



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudio de las condiciones óptimas de la  
técnica de la difenilamina para la  
cuantificación del ADN hepático  
de la rata**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
P R E S E N T A  
**HECTOR GERMAN MACIAS HERNANDEZ**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Indice

Introducción

Objetivos

Capítulo 1.- Comentarios sobre los ácidos nucleicos

1.1 Acido desoxirribonucleico

1.2 Acido ribonucleico

Capítulo 2.- Métodos químicos para la cuantificación de ácidos nucleicos

2.1 Extracción y separación

2.2 Utilización de la difenilamina

2.3 Modificaciones a la técnica de la difenilamina

Capítulo 3.- Material y método

3.1 Material

3.2 Material biológico

3.3 Equipo

3.4 Procedimiento

Capítulo 4.- Resultados

Capítulo 5.- Comentarios y conclusiones

Referencias bibliográficas

## Introducción

En los últimos veinte años, uno de los problemas más significativos en la investigación, es el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales las hormonas regulan los procesos bioquímicos en los tejidos de los animales superiores. Los trabajos experimentales en modelos animales, han permitido conocer algunos de los procesos que integran parte de estos mecanismos.

La interacción hormona-receptor se demostró en tejidos específicos "blanco" (1), así como en tejidos considerados "no blanco" (3, 11), lo que plantea para estos últimos, las preguntas sobre la naturaleza, propiedades y funciones de esos receptores; y si estas características son semejantes o diferentes a aquellas de los receptores a la misma hormona, presentes en los tejidos "blanco".

Los estudios realizados han mostrado, por ejemplo, en roedores machos como la rata, que la castración en su vida prepuberal o la administración de antagonistas androgénicos durante la vida fetal o perinatal, trae como consecuencia la manifestación de funciones de tipo "femenino" en el adulto (15, 17).

Así, algunos investigadores (8, 10), al estudiar el patrón enzimático específico del metabolismo del cortisol en homogeneizados de hígado de rata macho, observaron el desarrollo de un patrón "masculino" predeterminado por la acción hormonal androgénica en los primeros días de la vida del animal. Se ha propuesto a la testosterona como el factor testicular que durante la vida neonatal de la rata induce o bien organiza nuevos sistemas enzimáticos que se expresan durante la pubertad, disminuyendo o eliminando las potencialidades básicas "femeninas" (9).

La aparente "masculinización" en el patrón de enzimas del metabolismo hepático de esteroides (11), dió origen a la propuesta de clasificar a un grupo de enzimas, como programadas irreversiblemente por hormonas androgénicas durante la etapa prepuberal; se postuló que tal vez los efectos neonatales de los andrógenos influyan en la unión de los esteroides en algunos tejidos "no blanco", como el hígado, durante la vida adulta de la rata.

En el laboratorio de Endocrinología Molecular de la Unidad de Investigación Biomédica del I.M.S.S., dentro de sus proyectos de investigación el grupo pretende entre sus objetivos inmediatos, caracterizar a un receptor estrogénofílico que ha sido aislado y purificado (26) en la rata recién nacida. Estudiar el efecto de la gonadectomía sobre la presencia del receptor hepático para

estradiol con el propósito de esclarecer el posible mecanismo involucrado en el control de la concentración circulante de la hormona, mismo que servirá como paso inicial para aclarar la presencia y la función del receptor estrogénofílico, mediante estudios analíticos en fracciones citosólica y nuclear hepáticas.

Para el desarrollo del trabajo experimental, se requiere seleccionar, establecer y estandarizar diversas técnicas de medición para la caracterización del receptor estrogénofílico hepático; entre éstas, es necesario contar con un procedimiento confiable y práctico para medir el contenido de ADN en tejido total y núcleos hepáticos purificados, cuyos resultados determinen la capacidad de unión de las fracciones citosólica y nuclear (núcleos purificados) con los complejos hormona-receptor.

Al inicio del trabajo experimental se desarrolló la técnica propuesta por Giles-Myers para la cuantificación del ADN por colorimetría. No se lograron resultados confiables, a pesar de seguir fielmente las indicaciones dadas por los autores, así por ejemplo, los datos de cuantificación de solución de patrones primarios de ADN carecían de reproducibilidad y exactitud.

Por tal motivo, en este trabajo se consideró necesario estandarizar la técnica de valoración con difenilamina que comprendió las siguientes etapas: determinar la capacidad de solubilización del estándar primario en medios ácidos y alcalinos; estudiar las concentraciones óptimas y el orden de adición adecuado de los reactivos para la formación de los complejos coloridos y llevar a cabo su validación.

