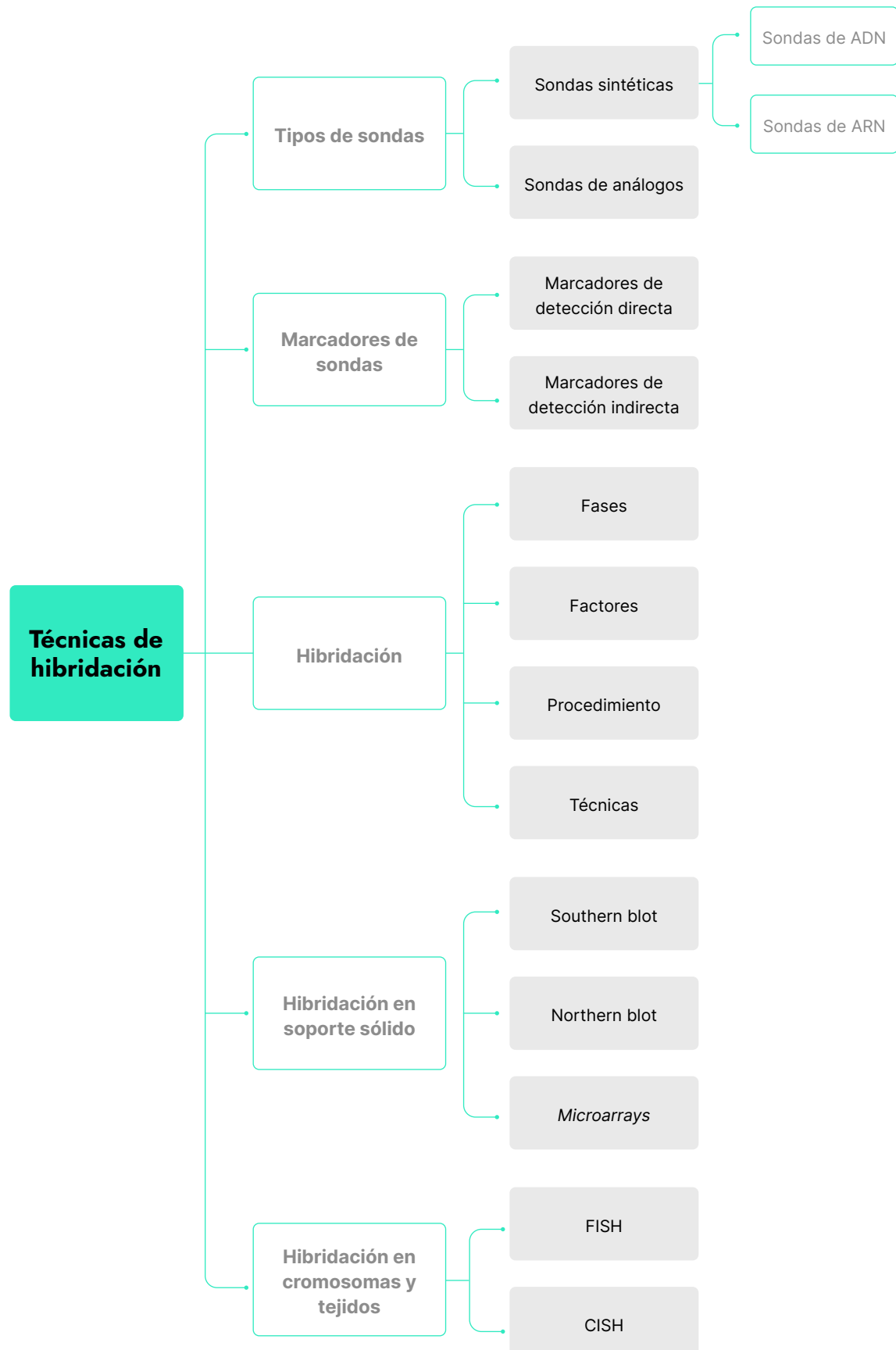
Biología molecular y citogenética

ÍNDICE

Mapa conceptual	04
1. Tipos de sonda y marcaje.....	05
1.1. Tipos de sondas	05
A. Sondas de ADN y de ARN.....	06
B. Sondas de análogos de ácidos nucleicos	07
1.2. Marcaje de sondas	08
A. Tipos de marcadores	09
2. La hibridación y sus fases	11
2.1. Desnaturalización y renaturalización	11
A. Desnaturalización	11
B. Renaturalización	13
2.2. Factores que influyen en la hibridación.....	14
2.3. Procedimiento de hibridación.....	16
2.4. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos	18
3. Hibridación en soporte sólido	20
3.1. Dot blot	20
A. Protocolo del Dot blot	21
B. Aplicaciones del Dot blot	22
3.2. Southern blot	23
A. Extracción y digestión del ADN con endonucleasas de restricción	23
B. Electroforesis en gel.....	23
C. Transferencia del ADN a la membrana.....	24
D. Hibridación	25
E. Detección mediante autorradiografía	25
F. Aplicaciones del Southern blot.....	25

3.3. Western blot	26
3.4. Northern blot	28
A. Proceso de Northern blot	28
B. Aplicaciones del Northern blot.....	29
3.5. Microarrays.....	30
4. Hibridación en fase líquida	33
A. Técnica de captura de híbrido	33
B. Tecnología del ADN ramificado (<i>branched</i> DNA)	34
5. Técnicas de hibridación en cromosomas y tejidos	36
5.1. Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	37
5.2. Hibridación <i>in situ</i> cromogénica (CISH).....	41

Mapa conceptual



01 Tipos de sonda y marcaje

En biología molecular, las técnicas de hibridación se utilizan para detectar **secuencias concretas** de ácidos nucleicos en una muestra mediante el empleo de una **sonda** de hibridación.

Las **sondas** son segmentos de ADN o ARN formados por una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia concreta que se busca. Deben ir marcadas con algún tipo de marcaje químico que permita su fácil detección.

DEFINICIÓN

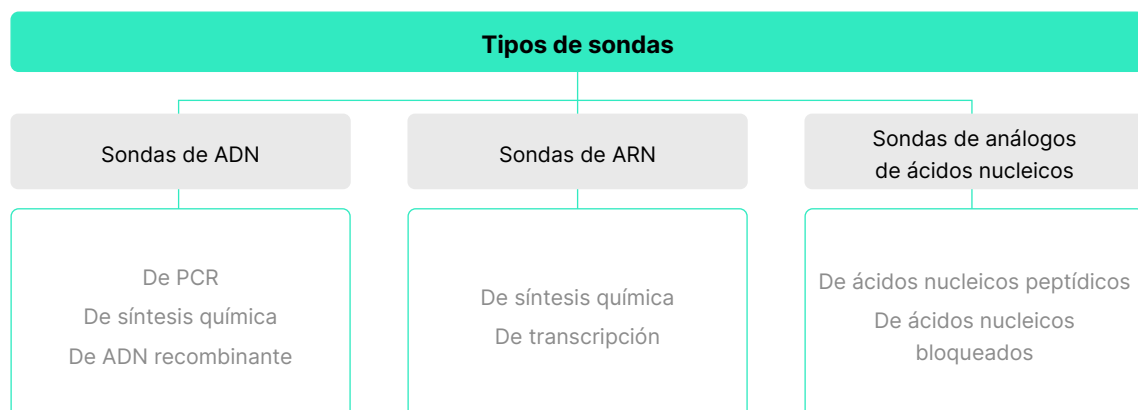
1.1. Tipos de sondas

La sonda es el elemento clave en la realización de las técnicas de hibridación. El **diseño de una sonda** permitirá que esta sea capaz de identificar la secuencia diana entre muchas. Gran parte del éxito de las técnicas de hibridación depende de la *especificidad y sensibilidad* de la sonda (Esquema 1).

Especificidad	Capacidad de la sonda para unirse a la secuencia diana complementaria.
Sensibilidad	Capacidad de la sonda para detectar su objetivo en una muestra, incluso en presencia de cantidades muy pequeñas de dicho objetivo.

Esquema 1. Especificidad y sensibilidad de una sonda molecular.

Puedes ver los diferentes tipos de **sondas utilizadas en hibridación** en la Esquema 2.



Esquema 2. Tipos de sondas utilizadas en las técnicas de hibridación.

A. Sondas de ADN y de ARN

Estas sondas, están formadas por nucleótidos de ADN o de ARN, según el tipo, aunque se puede obtener usando enzimas, por procesos bioquímicos, o se pueden obtener mediante procesos químicos, sin que intervengan enzimas.

Las **sondas de ADN** son las más fáciles de obtener, aquellas cuyos procesos de desnaturalización y renaturalización son más conocidos y las que ofrecen mayor variabilidad de tamaño y métodos de marcaje.

Las sondas de ARN conocidas como ribosondas, se usan menos que las de ADN, y aunque tiene la capacidad de detectar ARN específicamente, son muy sensibles a la ARNasas, lo que las hace menos estables. Son monocatenarias, por lo que no necesitan ser desnaturalizadas en el procedimiento de hibridación.

Las **características** de las sondas de ADN y ARN obtenidas por diferentes procesos se recogen en la Tabla 1.

SONDAS DE ADN

TIPO DE SONDA	CARACTERÍSTICAS	MÉTODOS DE SÍNTESIS	VENTAJAS	INCONVENIENTES
De PCR	Sondas bicatenarias con un tamaño entre 0,1 y 20 kb.	En primer lugar, se sintetizan cebadores complementarios a las secuencias de interés, y luego se amplifica la secuencia objetivo y por último se purifican los productos amplificados. monocaternarias. Tamaño pequeño: < 200 nucleótidos (40-50).	Gran especificidad para secuencias de interés, capacidad de amplificar señales débiles, y aplicación en muestras con baja concentración de ADN.	Pueden formar dímeros de cebadores, es necesario conocer las secuencias objetivo para el diseño de cebadores, potencial contaminación cruzada durante la amplificación.
De síntesis química	Sondas monocatenarias de pequeño tamaño (40-50 nucleótidos).	Se obtienen por condensación química secuencial de desoxinucleótidos.	No requieren desnaturalización previa, y al tener menor tamaño, se pueden usar para hibridaciones <i>in situ</i> .	Pueden llevar pocos marcadores por lo que tiene una baja sensibilidad, y al ser pequeñas, baja especificidad.

De ADN recombinante	Sondas bicatenarias, de tamaño grande, entre 0,1 y cientos de kb.	Se inserta en un plásmido un fragmento que tiene la secuencia de interés. Este plásmido se introduce en una bacteria, que se replica, y finalmente se extrae el plásmido.	Son más específicas que el resto porque es más difícil que hibriden de forma inespecífica.	Son costosas de producir y suele ser menos estable que otras sondas.
----------------------------	---	---	--	--

Tabla 1. Características sondas de ADN.