**Objetivos:**

- 1.- Recopilar, analizar y seleccionar la información sobre las técnicas y procedimientos para la cuantificación del ADN.
- 2.- Adaptar la técnica cuantitativa seleccionada.
- 3.- Establecer las condiciones de la técnica colorimétrica modificada.
- 4.- Estandarizar y evaluar la técnica seleccionada.

## Capítulo 1

### Comentarios sobre los ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos encontrados en todos los organismos vivos son de dos tipos: ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN), cuyas funciones biológicas primordiales son contener y transmitir la información genética.

Los ácidos nucleicos están formados por cadenas polinucleotídicas con enlaces fosfodiéster entre sus unidades (figura 1); en su composición difieren en una sola base pirimidínica, el ARN contiene uracilo y el ADN timina (figura 2). En cuanto a carbohidratos, la  $\beta$ -2-D-desoxirribosa se encuentra en el ADN y la  $\beta$ -D-ribosa en el ARN (figura 3).

#### 1.1 Acido desoxirribonucleico.

En 1943, se identificó al ADN como el portador de la información



genética (2); estudios posteriores de sus características fisicoquímicas condujeron a las siguientes conclusiones:

Las muestras de ADN aisladas de distintos tejidos de una misma especie poseen igual contenido (tabla 1 y 2), que no se modifica con la edad, nutrición o cambio de ambiente. Sin embargo, la composición es diferente de una especie a otra. En casi todos los ADN examinados, la suma de los pares de bases A + G es igual a la suma de los pares de bases C + T.

En las especies muy relacionadas, los ADN son de composición semejante, mientras que los de especies muy lejanas es posible que sean completamente distintos.

De hecho la composición de bases del ADN puede utilizarse para una clasificación taxonómica de los organismos.

En 1953, Watson y Crick (32) postularon un modelo tridimensional preciso para la estructura del ADN, basado en los datos de rayos X de Franklin y Wilkins (33) y en las equivalencias de bases de Chargaff (4).

Ese modelo no sólo explicaba muchas de las observaciones sobre propiedades químicas y físicas del ADN sino que sugería un posible mecanismo por medio del cual la información genética podía replicarse con exactitud.

La estructura del ADN consiste en dos cadenas polinucleotídicas (figura 5), enrolladas a un mismo eje y formando una doble hélice.

Las cadenas son antiparalelas y se orientan en direcciones

opuestas. En el interior de la hélice doble se encuentran las bases purínicas y pirimidínicas, con sus planos paralelos entre sí y perpendiculares al eje de la doble hélice, mientras que los grupos fosfato y los carbohidratos se ubican en su periferia.

Los pares permisibles son A - T y G - C, que son precisamente las parejas que muestran en el ADN una equivalencia (figura 6) (12). Las bases guanina-citosina están unidas por tres enlaces de hidrógeno y adenina-timina por dos (figura 4).

Con la utilización de los rayos X se observó una periodicidad de 3.4 Å. Para explicarla Watson y Crick postularon que las bases se encuentran apiladas en sentido perpendicular al eje largo, manteniendo una distancia entre ellas de 3.4 Å de centro a centro. Existen 10 nucleótidos en cada giro completo de acuerdo con la distancia secundaria de 34 Å. Además, un surco helicoidal o ranura mayor y otra menor (figura 5) (12).

Las cadenas polinucleotídicas son complementarias una de la otra, pero sólo puede existir tal complementariedad si las cadenas están orientadas en direcciones opuestas.

Con la técnica de difracción de rayos X de las cadenas del ADN, se dedujo que podía presentarse como mínimo en dos formas: la B (descubierta por Watson y Crick) y la A.

Además, ha sido posible observar ciertas secuencias alternantes de purinas y pirimidinas poco comunes, susceptibles de sufrir una conversión de hélice B dextrógira normal a levógira, llamada forma Z cuya identificación se debe a Alexander Rich (28).

El esqueleto del ADN-Z sigue una estructura más irregular que el de la forma B y los dos surcos (mayor y menor) que se encuentran a lo largo de la hélice B, se reemplazan por un único surco menor en el ADN-Z. Los átomos que determinan el surco mayor del ADN-B se desplazan hacia la superficie del dúplex de tipo Z.

Las formas poco usuales, como el ADN-Z, requieren del desenrollamiento del ADN-B; cualquier tensión sobre la molécula del ADN-B que tienda a desestabilizarla favorecerá la aparición de estas estructuras poco comunes. Este tipo de estructuras pudieran servir de señales de reconocimiento, importantes para la función biológica del ADN (figura 7).