SONDAS DE ARN

TIPO DE SONDA	CARACTERÍSTICAS	MÉTODOS DE SÍNTESIS	VENTAJAS	INCONVENIENTES
De síntesis química	Sondas monocatenarias de pequeño tamaño (40-50 nucleótidos).	Se obtienen por condensación química secuencial de desoxinucleótidos.	Tienen menor tamaño por lo que se pueden usar para hibridaciones <i>in situ</i> .	Pueden llevar pocos marcadores por lo que tiene una baja sensibilidad, y al ser pequeñas, baja especificidad.
De transcripción	Sondas monocatenarias, con un tamaño intermedio (cientos de bases).	Para sintetizarlas, se diseña una secuencia de ADN complementaria al ARN que se quiera detectar, que se transcribe usando una ARNN polimerasa. Al final se purifica la sonda sintetizada.	Se pueden incorporar nucleótidos de ARN marcados de forma diferente, permitiendo una detección versátil en distintas aplicaciones.	Su obtención es bastante costosa, y el rendimiento es variable por el propio proceso de transcripción.

Tabla 2. Características sondas de ARN.

B. Sondas de análogos de ácidos nucleicos

Los análogos de ácidos nucleicos son **compuestos** con una estructura similar a la de los ácidos nucleicos. Se utilizan como sondas, generalmente en las técnicas de hibridación *in situ* y son de ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y de ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

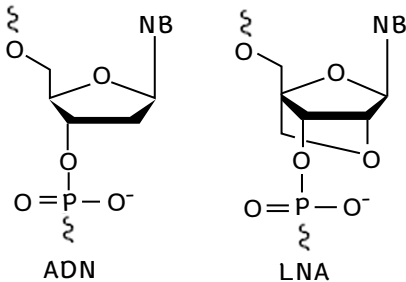
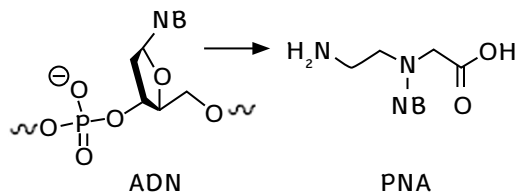
SONDA	ESTRUCTURA	CARACTERÍSTICAS
Ácidos nucleicos bloqueados (LNA) (ARN inaccesibles)	La ribosa se encuentra modificada de forma que el hidroxilo en la posición 2' está unido al carbono 4' mediante un puente de metileno bloqueando la flexibilidad del esqueleto.  ADN LNA	• Mantienen características similares a los ácidos nucleicos: esqueleto azúcar fosfato cargado negativamente y solubilidad similar. • Mayor afinidad para hibridar con cadenas de ADN y ARN. • Pequeño tamaño (15-50 nucleótidos). • Se utilizan principalmente en técnicas de hibridación <i>in situ</i>.
Ácidos nucleicos peptídicos (PNA)	El esqueleto de azúcar-fosfato se sustituye por un esqueleto peptídico de unidades aminoetilglicina, en las cuales las bases purinas y pirimidinas están unidas covalentemente.  ADN PNA	• Ausencia de cargas negativas, lo que evita fuerzas de repulsión en el proceso de hibridación. • Pequeño tamaño (no suele sobrepasar las 30 bases). • Solubilidad menor que las sondas de ADN o ARN. • Gran estabilidad al no ser degradadas por nucleasas ni proteasas. • Mayor afinidad para hibridar con cadenas de ADN y ARN. • Se utilizan principalmente en técnicas de hibridación <i>in situ</i>.

Tabla 3. Sondas de análogos de ácidos nucleicos.

1.2. Marcaje de sondas

La base de todas las técnicas de hibridación es el uso de una **sonda marcada** con una especie química que permite su detección. Bajo las condiciones adecuadas, la sonda hibrida con la secuencia complementaria que se detecta mediante la sonda marcada.

A. Tipos de marcadores

Independientemente del tipo de sonda, el marcaje debe ser **estable** y no afectar a la hibridación. Existen marcadores que permiten detectar el híbrido de forma directa y otros, sin embargo, necesitan unos pasos previos para permitir visualizar la hibridación. Los **marcadores más utilizados** se resumen en la Tabla 3.

MARCADORES PARA DETECCIÓN DIRECTA

Isótopos radioactivos	En el marcaje radioactivo se utilizan isótopos radiactivos como ^{32}P, ^{35}S, ^3H, ^{125}I. La detección, que se lleva a cabo mediante autorradiografía, permite límites de detección bajos (gran sensibilidad). En la actualidad se están sustituyendo por otros marcadores más baratos y menos peligrosos, ya que la radiactividad puede ser perjudicial y necesita instalaciones y medidas de seguridad adecuadas.
Fluorocromos	Los fluorocromos son compuestos como la fluoresceína, la rodamina y las cianidas que emiten luz cuando una luz ultravioleta los excita. Se incorporan en las bases nitrogenadas de los nucleótidos de forma que no interfieren en la formación de puentes de hidrógeno. Su uso implica la utilización de un microscopio de fluorescencia. Se utilizan sobre todo en las técnicas de hibridación <i>in situ</i> y es posible utilizar en la misma técnica diferentes fluorocromos (diferentes colores) de forma que se detecten simultáneamente varias regiones diana.
Enzimas	Las enzimas más utilizadas son la fosfatasa alcalina y la peroxidasa. Catalizan una reacción en la que se produce un producto quimioluminiscente o absorbente que se puede monitorizar. Después de la hibridación, para detectar la presencia de la sonda, se usa un sustrato específico de la enzima, que es convertido por esta en un producto detectable, que puede ser coloreado y precipitar directamente sobre el sustrato, o fluorescente que se puede visualizar con un microscopio de fluorescencia. Con el marcaje de las sondas con enzimas se consiguen sensibilidades buenas, muy cercanas al marcaje radioactivo.

MARCADORES PARA DETECCIÓN INDIRECTA

Haptenos	Se utilizan compuestos como la biotina y la digoxigenina, que se unen a los nucleótidos sin interferir en la hibridación. Para su detección, necesitan de un proceso de revelado posterior (métodos de afinidad química o inmunológicos) y presentan una sensibilidad menor que los marcadores radioactivos.
----------	---

Tabla 4. Marcadores de sondas utilizados en técnicas de hibridación.

1

CASO PRÁCTICO



USO DE UNA SONDA MOLECULAR PARA IDENTIFICAR UNA DELECIÓN

En el laboratorio donde trabajas debes diseñar una sonda de hibridación para identificar una delección.

La secuencia normal del gen es:

A A T T G A C T A A G C C G A A T T

La secuencia mutante del gen es:

A A T T G A C T _____
(Delección)

¿Cuál es la secuencia de la sonda que diseñarías para la identificación?

SOLUCIÓN

La secuencia de la sonda diseñada sería: **T T C G G C T T A A**

- La hibridación completa entre la secuencia y la sonda indica la presencia de la secuencia normal del gen.
- La ausencia de hibridación entre la secuencia y la sonda indica que la secuencia normal del gen está ausente.

02 La hibridación y sus fases

La hibridación se basa en la capacidad que tienen las moléculas de ácidos nucleicos monocatenarias de unirse para **formar moléculas bicatenarias**. Es decir, dos cadenas de ácidos nucleicos separadas por desnaturalización pueden renaturalizarse para volver a formar la doble cadena.

2.1. Desnaturalización y renaturalización

El proceso de hibridación entre la sonda y la secuencia diana se basa en los fenómenos de **desnaturalización** y **renaturalización** de ácidos nucleicos.

A. Desnaturalización

Es la pérdida de la conformación tridimensional del ADN (doble hélice) por **rotura de los puentes de hidrógeno** entre las bases nitrogenadas complementarias y separación de las dos cadenas.

La desnaturalización se consigue aumentando el **pH** (PH alcalino), aumentando la **temperatura** o añadiendo agentes **químicos** desnaturizantes.

En la siguiente curva de fusión del ADN puede verse representado su comportamiento:

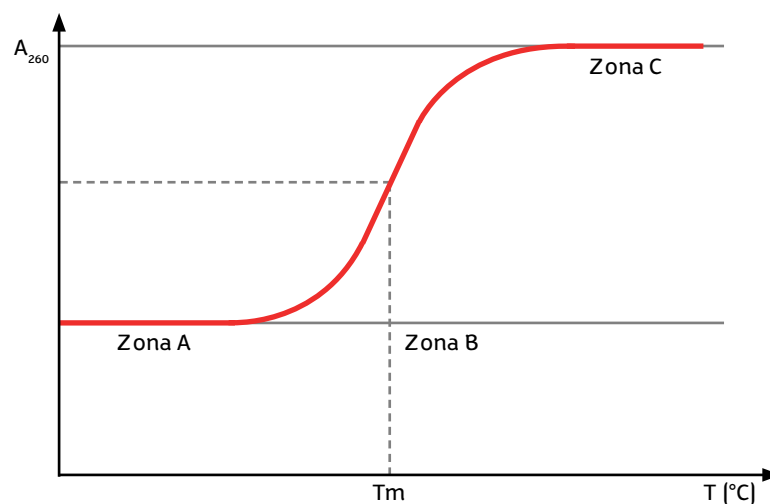


Fig. 1. Curva de fusión de ADN.

Si se mide la **absorbancia** a 260 nm de una solución de una molécula bicatenaria de ADN en función de la temperatura se obtiene esta curva de tipo sigmoide (curva de fusión del ADN), en la que se distinguen tres zonas:

- » **Primera zona (A).** La absorbancia a 260 nm tiene un valor constante, aunque se aumente la temperatura. Es un tramo recto sin pendiente debido a que la temperatura no alcanza un valor suficiente para romper los puentes de hidrógeno, y el porcentaje de desnaturalización es del 0%.
- » **Segunda zona (B).** En este tramo se produce la desnaturalización progresiva de la molécula. La absorbancia a 260 nm aumenta a medida que lo hace la temperatura con un comportamiento de:
 - Aumento lento (concavidad de la curva).
 - Aumento rápido (convexidad de la curva).
 - Aumento lento (hasta que alcanza el valor máximo).

En esta zona se produce un fenómeno conocido como **efecto hipercrómico**, que es un aumento brusco en la absorbancia durante la desnaturalización del ADN. Es debido a que cuando las dos hélices se separan, las bases nitrogenadas que estaban antes en el interior de la doble hélice quedan libres, lo que provoca un cambio en la estructura del ADN y un incremento en la absorbancia de la luz UV, porque dos cadenas sencillas libres absorben más que una doble cadena.

- » **Tercera zona (C).** Es un tramo recto, ya que la absorbancia a 260 nm se mantiene en el valor máximo, aunque la temperatura siga aumentando. El porcentaje de desnaturalización es del 100%.

DEFINICIÓN

La **temperatura de melting (Tm)** o temperatura de fusión del ADN es la temperatura a la cual el 50% del ADN está desnaturalizado.

Bajo condiciones definidas, cada DNA muestra una curva de fusión con valores característicos de Tm. Su **valor** depende del pH, la fuerza iónica del medio y la composición en bases del ácido nucleico.

Es importante indicar la **relación entre la Tm y el contenido en pares de bases del DNA**: cuanto más abundantes son las uniones complementarias G-C (unidas por triple enlace), mayor va a ser la temperatura necesaria para la desnaturalización, ya que al ser más fuerte la interacción entre bases, más energía se necesita para disociarla. En cambio, cuantos más pares A-T (unidas por doble enlace), menor temperatura se necesita para la desnaturalización.

La Tm de un híbrido se puede calcular, gracias a la fórmula experimental propuesta por Wetmur y Sninsky en 1995:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log([Na^+]/1.0 + 0.7[Na^+]) + 0.41(\%G+C) - (500/\text{Tamaño en pb})$$

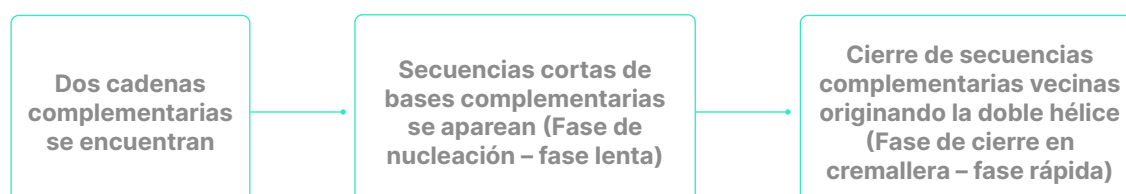
Esta fórmula tiene en cuenta la concentración de iones de sodio ([Na⁺]), así como el contenido de pares de bases de guanina y citosina (%G+C) en la cadena y la longitud de la secuencia de ADN (Tamaño en pb) para calcular la temperatura de fusión (Tm) de un híbrido de ADN. Existen otras fórmulas que solamente tienen en cuenta la composición de bases nitrogenadas, pero en esta, además de ese factor, se valora cómo influye la concentración salina de la disolución puesto que los dos parámetros afectan a la estabilidad de los híbridos formados y por lo tanto a la Tm.

B. Renaturalización

La desnaturalización es un proceso reversible. Una vez que el ADN ha sido desnaturalizado, se hace descender lentamente la temperatura por debajo de la Tm y las cadenas vuelven a unirse. La renaturalización es el proceso por el cual **se combinan dos cadenas** de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias.

La renaturalización depende de la **complementariedad de bases** de las cadenas, es decir, del reconocimiento molecular requerido para que dos moléculas de ácidos nucleicos se unan.

A diferencia de la desnaturalización, donde influye la composición de las bases, en la renaturalización influye la **concentración de las cadenas en la solución**, ya que cuanto mayor es la concentración, mayor es la probabilidad de que las dos cadenas complementarias se encuentren.



Esquema 3. Cinética de la renaturalización.

Aunque la renaturalización y la hibridación consisten en la formación de una molécula bicatenaria a partir de dos monocatenarias, se trata de conceptos diferentes:

- » En la **hibridación**, el origen de las moléculas monocatenarias es diferente.
- » La **renaturalización** es una vuelta atrás de la desnaturalización, ya que el origen de las moléculas monocatenarias es el mismo.

2.2. Factores que influyen en la hibridación

Las condiciones en las que se lleva a cabo la hibridación determinan la unión entre la secuencia diana y la sonda. Si se lleva a cabo en **condiciones de rigurosidad alta** (*high stringency*), solo se unirán aquellas secuencias completamente homólogas, evitando uniones entre secuencias parecidas que tengan bases no complementarias formando híbridos imperfectos. Sin embargo, si se usan unas **condiciones de rigurosidad baja** (*low stringency*), será más probable que tengan lugar uniones inespecíficas, aumentando en número de híbridos imperfectos. El porcentaje de pares de bases no complementarias en el híbrido se conoce como **mismatch**, que es mayor en los híbridos imperfectos.

Uno de los factores que condiciona la hibridación es la **temperatura**. Cuando se aumenta la temperatura, los puentes de hidrógeno existen entre las bases nitrogenadas, y que mantienen la doble hélice unida, se rompen, provocando la desnaturalización del ADN. Esto tiene lugar a unos 90°C, y es una etapa necesaria para que se pueda producir la desnaturalización de las cadenas de ADN que forman la doble hélice. Además, cada sonda tiene una temperatura específica a la cual podrá hibridar de forma más eficiente con la molécula de ADN que se está estudiando.

Las **condiciones químicas** también influyen en el proceso de hibridación. La concentración de sales en la disolución se conoce como fuerza iónica. En este sentido, la T_m aumenta cuando se incrementa la concentración de cationes monovalentes (como el Na^+). Estos iones se disponen rodeando las uniones entre bases nitrogenadas y además neutralizan la carga negativa de los ácidos nucleicos, que provienen de los grupos fosfato. Al aumentar la concentración de cationes monovalentes, las fuerzas de repulsión dentro de la cadena disminuyen, haciendo la cadena de ADN más estable, y aumentando la T_m . En la hibridación, a mayor concentración de estos cationes, mayor es la velocidad de la reacción y la estabilidad del híbrido que se forma.

Cuando existe una concentración baja de sales en una solución donde se produce una hibridación se producen solamente uniones de gran complementariedad, reduciéndose el **mismatch**. Teniendo en cuenta la temperatura, cuanto más alta sea esta y más baja la concentración de sales, mayor será la fidelidad de la hibridación.

El proceso de hibridación se basa en la **complementariedad de las bases nitrogenadas**. Cada base de del ácido nucleico tiene un elemento complementario: la citosina se une a la guanina y la adenina se une a la timina (o al uracilo en el caso del ARN, A-U). En el caso de la hibridación, la complementariedad es fundamental ya que, a menor complementariedad

de bases, menor es la estabilidad del híbrido. Cualquier hibridación en la que la complementariedad sea inferior a 70 % se considera no homóloga. Esto último tiene lugar a temperaturas bajas y concentraciones de sales bajas.

La **composición de bases** que tiene la secuencia diana y la sonda también deben tenerse en cuenta durante la hibridación. Las bases se unen entre sí mediante enlaces de puentes de hidrógeno, y dependiendo de qué bases sean estos enlaces serán triples o dobles. La G y la C se unen mediante enlace triple (G?C), mientras que la A y la T lo hacen por un enlace doble (A=T), al igual que la A y el U (A=U). Los triples enlaces son más estables y difíciles de romper que los enlaces dobles, por lo que a mayor porcentaje de uniones G-C, la estabilidad del híbrido será mayor.

En cuanto a la **longitud de las cadenas**, cuando las secuencias que se aparean son más largas, la estabilidad de los híbridos también es mayor, porque existen más enlaces de puentes de hidrógeno que las mantienen unidas.

La presencia de **otros compuestos en la solución de hibridación** también puede afectar al proceso de hibridación. Dos de las sustancias que reducen la T_m del ADN son la formamida y el DMSO (dimetilsulfóxido). La formamida reduce la T_m en 0,72°C por cada 1% que se encuentre presente en la solución de hibridación, mientras que se estima que el DMSO la reduce en alrededor de 1-2°C por cada 1%. Estos compuestos debilitan los puentes de hidrógeno, permitiendo bajar la temperatura de desnaturalización, ya que las cadenas de ADN no están unidas tan fuertemente. Tanto una sustancia como la otra, cuando se encuentran en altas concentraciones, provocan un efecto similar a las altas temperaturas.

FACTORES	CARACTERÍSTICAS
Temperatura	Si la temperatura es mayor se favorece la desnaturalización.
Condiciones químicas	Una mayor concentración de sales aumenta la T _m .
Complementariedad de las bases	Si las secuencias no son complementarias no se forman los híbridos, aunque se pueden formar híbridos imperfectos.
Composición de bases	Los híbridos son más estables si el porcentaje de G-C es mayor.
Longitud de las cadenas	Las cadenas más largas generan híbridos más estables.
Otros compuestos en solución	La formamida y el DMSO reducen la T _m .

Tabla 5. Factores que influyen en la hibridación.

2.3. Procedimiento de hibridación

Antes de comenzar con la hibridación, es necesario preparar la muestra o en su caso extraerla para obtener el ADN, y añadirle la sonda marcada. Esta primera fase se conoce como **prehibridación**, y en ella tiene lugar la desnaturalización de la molécula de ADN, que es una doble cadena, mediante el aumento de la temperatura o incrementando el pH de la disolución, aplicando un tratamiento alcalino. Una vez desnaturalizada la muestra se añadirá la sonda marcada, que, en condiciones adecuadas, hibridará con el ADN problema siempre que se esté presente la secuencia diana complementaria a la sonda.

En algunas técnicas de hibridación la prehibridación incluye la incubación con una solución de prehibridación que contiene un reactivo elaborado a base de ADN de esperma de salmón, que tiene como objetivo bloquear los posibles lugares de uniones inespecíficas de la sonda, mejorando así la especificidad y sensibilidad de la técnica. Si bien el uso de una solución de prehibridación no es una parte estándar de todos los protocolos de hibridación, puede ser utilizado en ciertas aplicaciones para mejorar los resultados de la hibridación.

Una vez que la muestra (que debe contener el ADN que se quiere analizar) ha sido puesta en contacto con la sonda, tiene lugar la fase de **hibridación** propiamente dicha. Durante la hibridación, cuando la sonda entra en contacto con el ADN de la muestra, si las cadenas son complementarias se forman enlaces de puentes de hidrógeno y se forma el híbrido sonda-secuencia diana. En esta etapa será importante tener en cuenta la T_m del híbrido que se forma, para mejorar la eficiencia.

Ya hemos comentado que las condiciones de rigurosidad relajadas favorecen la formación de uniones inespecíficas y la formación de híbridos imperfectos, porque se mejora la estabilidad en general, sean perfectos o imperfectos. Por el contrario, unas condiciones de rigurosidad más elevadas aumentan la especificidad de los híbridos formados, y reducen el *mismatch*. Será necesario buscar un equilibrio entre unas condiciones de rigurosidad demasiado altas que impidan la formación de suficientes híbridos y reduzcan la sensibilidad de la técnica, y unas condiciones de rigurosidad muy bajas que provoquen muchas uniones inespecíficas y reduzcan la especificidad de la técnica.

La duración de esta etapa puede durar entre 30 minutos hasta 24 horas y depende fundamentalmente de la concentración de la sonda y de la técnica de hibridación que se está empleando.

En el **lavado poshibridación** se pretende eliminar los híbridos imperfectos que se hayan formado y los restos de sonda que no haya hibridado. Para esta etapa se usa un tampón en el que se fijan las condiciones de rigurosidad. Si las condiciones son elevadas, es decir, un tampón con elevada concentración de formamida, baja fuerza iónica, y una alta temperatura, se garantiza la eliminación de híbridos imperfectos que se han podido formar durante la

fase de hibridación, mejorando la especificidad. El inconveniente, es que se pueden eliminar híbridos perfectos, que son también menos estables, reduciendo la sensibilidad.

Por último, es necesaria la **detección de los híbridos** formados. El método que se vaya a emplear dependerá del tipo de marcaje usado sobre las sondas. Existen varios métodos de detección:

» **Película radiográfica:** para el marcaje con isótopos radiactivos. Después de la hibridación con las sondas, se expone una película radiográfica al soporte que contenía la muestra, en el interior de una cámara oscura. Tras el período de exposición, la película se retira de la cámara, y se revela mediante un proceso químico, de forma que las áreas de la película próximas a zonas en las que había sondas marcadas, quedan como manchas. La película revelada se puede escanear o fotografiar para registrar la imagen.

» **Microscopio de fluorescencia:** para el marcaje con fluorocromos.

Cuando una sonda marcada con un fluorocromo es irradiada por luz ultravioleta, emite un color que puede ser detectado por el ojo humano. Los microscopios de fluorescencia tienen una fuente de luz ultravioleta que se proyecta sobre la muestra de manera que si la sonda marcada ha hibridado con el ADN problema, se puede observar de un color u otro según el tipo de fluorocromo que se ha usado.