#### Biosíntesis de nucleótidos.

Los nucleótidos se forman por diferentes vías: la biosíntesis de nucleótidos pirimidínicos y la biosíntesis de nucleótidos purínicos.

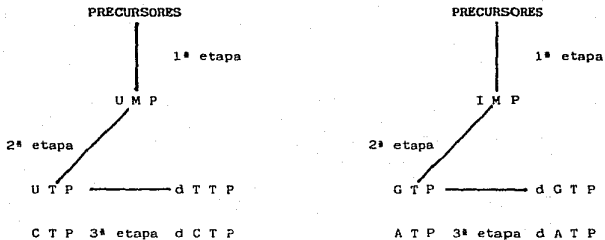
El uridín-5-monofosfato (UMP) es el producto final de la vía de las pirimidinas, el cual sirve como precursor de todos los nucleótidos, tanto los desoxirribonucleótidos como los ribonucleótidos pirimidínicos.

El inosín-5-monofosfato (IMP) es el producto final de la vía de las purinas, el cual es convertido en ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos purínicos.

La base nitrogenada en el UMP es uracilo y en el IMP es hipoxantina. En ambos procesos el componente fosforribosa es suministrado por el 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) (figura 8).

### Biosíntesis de UTP, CTP, GTP, ATP.

La formación de UMP e IMP representa la primer etapa; la segunda consiste en la conversión de estos ribonucleósidos a los ribonucleósidos trifosfatos: UTP y CTP a partir de UMP y GTP y ATP a partir de IMP. La tercer etapa implica los desoxirribonucleósidos trifosfatos, la conversión reductiva de  $\beta$ -D-ribosa en  $\beta$ -2-D-desoxirribosa ocurre a nivel del nucleótido; los desoxirribonucleósidos trifosfatos se requieren para la biosíntesis de ADN.



### Comportamiento del ADN en solución.

El ADN es un ácido polibásico fuerte; a pH superiores a 4 se une a iones divalentes y a proteínas básicas como las histonas y es así como se encuentra en la cromatina de células eucarióticas. La máxima estabilidad de los enlaces de hidrógeno está entre pH de 4 y 11, fuera de estos límites son inestables.

La rigidez de la estructura del ADN causa gran viscosidad, aún en soluciones muy diluidas, su coeficiente de sedimentación y su peso molecular se calculan por ultracentrifugación.

El ADN experimenta un desenrollamiento al azar al someterlo a: pH extremos, calor, disminución de la constante dieléctrica, diversas concentraciones de urea y solutos similares; la desnaturalización cambia sus propiedades físicas: disminuye la viscosidad, aumenta la absorción a 260 nm, la rotación óptica es más negativa y aumenta la densidad de flotación.

El efecto del aumento de absorción o efecto hipercrómico, está relacionado con el contenido de pares A - T, cuanto mayor es la cantidad de estos pares, mayor es la absorción.

La desnaturalización térmica o "fusión" ( $T_f$ ) aumenta proporcionalmente con el contenido de pares G - C; cuanto mayor es la cantidad de éstos, la estructura es más estable y se requerirá mayor energía para desestabilizarla.

### 1.2 Acido ribonucleico.

Para el funcionamiento normal de una célula el ARN es tan importante como lo son el ADN y las proteínas, ya que sin él, el mensaje genético nunca llegaría a expresarse.

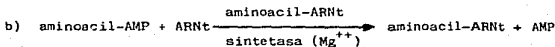
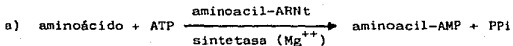
El ARN experimenta una maduración en su molécula inicial hasta transformarse en ARN mensajero (ARNm). Existen otros dos tipos de ARN; el ARN ribosomal (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt). Del ARN ribosomal, se han identificado tres especies, del ARN de transferencia se han encontrado hasta sesenta especies y del ARN mensajero se han conocido varios cientos.

En casi todas las células la cantidad de ARN es mayor que la del ADN; por ejemplo, en células eucarióticas el 11% del ARN

total se encuentra en el núcleo como ARNm, el 15% en la mitocondria como ARNt y ARNr, alrededor del 50% en los ribosomas como ARNr y cerca del 24% como ARNt en el citosol.

En las bacterias, el ARN se encuentra en el citoplasma; aproximadamente el 2% es ARNm; el 16% es de ARNt y el 82% como ARNr.