» **Detectores de fluorescencia:** para el marcaje con fluorocromos.

Ocurre lo mismo que cuando se usa un microscopio, pero en este caso en lugar de ser el ojo humano es un fotodetector electrónico el que recibe la señal que procede del fluorocromo.

» **Métodos inmunológicos:** basados en el uso de anticuerpos.

Los métodos inmunológicos para detectar sondas de hibridación utilizan anticuerpos específicos que reconocen y se unen a sondas marcadas con moléculas marcadoras, como la **biotina** y la **digoxigenina**, que actúan como antígenos para los anticuerpos específicos. Lo que permite su detección y cuantificación de manera altamente sensible y específica.

» **Métodos enzimáticos:** las sondas se marcan con enzimas que degradan sustratos y los convierten en sustancias cromogénicas o fluorescentes.

Las principales etapas del proceso de hibridación son: preparación o extracción de la muestra, adición de la sonda marcada, hibridación, lavado poshibridación y detección del híbrido formado (Tabla 6).

FASES	CARACTERÍSTICAS
Prehibridación	• Preparar o extraer la muestra de la muestra.
	• Añadir la sonda marcada.
Hibridación	• Incubar para que se formen los híbridos.
Lavado poshibridación	• Eliminar híbridos imperfectos.
	• Eliminar sondas no hibridadas.
Detección del híbrido	• Poner de manifiesto las secuencias diana.

Tabla 6. Fases de la hibridación.

2.4. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos

Las técnicas de hibridación se pueden clasificar en **tres grupos**, en función del medio o soporte en el que se llevan a cabo (Esquema 4).

Hibridación en fase líquida	Hibridación de la sonda con una muestra de DNA o RNA en disolución.
Hibridación en soporte sólido	Previamente a la hibridación, se inmoviliza la sonda o la secuencia diana sobre un soporte sólido.
Hibridación <i>in situ</i>	La sonda se aplica sobre muestras en su ubicación natural (cortes de tejido, células intactas, cromosomas...).

Esquema 4. Técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.



VÍDEOLAB

Para consultar el siguiente video sobre el uso de la hibridación en la lucha contra el VPH, escanea el código QR o [pulsa aquí](#).

2

CASO PRÁCTICO



CÁLCULO DE LA T_m DE LA SECUENCIA DIANA

Una secuencia diana de 800 pb que tiene un contenido de G + C del 55% se sintetiza en una reacción que contiene una concentración salina de 0,25 M. ¿Cuál es su T_m?

SOLUCIÓN

Debemos aplicar la fórmula propuesta por Wetmur y Sninsky:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log ([\text{Sal}]/1,0 + 0,7 ([\text{Sal}]) + 0,41 (\%G+C) - 500/\text{Tamaño pb}$$

$$(\text{Sal}) = 0,25$$

$$\% G + C = 55\%$$

$$\text{Tamaño pb} = 800$$

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log (0,213) + 0,41(55) - 0,63$$

$$T_m = 92,3^\circ\text{C}$$

La temperatura de fusión del fragmento de 800 pb es 92,3°C.

03 Hibridación en soporte sólido

Las técnicas de hibridación en soporte sólido son aquellas en las que una de las moléculas implicadas (secuencia diana o sonda) **se inmoviliza sobre un soporte sólido** antes de la hibridación.

Las técnicas en las que una secuencia se **fija** al soporte y se **incuba** posteriormente con la sonda marcada para que ocurra la hibridación son las que se basan en los procesos de electroforesis y *blotting*. Como ya se vio en la Unidad 6, la **electroforesis** es la técnica de separación de moléculas basada en la diferente capacidad de migración en un campo eléctrico a partir de su peso molecular y carga eléctrica. El *blotting* es la transferencia de ácidos nucleicos o proteínas desde un gel hasta una membrana conservando su posición espacial relativa. Las técnicas que utilizan esta metodología son: **Southern blot** (ADN), **Northern blot** (ARN) y Western blot (proteínas).

También es posible fijar al soporte la sonda e incubarla después con la muestra que contiene la secuencia diana previamente marcada. La técnica que utiliza esta metodología son los **microarrays de ADN**.

3.1. Dot blot

El Dot blot (“mancha de puntos”) es la técnica de hibridación más sencilla y fue la que se desarrolló en primer lugar. Se basa en el uso de membranas de nitrocelulosa o nylon como soporte sólido, sobre las que se fija la muestra o la sonda, y permite detectar secuencias de ácidos nucleicos en una mezcla compleja sin aportar información adicional. Solamente indica la presencia o ausencia de la secuencia diana. Se pueden estudiar varias muestras de forma simultánea, si se aplica cada muestra en una zona distinta del soporte sólido.

El Dot blot es una técnica de “blotting” en la que los pocillos de aplicación de la muestra son circulares, pero cuando estos pocillos tienen forma de ranura se llama Slot blot.

A. Protocolo del Dot blot

Existen muchas variantes del protocolo, pero todos tienen en común una serie de etapas:

- » **Aplicación de la muestra sobre el soporte:** se humedece la membrana mediante inmersión en un tampón adecuado o en agua destilada durante un período de 10 minutos. Luego, se retira el exceso de líquido de la membrana utilizando papel de filtro. Posteriormente, se coloca la membrana humedecida en un sistema de vacío que consta de una plantilla con pocillos. Debajo de esta plantilla se sitúa la membrana de nitrocelulosa o nylon que se había humedecido antes y una junta selladora, para garantizar el vacío. Antes de aplicar la muestra se debe someter a un proceso de desnaturalización para que las bases nitrogenadas queden expuestas.

Luego, se añade la muestra a los pocillos y se aplica el vacío al conjunto, haciendo pasar la muestra y quedando retenida por la membrana. Será necesario fijar la muestra mediante su esqueleto de pentosa-fosfato dejando las bases nitrogenadas libres, lo que se consigue mediante calor o radiación.

- » **Prehibridación:** la membrana se incuba con solución de Prehibridación para bloquear las uniones inespecíficas sonda membrana.
- » **Hibridación:** la sonda se debe desnaturalizar antes de aplicarla, y también se debe eliminar la solución de Prehibridación. Se añade la solución de hibridación con la sonda y se incuba mientras se aplica agitación durante entre 4 y 24 horas a temperatura ambiente.
- » **Lavado poshibridación:** para lavar y eliminar la sonda no hibridada y los híbridos imperfectos se realizan varios lavados con soluciones y se van incrementando de forma progresiva las condiciones de rigurosidad.
- » **Detección del híbrido:** el sistema de detección depende del marcaje que se haya aplicado sobre la sonda.
 - **Istótopos radiactivos:** la membrana se pone en contacto con una película radiográfica que luego de revela, y aparecerán como puntos las zonas que hayan estado en contacto con la sonda hibridada y que tenían la secuencia diana.
 - **Marcadores fluorescentes:** la presencia de la sonda se detecta usando un escáner de fluorescencia.

B. Aplicaciones del Dot blot

Aunque fue la primera técnica de hibridación en soporte sólido que se desarrolló, ha seguido evolucionando, y todavía tiene múltiples usos, algunos de los cuales son:

Técnica de rastreo: se puede usar como técnica de rastreo o *screening* para detectar secuencias de interés den múltiples muestras de forma simultánea, concreto para:

- » Estudios de expresión génica.
- » Determinación de sexo en especies sin diferencias fenotípicas.
- » Control de calidad de PCR.
- » Control de calidad de marcaje de sondas.
- » Detección de secuencias extrañas en muestras biológicas.

ASO Dot blot: se refiere al uso de oligonucleótidos específicos de alelo (*allele-specific oligonucleotides*), que son pequeñas moléculas de ADN sintético, complementarias a una variable de la secuencia diana de ADN. En concreto, sirve para detectar mutaciones tanto en homocigosis como en heterocigosis mediante sondas. Requiere una PCR previa para amplificar la región concreta del gen. El ADN se fija en el soporte sólido, y se aplica encima una disolución de hibridación con las sondas marcadas. Se usa para el diagnóstico de la anemia falciforme.

Dot blot inverso: es igual que en el apartado anterior, con la diferencia de que en este caso los los ASOs los que se inmovilizan en el soporte sólido. Se usa para el diagnóstico de las talasemias.

Hibridación de colonias: se emplea para detectar colonias formadas por un tipo de bacteria en concreto que es portadora de la secuencia de interés, sobre la que se unirá una sonda marcada. Una vez que se ha producido el crecimiento de la bacteria en una placa de Petri, las colonias se transfieren a un filtro de nitrocelulosa, obteniendo una copia que se llama impronta. Cuando se ha producido la transferencia, las bacterias se lisan y se desnaturaliza el ADN. Posteriormente, se incuban con la solución de hibridación con una sonda, que se fijará a las copias de las colonias en las que está la secuencia diana. El método de detección de la sonda dependerá del tipo de marcaje de la sonda.

Hibridación de placas virales: es similar a la hibridación de colonias, pero para detectar virus que portan la secuencia diana, por ejemplo, en tecnología del ADN recombinante para localizar fagos recombinantes con la secuencia clonada.

3.2. Southern blot

La técnica de hibridación conocida por su nombre en inglés, Southern blot, consiste en transferir una muestra de ADN (digerida por enzimas de restricción y separada por electroforesis) a una **membrana** de nitrocelulosa o nailon en presencia de un **agente** que desnaturaliza la estructura del ADN en la membrana (por ejemplo: NaOH).

Posteriormente, se hace que otra molécula de ácido nucleico en solución (sonda de hibridación), también desnaturalizada o de cadena simple, interactúe con el ADN de la membrana a una temperatura que permita un reconocimiento de bases lo más específico posible.

Los **pasos de la técnica** de Southern blot para detectar una secuencia específica de ADN en una muestra son los que se muestran en la Figura 2.

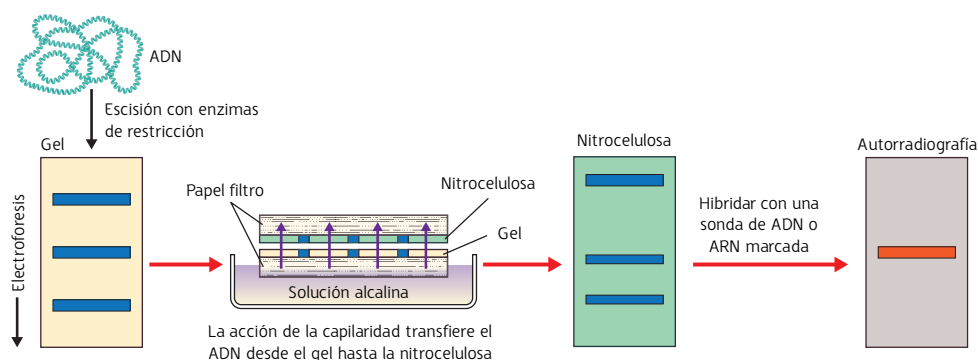


Fig. 2. Técnica de Southern blot.

A. Extracción y digestión del ADN con endonucleasas de restricción

Se puede realizar la extracción de ADN de **casi cualquier tejido**. Una o varias enzimas de restricción digieren el ADN extraído purificado. El objetivo de este paso es cortar el ADN de partida en distintos fragmentos.

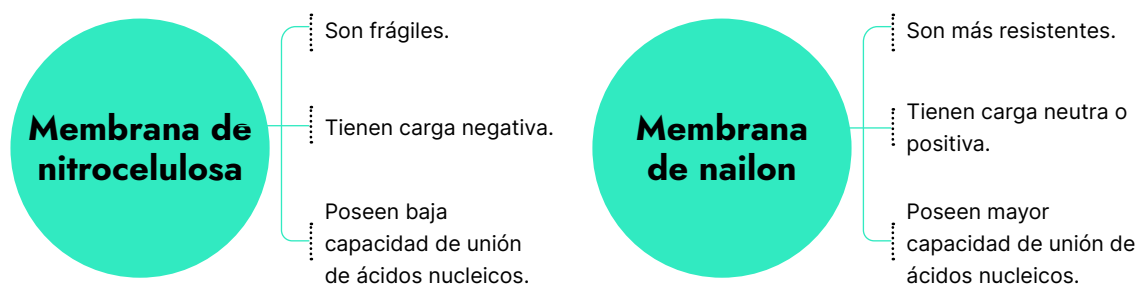
B. Electroforesis en gel

Tras la digestión del ADN, los fragmentos resultantes se separan **según su tamaño** mediante electroforesis en gel (generalmente en gel de agarosa). Se produce una separación continua de los fragmentos de ADN de acuerdo con su tamaño, de modo que los fragmentos más pequeños se encuentran a mayor distancia del punto de aplicación de la muestra.

C. Transferencia del ADN a la membrana

Para transferir el ADN a la membrana, es necesario realizar: **desnaturalización** del ADN, **transferencia** del ADN a la membrana y **fijación** del ADN a la membrana.

El tratamiento con **solución alcalina** del gel desnaturaliza los fragmentos de ADN antes de que se transfieran, lo que asegura que se encuentren en el estado de simple hebra y sean accesibles a la sonda. Tras la neutralización, el ADN monocatenario resultante se transfiere a la superficie de una membrana de nailon o nitrocelulosa (Esquema 5).



Esquema 5. Membranas utilizadas en Southern blot.

La **transferencia** del ADN al gel se produce de forma habitual por capilaridad. Para transferir los fragmentos de ADN a la membrana es necesario montar un «sándwich de transferencia» (Figura 3) e incubar entre 15 y 20 horas.

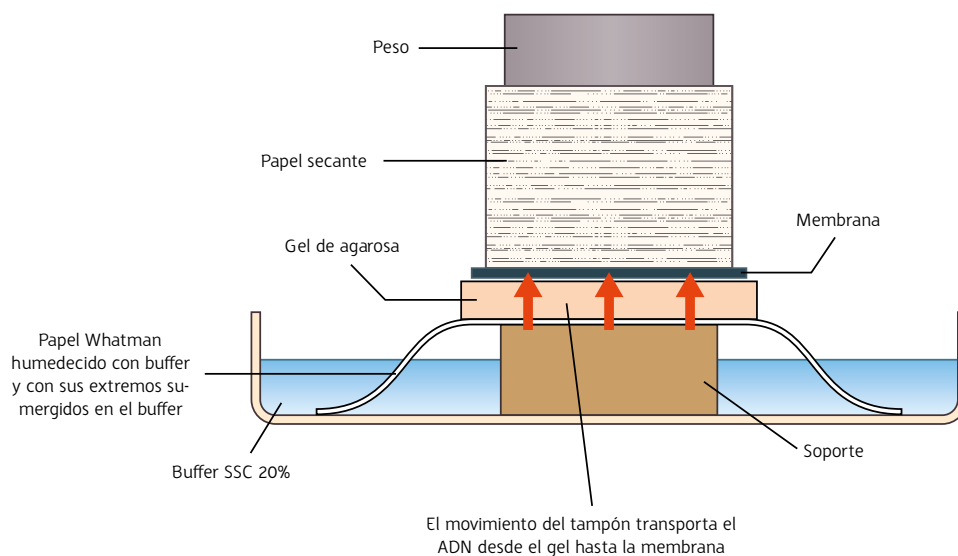


Fig. 3. Sándwich de transferencia.

Cuando la separación de los fragmentos de ADN se realiza en geles de poliacrilamida, la transferencia por capilaridad no funciona y es necesario usar **corriente eléctrica** para realizarla.

Una vez realizada la transferencia, es necesario **fijar** los ácidos nucleicos a la membrana. En el caso de utilizar membranas de nitrocelulosa, se hornea a 80°C en un horno de vacío durante dos horas. Si la membrana es de nailon, se irradia con luz UV.

D. Hibridación

Antes de la hibridación se **incuba la membrana** con una solución que contiene ADN de esperma de salmón desnaturalizado, con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas de la sonda a la membrana.

La membrana con los fragmentos de ADN se incuba en una solución que contiene una **sonda marcada** bajo condiciones de temperatura y concentración de sales determinada para favorecer la hibridación. La membrana con los reactivos se introduce dentro de una bolsa con cierre hermético bajo agitación durante un lapso de cuatro a 24 horas.

Después de la hibridación, la membrana se lava con un **tampón** para eliminar la sonda que se unió de forma inespecífica o restos de sonda no unida que esté presente.

E. Detección mediante autorradiografía

El patrón de hibridación se detecta colocando la membrana en contacto con una película de rayos X por **autorradiografía** si se ha utilizado un sistema con marcado radioactivo, de forma que se observarán manchas oscuras en los puntos de la membrana donde se localicen los híbridos.

Si se ha utilizado una sonda marcada con **fluorocromos**, se pondrá en contacto con una película sensible a la luz.

F. Aplicaciones del Southern blot

EL Southern blot es una técnica con múltiples aplicaciones en la actualidad, aunque en muchos casos está siendo sustituida por la PCR, puesto que una técnica más rápida y más sensible.

Las principales aplicaciones son:

- » Elaboración de las huellas genéticas.
- » Estudio de mutaciones estructurales.
- » Detección de secuencias adquiridas.

3.3. Western blot

El Western Blot es una técnica analítica que permite la detección de una sola proteína dentro de una muestra biológica. Es un procedimiento muy específico gracias al uso de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de la proteína problema.

Aunque no es una técnica para el estudio de ácidos nucleicos, sino proteínas, es muy habitual en los laboratorios, y su fundamento es prácticamente igual que el resto de las técnicas de *blotting* o transferencia que hemos descrito para los ácidos nucleicos.

De forma general, para realizar la técnica Western Blot se deben llevar a cabo los siguientes pasos:

- » **Preparación de la muestra:** las proteínas se pueden obtener mediante métodos químicos y/o mecánicos, dependiendo del tipo de muestra de partida. Para los procesos químicos se utilizan detergentes, que rompen las membranas celulares y solubilizan proteínas.

El paso final de la preparación es la reducción y desnaturalización, lo que se consigue usando un tampón que contiene un agente reductor, un detergente y aplicando calor. Los agentes desnaturalizantes son el dodecilsulfato sódico (SDS) y el beta-mercaptoetanol. Estos agentes rompen los enlaces disulfuro de las proteínas que pierden sus niveles superiores de organización.

- » **Electroforesis:** se usa un tipo de electroforesis SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Como en otras electroforesis, las muestras se cargan en los pocillos del gel que luego se somete a un campo eléctrico y el progreso se monitoriza observando el frente coloreado por el colorante que hay en el tampón de carga.

- » **Transferencia a una membrana:** cuando ha terminado la electroforesis las proteínas se deben transferir a otra superficie, porque los geles son demasiado frágiles y son un sustrato pobre para la inmunodetección. La membrana suele ser de PVDF o de nitrocelulosa, que ofrecen mayor resistencia mecánica y al SDS

Para la transferencia se coloca la membrana adyacente al gel y el “sandwich” se monta en un casete especial que tiene un polo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo). Como las proteínas tienen carga negativa, el polo positivo del casete se coloca más cerca de la membrana para que las proteínas migren desde el gel hacia la membrana.

- » **Inmunotinción:** se usan anticuerpos específicos para que se visualice la proteína diana. En primer lugar, se debe bloquear el espacio vacío de la membrana ya que es una superficie adherente para todas las proteínas, por lo que un anticuerpo podría unirse de forma no específica a la membrana expuesta. Para evitarlo se incuba la membrana durante 1 hora o una noche a 4°C con una solución a base de proteínas como leche en polvo o BSA que reducen los sitios de unión inespecífica y que el anticuerpo no se adhiera.

Después del proceso de bloqueo la membrana se incuba con el anticuerpo primario que reconocerá el epítipo (secuencia de aminoácidos) durante 1 hora a temperatura ambiente o a 4°C durante una noche con agitación suave y sumergida en la solución. Luego se lava 3-5 veces para eliminar el anticuerpo no fijado y se trata con un anticuerpo secundario conjugado con una molécula marcadora que se puede visualizar fácilmente durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. Este anticuerpo secundario es específico del anticuerpo primario, que estará unido a la proteína de interés, por lo que indica su presencia de forma indirecta. Después la membrana se vuelve a lavar para eliminar los restos de anticuerpo secundario 3-5 veces con TBST (Tris-bicarbonato de sodio-tween) durante 10 minutos cada lavado.

- » **Detección de las bandas:** se puede hacer por métodos directos o indirectos y la detección se realiza por:
- Quimioluminiscencia: los anticuerpos se marcan con una enzima que cataliza una reacción con un sustrato para producir una señal luminiscente que se puede detectar mediante una película o una cámara CCD.
 - Fluorescencia: el anticuerpo lleva unido un fluoróforo que cuando se excita emite señal que se puede detectar con una cámara CCD o un dispositivo capaz de medir la fluorescencia.
 - Colorimetría: el anticuerpo ha sido conjugado a una enzima que cataliza una reacción que transforma el sustrato en un producto insoluble que es visible en la membrana, siendo la cantidad de color proporcional a la cantidad de proteína en la muestra. La intensidad se puede medir por espectrofotometría o por un densitómetro.

3.4. Northern blot

La técnica de **Northern blot**, desarrollada por James Alwine en 1977, para la detección de moléculas de ARN separadas por electroforesis en gel y transferidas a una membrana de nitrocelulosa o nailon, es una variación de la técnica de Southern blot, pero los fragmentos diana que se utilizan son ARN, no ADN como en la técnica anterior.

A. Proceso de Northern blot

El proceso de Northern blot sigue los siguientes **pasos** (Figura 4):

1. Extracción de ARN total de una muestra de tejido homogenizado.
2. Separación por electroforesis en gel de las moléculas de ARN.
3. Transferencia de los fragmentos de ARN del gel a una membrana de nailon o nitrocelulosa, generalmente por capilaridad.
4. Marcaje de la sonda e incubación para hibridación con el ARN de la membrana.
5. Detección de los fragmentos de ARN hibridados con la sonda mediante el método adecuado al marcaje de la sonda utilizado.