Para la síntesis de proteínas, las regiones con información específica en el ADN son transcritas al ARNm y en los ribosomas el mensaje es traducido en la proteína correspondiente; además se requiere que los aminoácidos se activen por una reacción que depende del ATP, convirtiéndolos en compuestos de alta energía muy reactivos, que junto con el ARNt forman el aminoacil-ARNt. La formación del complejo procede a través de dos etapas:



## Capítulo 2

### Métodos químicos para la cuantificación de ácidos nucleicos.

Los métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos han sido agrupados de la siguiente manera: cuantificación del fósforo, cuantificación de pentosas, absorción de luz ultravioleta y métodos fluorométricos.

En el primer método, para la cuantificación del fósforo, los compuestos que lo contienen son hidrolizados a fósforo inorgánico utilizando ácidos concentrados en caliente.

En cuanto a los métodos de determinación del ARN, por medio de la cuantificación de la ribosa basados en procedimientos

colorimétricos, incluyen la reacción con: orcinol, anilina, carbazol, antrona, etc. Dentro de éstos, la técnica de mayor uso ha sido la reacción con orcinol, cuyo paso inicial es la reacción de la pentosa en ácido caliente, transformándose en furfural, que al reaccionar con el orcinol desarrolla una coloración verde.

La determinación del ADN por la cuantificación de la desoxirribosa que reacciona con reactivos como: difenilamina, indol, cisteína, triptofano, cloroglucinol, p-nitrofenilhidrazina y entrona formando complejos coloridos. En el procedimiento de la difenilamina, descrito por Dische, la desoxirribosa reacciona con la difenilamina en una mezcla de ácido acético-sulfúrico a 100°C, dando una coloración azul estable (5). Burton (6) modificó la técnica al añadir acetaldehído con un calentamiento a 30°C por varias horas.

La cuantificación de los ácidos nucleicos por espectrofotometría en la región de luz ultravioleta se fundamenta en la absorción característica de las bases purínicas y pirimidínicas en la región de los 260 nm, proporcionando una medida para cuantificar ácidos nucleicos. La aplicación de este principio aprovecha dos propiedades de los ácidos nucleicos: la capacidad hipercrómica y la naturaleza aditiva de la absorción de nucleótidos en mezclas de ellos.

La alta sensibilidad de los métodos fluorométricos es empleada para la determinación de ácidos nucleicos en donde la cantidad de tejido puede estar limitada. Por este método, la desoxirribosa reacciona con el ácido 3,5 diaminobenzoico con una sensibilidad extraordinaria para medir hasta 2 ng de ADN. Una limitante del método es una extracción previa de lípidos.



## 2.1 Extracción y separación de ácidos nucleicos.

Para utilizar cualquiera de las técnicas de cuantificación del ADN o ARN anteriormente descritas, es necesario inicialmente extraer y separar estos compuestos a partir de los tejidos que los contienen.

De los métodos disponibles para fraccionar y separar los ácidos nucleicos la mayor parte de los autores han utilizado básicamente los descritos por: Schmidt-Thannhauser (30), Schneider (31), Ogur-Rosen (27) y Setaro-Morley (29).

En los tres primeros métodos, en los pasos iniciales se separan moléculas pequeñas y lípidos que interfieren en la cuantificación de los ácidos nucleicos.

La separación inicial de los compuestos de bajo peso molecular se hace por la precipitación con ácido tricloroacético, perclórico o sulfúrico seguido de una centrifugación o filtración. Los lípidos son extraídos por una variedad de disolventes, después de la precipitación con ácido en frío; por ejemplo el extracto de tejido se trata con etanol al 95% y una mezcla de etanol-éter 3:1 a ebullición; otras mezclas de disolventes son metanol-cloroformo o metanol-éter.

### Procedimiento de Schneider.

En esta técnica el homogeneizado de tejido se trata con ácido en frío, seguido de una extracción de lípidos con disolventes, enseguida se extraen los ácidos nucleicos con ácido tricloroacético al 5% a 90°C, durante 15 minutos. Después el ARN se cuantifica

con orcinol y al ADN con difenilamina.

Esta técnica fue utilizada por Hutchison, Downie y Munro (18) para la extracción de ácidos nucleicos en hígado y bazo de rata (figura 9).

#### **Procedimiento de Ogur-Rosen.**

Originalmente el método fue descrito para análisis en plantas y después modificado para tejido animal y microorganismos.

Los lípidos son extraídos inicialmente del tejido en estudio con disolventes, seguido por una separación de moléculas de bajo peso molecular con ácido perclórico 0.3 mol/L, después ácido perclórico 1 mol/L a 4°C 18 horas para separar el ARN, ambos ácidos nucleicos se valoran por el contenido de fósforo o las pentosas presentes (figura 10).