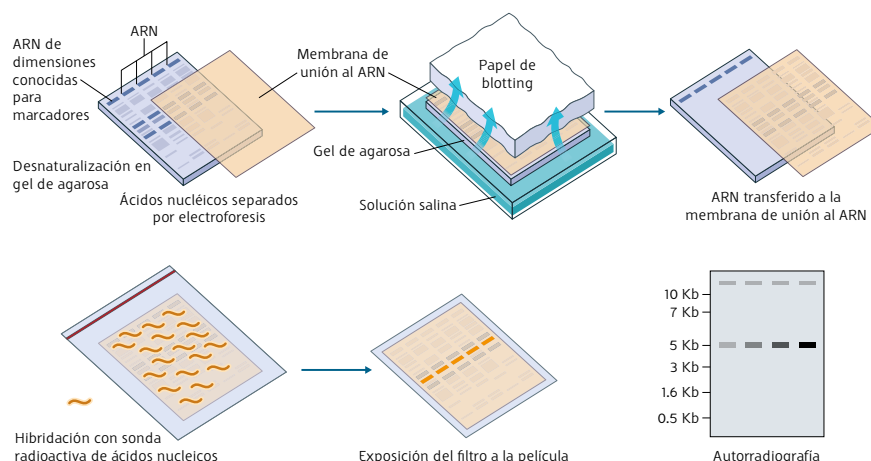


Fig. 4. Procedimiento de la técnica Northern blot.

La hibridación Northern blot es una **variación** de la técnica de Southern blot, con unas diferencias que se recogen en la Esquema 6.

No se realiza digestión con enzimas de restricción	Las moléculas de ARN son más pequeñas y no se requiere fraccionarlas para su análisis.
La electroforesis debe realizarse en condiciones desnaturalizantes	La separación de la muestra se realiza mediante la desnaturalización del gel de agarosa con formaldehído, para evitar la formación de uniones intracatenarias entre regiones de ARN con secuencias complementarias.
No existe desnaturalización previa a la transferencia de ARN del gel a la membrana	El ARN es monocatenario, con lo que no se necesita realizar la desnaturalización previa a la transferencia del ARN a la membrana.
Es necesario realizar las determinaciones rápido y evitando el contacto con las ARNasas	El ARN es una molécula que se degrada con mucha facilidad, por lo que debe evitarse la acción de las ARNasas endógenas y exógenas.

Esquema 6. Diferencias entre las hibridaciones Northern blot y Southern blot.

B. Aplicaciones del Northern blot

El Northern blot es utilizado principalmente para detectar y cuantificar el ARN en una muestra. Algunas de las aplicaciones del Northern blot son:

- » **Análisis de expresión génica:** para estudiar la expresión de genes específicos en diferentes tejidos, células o condiciones experimentales al detectar la presencia y cantidad de ARN mensajero (ARNm) correspondiente.
- » **Identificación de transcripción alternativa:** detección de diferentes isoformas de ARNm generadas por transcripción alternativa de un gen, lo que puede proporcionar información sobre la regulación genética y la función de las diferentes isoformas.
- » **Estudio de procesamiento de ARN:** consiste en investigar el procesamiento post-transcripcional del ARN precursor (ARN pre-mensajero) en ARNm maduro, incluyendo la identificación de sitios de corte y empalme alternativos.
- » **Análisis de ARN no codificante:** para detectar y cuantificar la presencia de ARN no codificante, como ARN largos no codificantes (lncRNA) o ARN pequeños no codificantes (sncRNA), lo que puede proporcionar información sobre su función biológica.
- » **Diagnóstico de enfermedades:** puede utilizarse en investigación clínica para detectar cambios en los niveles de expresión génica asociados con enfermedades, como cáncer, trastornos metabólicos, enfermedades neurodegenerativas, etc.

- » **Validación de datos de microarrays:** permite confirmar los resultados obtenidos en estudios de expresión génica mediante microarrays, proporcionando una validación independiente de los niveles de expresión de genes específicos.

3.5. Microarrays

DEFINICIÓN

Un **«array»** es un conjunto de elementos similares dispuestos de forma ordenada. Un **«microarray»** de ADN es un conjunto de detectores compuestos de ADN que se sitúan sobre un soporte sólido y que permiten estudiar miles de genes a la vez. El concepto microarray en biología molecular es sinónimo de **«microchip de ADN»**.

Cada material genético que se coloca en el array es un gen **de situación y características conocidas**, y la información que genera se refiere al estatus de ese gen en la muestra analizada. La muestra problema, previamente marcada, se pone en contacto con el array, hibridando en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas.

Las principales **diferencias** de esta técnica con las dos anteriores puedes verlas en la Esquema 7.

Southern blot/Northern blot

- La muestra de ADN o ARN con la secuencia diana se fija al soporte sólido (membrana de nailon o nitrocelulosa).
- Se marca la sonda que se incuba con la muestra para formar el híbrido.
- La sonda se puede marcar con métodos de detección directa (isótopos radioactivos, fluorocromos o enzimas) o métodos de detección indirecta (haptenos).

Microarrays

- La sonda se fija al soporte sólido (vidrio, plástico o silicio).
- Se marca la muestra de ácido nucleico que se incuba con la sonda para formar el híbrido.
- Se utiliza el marcaje por fluorescencia porque permite automatizar el análisis con facilidad y se pueden detectar simultáneamente varias señales.

Esquema 7. Diferencias entre las técnicas de hibridación en soporte sólido.

IMPORTANTE

En un estudio de hibridación con microarrays, solo en los puntos donde haya ocurrido hibridación habrá **fluorescencia** y la **intensidad** de esta será proporcional al nivel de expresión del gen.

Una técnica de hibridación por microarrays incluye una serie de etapas, algunas las cuales se corresponden con las de un protocolo genérico de hibridación:

- 1. Marcaje de la muestra con fluorocromo:** en este paso, la muestra de interés, que puede ser ADN o ARN, se marca con un fluorocromo, es decir, se le agrega un compuesto fluorescente que permitirá su detección posterior en el microarray. Esto es necesario porque las sondas fijadas al microarray no están marcadas, por lo que necesitamos marcar la muestra para que podamos identificarla una vez que se haya hibridado con las sondas del microarray.
- 2. Hibridación:** durante esta etapa, la muestra marcada se hibrida con las sondas específicas que están fijadas en el microarray. Para conseguirlo se emplean unas condiciones controladas de temperatura y humedad, donde las moléculas de la muestra y las sondas complementarias forman híbridos estables. La temperatura y el tiempo de hibridación pueden variar según las especificaciones del fabricante del microarray y las características de la muestra.
- 3. Lavados poshibridación:** después de la hibridación, es necesario eliminar las moléculas no unidas o híbridos imperfectos. Esto se logra mediante lavados con soluciones que eliminan estas moléculas sin afectar los híbridos perfectos. Los lavados poshibridación son muy importantes para reducir el ruido de fondo y mejorar la especificidad de la detección.
- 4. Lectura del microarray:** una vez que se ha completado la hibridación y los lavados poshibridación, el microarray se lee utilizando un escáner de fluorescencia que detecta la fluorescencia emitida por las muestras marcadas que se han unido a las sondas en el microarray. Esta información se registra en forma de imagen, donde cada punto del microarray corresponde a una posición específica que representa la presencia y la intensidad de la señal fluorescente.
- 5. Análisis e interpretación de los resultados:** Finalmente, los datos de la imagen del microarray se analizan utilizando software especializado que permite cuantificar la intensidad de la señal en cada punto del microarray. Estos datos se comparan con controles y se pueden utilizar para determinar la expresión génica, identificar mutaciones genéticas, estudiar la interacción de proteínas, entre otros análisis. La interpretación de los resultados depende del objetivo del experimento y puede requerir el uso de herramientas bioinformáticas para analizar la gran cantidad de datos generados.

Los microarrays tienen múltiples aplicaciones, entre ellas:

- » Realizar perfiles de expresión génica.
- » Detectar riesgo o susceptibilidad para presentar enfermedades genéticas.
- » Obtener mapas cromosómicos.
- » Detectar nuevos oncogenes o genes supresores de tumores.

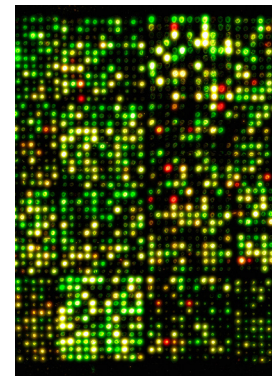


Fig. 5. Chip de ADN microarray, estructura del genoma humano.

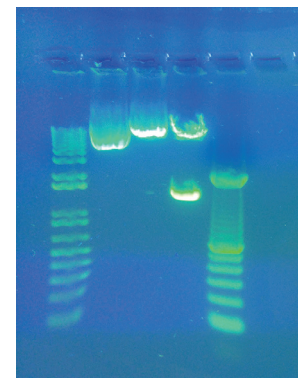
3 CASO PRÁCTICO



DIGESTIÓN DEL ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Vas a utilizar una muestra de ADN purificado para el diagnóstico molecular del síndrome X frágil mediante la técnica de hibridación Southern blot. Cuando realizas la técnica, en primer lugar, fragmentas el ADN con una endonucleasa de restricción y separas los distintos fragmentos en un gel de agarosa mediante electroforesis. El resultado obtenido en esta primera parte de la técnica se muestra en la imagen.

Analiza el resultado obtenido e identifica la muestra fragmentada por enzimas de restricción.



SOLUCIÓN

Los pocillos 1 y 5 se corresponden con el marcador de peso molecular. Las muestras 1 y 2 están sin fragmentar por enzimas de restricción y la muestra 3 es el resultado de una molécula de ADN digerida por una endonucleasa de restricción (un punto de corte = dos fragmentos de ADN).

04 Hibridación en fase líquida

En estas técnicas, el híbrido entre el ácido nucleico que se quiere detectar y la sonda se produce en disolución, y se fija posteriormente a la pared de un recipiente.

Existen dos procedimientos: la técnica de captura de híbrido y la tecnología del ADN ramificado.

A. Técnica de captura de híbrido

Se basa en la formación de híbridos ADN/ARN que van a ser reconocidos o capturados por anticuerpos específicos.

Los anticuerpos específicos que se emplean están diseñados para reconocer el heterodúplex, que se llama así al estar formado en parte por ADN (virus) y otra parte por ARN (sonda). Estos anticuerpos están fijados recubriendo las paredes de los pocillos de una placa microtiter.

Esta técnica se usa ampliamente para la detección del **virus del papiloma humano** (VPH), y se realiza en las siguientes fases:

- 1. Separación de las cadenas:** se trata la muestra con un tampón básico y aumentando de temperatura lisan las células y los virus, y se consiguen cadenas de ADN aisladas. Además se eliminan los híbridos endógenos de ADN/ARN que podrían interferir.
- 2. Formación de los híbridos:** cuando se añade la sonda de ARN a la muestra, en las condiciones adecuadas, si el ADN vírico está presente, se formará el complejo ADN/ADN, ya que el tamaño completo de la sonda reconoce la totalidad del genoma vírico. Este heterodúplex servirá como molécula objetivo en el análisis.
- 3. Captura de los híbridos ADN/ARN:** los heterodúplex son capturados por los anticuerpos que están fijados en las paredes de los pocillos de la placa. Estos anticuerpos deben ser altamente específicos, y no unirse a hebras simples de ADN, ARN, híbridos ADN/ADN ni híbridos ARN/ARN.
- 4. Marcaje de los híbridos:** se usan otros anticuerpos anti-híbridos que están marcados con una enzima que es capaz de degradar un sustrato luminiscente, consiguiendo amplificar la señal miles de veces. Estos anticuerpos se unirán a las moléculas ADN/ARN cuando estén presentes, de forma que los híbridos están unidos por un lado a los anticuerpos marcadores y por otro lado a los anticuerpos de captura explicados en el punto anterior.

5. **Detección de la señal:** la señal producida por el producto que aparece por la degradación enzimática del sustrato cromogénico, es leída con un luminómetro.

B. Tecnología del ADN ramificado (*branched DNA*)

En este sistema la señal se amplifica mediante la unión de la secuencia diana a un macrocomplejo de ADN de tipo arborescente, mediante sucesivas hibridaciones encadenadas. Los objetivos son aumentar la sensibilidad de las técnicas de captura de híbrido además de poder cuantificar la carga viral en una muestra biológica.

Se emplea para diagnosticar infecciones víricas causadas por virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y citomegalovirus (CMV).

El procedimiento se realiza en las siguientes fases:

1. **Lisis de los virus y desnaturalización:** es necesaria la liberación del material genético. La desnaturalización solamente hace falta en el caso de virus de ADN.
2. **Hibridación:** para la hibridación con el material genético vírico se incuba la muestra desnaturalizada con dos tipos de sondas. Una de ellas complementaria al ácido nucleico del virus y al oligonucleótido fijado, llamada **sonda de captura**, y otra llamada **sonda de extensión**, complementaria con otra región del ADN vírico y un oligonucleótido preamplificador, que se usará a continuación.
3. **Captura del híbrido:** la mezcla se dispensa sobre los pocillos de una placa microtiter recubierta con **oligonucleótidos de captura**, que están fijados a la pared, y que se unirá al híbrido dejándolo retenido.
4. **Preamplificación:** se añaden al pocillo **oligonucleótidos preamplificadores** que son complementarios a una parte de la sonda de extensión y a una parte de los oligonucleótidos amplificadores. Con esto se consigue formar el "tronco" del sistema de amplificación.
5. **Amplificación:** se añaden al pocillo los **oligonucleótidos amplificadores** que son complementarios a una parte del oligonucleótido preamplificador y a una parte de oligonucleótidos marcados con una enzima. Cuando estos oligonucleótidos se unen al complejo anterior, se desarrollarán las "ramas" del sistema de amplificación.
6. **Marcado del híbrido:** para que se ponga de manifiesto de forma indirecta la presencia del material genético vírico se añaden **oligonucleótidos marcados** con una enzima que hibridan con el oligonucleótido amplificador formando las "hojas" del sistema de amplificación.

- 7. Detección:** se añade un sustrato quimioluminiscente degradado por la enzima que estaba unida al oligonucleótido marcado, generando luminiscencia que puede ser detectada de distintas formas.



Fig. 6. Quimioluminiscencia en tubo de ensayo.

4

CASO PRÁCTICO



DIAGNÓSTICO DE VPH

La técnica de hibridación de captura de híbrido es la primera prueba aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para la detección de los genotipos carcinogénicos del virus del papiloma humano (VPH). Se debe realizar la prueba de captura híbrida cuando el resultado de la prueba de Papanicolaou muestra alguna anomalía. En el laboratorio donde trabajáis este tipo de prueba para el diagnóstico del VPH. Elabora un pequeño resumen sobre esta técnica que te sirva para facilitar esta información a una paciente interesada.

SOLUCIÓN

La técnica de captura de híbrido es una técnica de hibridación en medio líquido en la que el híbrido secuencia diana-sonda se forman en solución. En estas técnicas no se marca la sonda ni la muestra y el híbrido se detecta por métodos indirectos. En concreto, en la captura de híbrido se reconoce mediante anticuerpos específicos. El virus del papiloma humano es un virus de ADN y se dispone de una muestra cervical. Los pasos que incluye la técnica son:

1. Lisis de los virus y desnaturalización del ADN. Se le añade a un volumen de muestra una solución alcalina desnaturalizante.
2. Hibridación. Se pone en contacto la muestra desnaturalizada con la sonda de ARN en las condiciones adecuadas para la hibridación.
3. Captura del híbrido. Se añade la muestra resultante de la hibridación a los pocillos de una placa microtiter en cuya pared están fijados anticuerpos anti-ARN/ADN. Los anticuerpos y los híbridos quedan retenidos en los pocillos al retirar la muestra.
4. Detección del híbrido. Se añade a los pocillos anticuerpos anti-ARN/ADN marcados con fosfatasa alcalina. Se incuban para que se unan también al híbrido.
5. Revelado. Se añade un sustrato quimioluminiscente a los pocillos que, junto con la fosfatasa alcalina, produce luminiscencia. Debe analizarse en un lector de placas.

05 Técnicas de hibridación en cromosomas y tejidos

DEFINICIÓN

Las técnicas de hibridación *in situ* son aquellas que se realizan **directamente sobre tejido**, células o cromosomas localizados sobre un soporte sólido (por lo general, un portaobjetos). La **visualización** de la hibridación se realiza mediante fluorescencia en el caso de la FISH (hibridación *in situ* fluorescente) y por una sustancia cromogénica en la CISH (hibridación *in situ* cromogénica).

Las técnicas de hibridación *in situ*, al igual que cualquier técnica de hibridación, requieren la realización de los pasos siguientes:

- 1. Pretratamiento de la muestra.** Consiste en hacer que la secuencia de ácido nucleico que detectar sea accesible a la sonda.
- 2. Desnaturalización.** Se separan las dos cadenas de DNA.
- 3. Hibridación.** Permite la hibridación de los ácidos nucleicos en presencia de una sonda marcada.
- 4. Visualizar la reacción.** Mediante revelado inmunológico u otro método de visualización.

La tecnología de la hibridación *in situ* está en **pleno desarrollo** y su **rápida expansión** se debe a la disponibilidad de un número de sondas cada vez mayor y a la posibilidad de realizar marcapos múltiples en los que se combinan de forma simultánea sondas diferentes en la misma célula.

Se diferencian **dos tipos** de hibridación *in situ* en función del marcador empleado: hibridación *in situ* fluorescente (FISH) e hibridación *in situ* cromogénica (CISH).

La principal ventaja de los métodos de hibridación *in situ* respecto a otros métodos de hibridación son:

- » Especificidad por células individuales en un tejido heterogéneo o una población celular.
- » Alta sensibilidad para determinar la expresión de un gen específico incluso aunque sea baja.

- » Se puede hacer un mapeo genético cromosomal.
- » Se mantiene la morfología del tejido.
- » Empleo de marcadores no isotópicos.

No obstante, es importante considerar que existen ciertas desventajas:

- » Es costosa ya que requiere espacios, infraestructuras y equipos adecuados.
- » El personal debe ser capacitado y entrenado para realizar esta técnica.
- » El tiempo de estandarización puede ser prolongado.

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

- Se basa en sondas marcadas con fluorocromos.
- Es necesario un microscopio de fluorescencia.
- Menor tiempo de procesado.
- Mayor sensibilidad de la sonda.
- Permite trabajar con dos, tres o cuatro sondas de distinto color.

Hibridación *in situ* cromogénica (CISH)

- El híbrido se detecta mediante reacción inmunohistoquímica.
- Requiere microscopio óptico convencional.
- Mayor tiempo de procesado.
- Mayor estabilidad de la sonda.
- Permite trabajar con una o dos sondas de distinto color.

Esquema 8. Diferentes entre las técnicas de hibridación *in situ*.

5.1. Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés *fluorescence in situ hybridation*) fue desarrollada en 1984 por Pinkel y Gray. Permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante **sondas fluorescentes** (marcadas con fluorocromos) sobre células tanto en metafase como en interfase.

Esta técnica es útil en la detección de alteraciones numéricas y estructurales cromosómicas, mapeo de cromosomas metafásicos, detección de microorganismos, localización precisa de puntos de rotura cromosómica en tumores, búsqueda de nuevos genes implicados en el cáncer y detección de genes ya conocidos.

La FISH se aplica sobre extensiones cromosómicas o secciones de tejidos, y las sondas que se emplean se hibridan con los ácidos nucleicos de las células, que pueden estar en diferente grado de condensación, desde cromosomas metafásicos hasta ADN en interfase. Para conseguir que estén disponibles los núcleos, se puede partir de distintos tipos de muestras biológicas, algunos de los más habituales son:

1. **Muestras de tejido fijado:** son el resultado de biopsias que luego se fijan en formol para preservar la estructura celular. Se utilizan en estudios de diagnóstico para la detección de anomalías genéticas en células cancerosas, la identificación de

microorganismos patógenos en tejidos infectados y la evaluación de la expresión génica en muestras de tejido.

2. **Muestras de sangre periférica:** se consiguen mediante una extracción de sangre venosa y se utilizan para estudiar anomalías genéticas en células sanguíneas, como la detección de aberraciones cromosómicas en leucemias y otras enfermedades hematológicas.
3. **Muestras de tejido congelado:** se obtienen mediante biopsias o intervenciones quirúrgicas y se congelan rápidamente para preservar las estructuras celulares y las moléculas de ácidos nucleicos. Se utilizan para estudios de investigación que requieren preservación de la actividad enzimática y la integridad de las moléculas de ácidos nucleicos.
4. **Muestras de líquidos corporales:** a partir de muestras de orina, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico u otros fluidos corporales y se utilizan para la detección de anomalías cromosómicas, como aneuploidías, en células de tejido coriónico o en células fetales.

El protocolo de la técnica de FISH incluye los **pasos** que se recogen en la siguiente tabla.

En cierto tipo de muestras, en primer lugar es necesario **fijar las células** para que conserven su estructura, cuando es importante que el estudio tenga en cuenta las características histológicas del tejido. Para esto se puede usar formaldehído al 4 % a 4 °C durante 4 horas. Además, la **permeabilización de la membrana** permitirá que las sondas marcadas puedan entrar y alcanzar el material genético al que se van a unir.

En el caso de que se trate de extensiones cromosómicas, no hará falta ni fijar las células ni permeabilizar las membranas, ya que no existen ninguna de las dos. La extensión cromosómica se consigue por goteo (véase Unidad 3), quedando los cromosomas dispuestos sobre un portaobjetos.

El proceso de **hibridación** se produce añadiendo a la muestra preparada una sonda desnaturalizada que reconocerá la secuencia de interés y se unirá a ella. Esta fase debe hacerse en unas condiciones adecuadas para favorece la formación de híbridos perfectos y el menor porcentaje de mismatch posible.

Las láminas sobre las que se ha hecho la hibridación deben someterse a un proceso de **lavado** con agua destilada o un tampón adecuado para eliminar la sonda que no ha hibridado así como los híbridos imperfectos.

Por último, se aplicará una **tinción de contraste** que se une de forma inespecífica a todo el ADN de la célula. Esto permite visualizar el núcleo completo en la modalidad interfásica

o los cromosomas en la metafásica para facilitar la localización de la sonda unida. Como agente colorante se usa el diaminofenil-indol (DAPI).

Para la **visualización** de las preparaciones teñidas y poder estudiar los núcleos o cromosomas se debe usar un microscopio de fluorescencia con diferentes filtros para espectros de color.

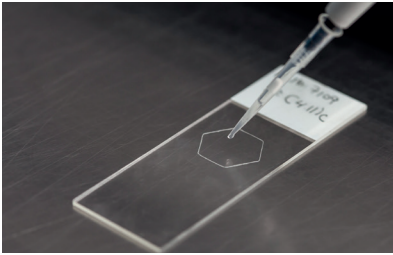
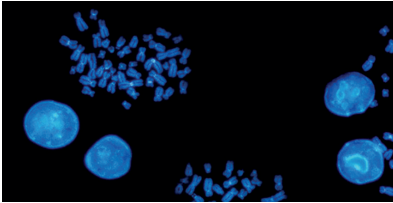
PASOS	IMAGEN
1. Fijación y permeabilización de la muestra	
2. Hibridación	
3. Lavado	
4. Tinción de contraste	
5. Visualización	

Tabla 7. Diagrama de flujo de un procedimiento de FISH.

Cuando se trata de tinciones de cromosomas, existen dos tipos de FISH según el estado de condensación en el que se encuentre el material genético: **FISH interfásica** y **FISH metafásica**. Estas dos técnicas permiten la identificación de alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales, mejorando los resultados que se conseguían con los estudios citogenéticos vistos en la unidad 3.

Para la **FISH interfásica** se pueden usar los siguientes tipos de sondas:

Sondas centroméricas (CEP)	Su diana son secuencias localizadas en los centrómeros de cromosomas concretos. Se las denomina como CEPx, siendo la "x" el número del cromosoma. La sonda CEP5, por ejemplo, hibrida con el centrómero del cromosoma 5. Se usan para el estudio de anomalías cromosómicas numéricas.
Sondas específicas de locus (LSI):	Se unen a secuencias diana específicas que están localizadas en un cromosoma concreto en condiciones normales. Permiten detectar anomalías cromosómicas numéricas como microdeleciones y microamplificaciones.
Sondas de separación (<i>Split-probes</i>):	Son un tipo de sondas LSI especiales, cuya diana está a ambos lados del punto de rotura en el cromosoma implicado en la alteración. Se usan siempre un juego de sondas, cada una con un color diferente (verde y rojo), y permiten la detección de traslocaciones. Si no hay alteración, las sondas aparecen como puntos amarillos, pero en el caso de que exista una traslocación, se podrán observar un punto verde y otro rojo, además del amarillo normal.
Sondas de fusión (<i>fusion-probes</i>)	Son el otro tipo especial de sondas LSI, y también se usan por pares, pero en este caso la translocación se pone de manifiesto por la aparición de algún punto amarillo, que significa que las sondas se han reunido.

La **FISH metafásica** permite el uso de algunas sondas además de las que hemos visto en la FISH interfásica:

Sondas centroméricas (CEP)	tienen las mismas características que las usadas en la FISH metafásica.
Sondas teloméricas (TEL)	son sondas que tienen como diana secuencias localizadas en las regiones teloméricas.
Sondas específicas de locus (LSI)	tienen las mismas características que las usadas en la FISH metafásica.

Estas sondas se pueden combinar y aplicar sobre los cromosomas según varias técnicas:

- » **FISH para pintado de cromosomas enteros (WPC-FISH):** se usan sondas marcadas con el mismo fluorocromo que hibridan completamente con el cromosoma dándole un color uniforme. Sirven para detectar anomalías numéricas y traslocaciones.
- » **FISH multicolor (M-FISH):** el uso de grupos de sondas marcadas con distintos fluorocromos para hibridarse con regiones distintas del mismo cromosoma que queda con una coloración heterogénea. El bando multicolor es característico de cada cromosoma, permitiendo estudiar anomalías estructurales.

- » **Cariotipo espectral (SKY):** para esta aplicación se combinan dos técnicas que se han visto antes, la WCP y la M-FISH. Se usan sondas WCP marcadas cada una con varios fluorocromos diferentes. Estas hibridan con regiones distintas de cada cromosoma proporcionándoles un color heterogéneo. Se pueden detectar múltiples anomalías numéricas y estructurales en cariotipos que son bastante complejos.
- » **Hibridación genómica comparada convencional (CGH):** el principio es el mismo que en la hibridación genómica comparada con microarrays, y es útil para el estudio de deleciones o duplicaciones que pueden tener un tamaño de hasta varias megabases.

Para comprobar que la técnica se ha realizado adecuadamente, se emplean 4 tipos de controles:

- » **Control positivo de la técnica:** tiene como misión comprobar si los reactivos funcionan correctamente, para lo cual se procede a la hibridación de una muestra conocida de la que se sabe previamente que contiene la secuencia diana.
- » **Control positivo de la muestra:** sirve para comprobar que el tejido no se ha deteriorado tras el tratamiento y la fijación, y que está en condiciones para ser utilizado y ofrecer resultados fiables. En este caso se usan sondas específicas para hibridar con secuencias repetidas, que se fijarán si la muestra está íntegra.
- » **Control negativo de la técnica:** si la muestra se incuba con un reactivo que contiene todos los componentes menos la sonda, no se debe producir la hibridación, y el resultado siempre debe dar negativo. De esta forma se pone de manifiesto que ningún elemento del reactivo realiza una tinción inespecífica.
- » **Control negativo de la muestra:** es necesario comprobar también que el resultado es específico en la muestra y para ello, se cambia la sonda específica para la secuencia diana que se está estudiando, por otra que tiene secuencias no complementarias con los ácidos nucleicos de la muestra. Al no ser la sonda adecuada, no se debería producir hibridación y los resultados deberían ser negativos.

5.2. Hibridación *in situ* cromogénica (CISH)

La hibridación *in situ* cromogénica (CISH) se ha desarrollado en 2000 como una **alternativa simple y práctica** de la hibridación *in situ* fluorescente que no necesita microscopio de fluorescencia. Además, permite la visualización en el contexto del tejido, incluido el núcleo y la forma celular, junto con la señal de la sonda en la misma imagen.

El híbrido se detecta mediante una **reacción inmunohistoquímica** que produce un producto coloreado fácilmente identificable con un microscopio óptico convencional. A diferencia de los fluorocromos, los agentes cromogénicos utilizados son químicamente estables y no desaparecen con el tiempo, lo que permite almacenar las muestras con facilidad.

Se realiza sobre **secciones fijadas en tejido FFPE** (tejidos fijados en formol e incluidos en parafina). Es una técnica muy utilizada en los laboratorios de anatomía patológica dirigida más al diagnóstico anatomopatológico que a la detección de alteraciones cromosómicas. Los tejidos FFPE emiten una leve fluorescencia al visualizarlos con el microscopio de fluorescencia, motivo por el cual se recomienda usar CISH con estas muestras, en lugar de FISH.

El protocolo de la técnica de CISH incluye los **siguientes pasos**:

1. **Desparafinado y rehidratación:** en esta etapa, se elimina la parafina utilizada para fijar y preservar las muestras. Para ello, el tejido se sumerge primero en **xilol**, un solvente orgánico, que disuelve la parafina. Posteriormente se rehidrata en una serie de baños con alcoholes con graduación decreciente hasta llegar a agua destilada. Con este proceso se favorece que el tejido quede accesible para las enzimas y las sondas de hibridación.
2. **Digestión enzimática:** se emplean enzimas, como la **proteínasa K** o la **pepsina**, para digerir las proteínas y permeabilizar las membranas celulares. Así se consigue liberar los ácidos nucleicos de su unión con las histonas y permite que las sondas de hibridación accedan a la secuencia diana.
3. **Prehibridación:** durante esta etapa, se cubre el tejido con una solución de prehibridación que contiene espermatozoides de salmón fragmentados, con una gran carga de ADN. El objetivo es bloquear las uniones inespecíficas de la sonda de hibridación, favoreciendo la formación de híbridos perfectos.



Fig. 7. Prehibridación.

4. **Hibridación:** se añade una pequeña cantidad de la sonda de hibridación sobre el tejido, que contiene la secuencia complementaria a la secuencia diana que se está investigando. Este proceso se realiza sobre una placa calefactora para desnaturalizar la doble cadena de ADN y permitir que la sonda se hibride con la secuencia diana. Luego, el tejido se incuba en una cámara húmeda para facilitar la hibridación específica.

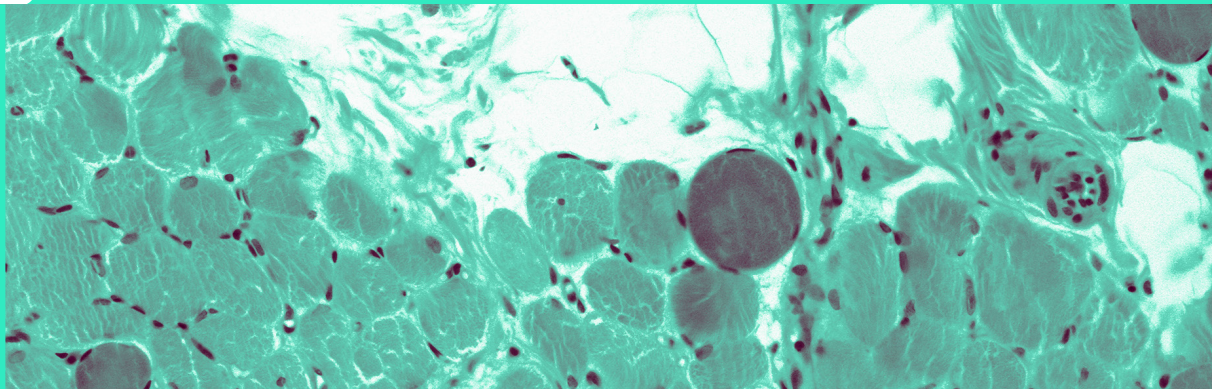


Fig. 8. Hibridación.

5. **Lavados poshibridación:** después de la incubación para la hibridación, se necesita lavar los portaobjetos para eliminar las sondas no hibridadas y cualquier híbrido que se haya formado mediante uniones inespecíficas. Estos lavados son importantes para incrementar la especificidad, lo cuál se consigue regulando las condiciones de rigurosidad, como hemos explicado durante la unidad.
6. **Contratinción:** se realiza una tinción suave del tejido que nos permite analizar con más facilidad el resultado de las hibridaciones, teniendo en cuenta los detalles morfológicos. Así se pueden visualizar mejor las áreas donde la sonda se ha hibridado específicamente. Por ejemplo, se puede utilizar la tinción de **hematoxilina de Mayer** para resaltar las estructuras celulares y contrastarlas con las manchas coloreadas que indican la presencia de la sonda.
7. **Visualización:** finalmente, las preparaciones se visualizan en un microscopio óptico compuesto para localizar la señal emitida por las sondas hibridadas.

5

CASO PRÁCTICO



CITOGENÉTICA CONVENCIONAL O FISH

La enfermedad de Duchenne es una distrofia muscular ligada al cromosoma X que afecta al gen que codifica la distrofina. La identificación de la mutación causante de la enfermedad es necesaria para proporcionar consejo genético.

Debes diagnosticar esta enfermedad en el laboratorio. ¿Qué técnica realizarías? Indica cuáles crees que son las diferencias entre un cariotipo convencional y una hibridación *in situ* fluorescente.

SOLUCIÓN

Cariotipo convencional

- Se necesitan células en división.
- Requiere tejido fresco.
- Bajo coste económico.
- Detecta alteraciones de todo el genoma.

Hibridación *in situ* fluorescente

- No requiere células en división.
- Permite estudiar tejido congelado o en parafina.
- Moderado coste económico.
- Solo aporta información de la sonda que se utiliza.

X T A R T
FP SALUD