#### **Procedimiento de Schmidt-Thannhauser.**

La técnica es útil para obtener los ácidos nucleicos de plantas, tejido animal y microorganismos.

El homogeneizado de tejido es tratado primero con ácido en frío que extrae las moléculas de bajo peso molecular, seguido por una extracción lipídica y una hidrólisis alcalina con acidificación posterior, con lo cual se obtiene la fracción de ARN en el sobrenadante y en el precipitado ADN junto con proteínas. El ARN y el ADN se cuantifican por la medición del fósforo (figura 11).

#### **Procedimiento de Setaro-Morley.**

La técnica es útil para extraer ácido desoxirribonucleico de tejido hepático de rata.

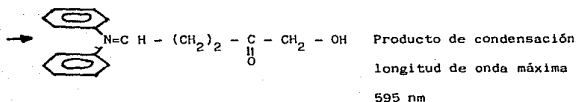
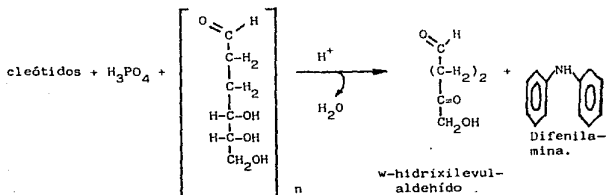
Se prepara el homogeneizado de tejido al 20% peso/volumen con solución salina (0.9%); se centrifuga descartando el sobrenadante que contiene proteínas solubles. El precipitado se lava dos veces con solución salina, ácido tricloroacético (0.6 mol/L) y acetato de potasio/etanol (1%), descartando el sobrenadante en cada paso.

El precipitado obtenido se trata con alcohol absoluto a 60°C durante 15 minutos, seguido de una centrifugación descartando el sobrenadante; se utiliza un secado a 40°C durante 15 minutos.

El ADN se extrae del precipitado mediante una hidrólisis con ácido perclórico 1 mol/L a 75°C, durante 30 minutos; posteriormente se centrifuga y en alícuotas del sobrenadante se valora el ADN por el contenido de la pentosa presente (la desoxirribosa reacciona con el ácido 3,5 diaminobenzoico), figura 12.

## 2.2 Utilización de la difenilamina en la cuantificación del ADN.

En 1930 Dische publicó la técnica para la medición del ADN utilizando difenilamina como reactivo principal.



Los mecanismos de reacción que se han propuesto son: que la estabilidad de las uniones entre pirimidinas y la desoxirribosa es mayor que aquella de las uniones entre purinas y la desoxirribosa que son muy lábiles; ésto sugiere que tal vez, la difenilamina reacciona con las moléculas de carbohidratos originalmente unidas a purinas en el ADN. La relación aparente entre la desoxirribosa y el fósforo están de acuerdo con este mecanismo y con el hecho, de que el ADN de diferentes orígenes parecen tener una relación purina-pirimidina cercano a la unidad (Chargaff 1955). También se ha propuesto que el fosfato inorgánico liberado del ADN en las primeras etapas de la reacción con la difenilamina, tal vez provenga de los enlaces de fósforo entre nucleótidos de purinas adyacentes en la cadena polinucleotídica, esta liberación puede llegar a representar el 25% del fósforo total del ADN. El mecanismo de

eliminación del fosfato es desconocido.

Deriaz, Stacey, Wiggins (1949) consideran que en la reacción a 100°C, se forma w-hidroxiilevulaldehído por la acción del ácido sobre el ADN o sobre la desoxirribosa y una condensación posterior con la difenilamina.

Esto sugiere que los productos de condensación (por ejemplo bases de Schiff) entre la amina y la desoxirribosa o w-hidroxiilevulaldehído, sean los productos intermediarios.

La acción del acetaldehído y de algunos otros aldehídos consiste en aumentar el desarrollo de color en la obscuridad, sugiriéndose que reaccionan dos moléculas del aldehído y una de la amina aromática.

La naturaleza de los compuestos coloridos formados en la reacción de la difenilamina es desconocida. Los cambios en el espectro de absorción en la reacción a 30°C, muestran que dos son los compuestos formados que pueden ser idénticos a dos de los seis compuestos detectados en la reacción a 100°C (6).

### 2.3 Modificaciones a la técnica de la difenilamina.

En el curso de la investigación del metabolismo de los ácidos nucleicos durante la multiplicación de bacteriófagos, Burton (1955), modificó la técnica al adicionar acetaldehído e incrementar el tiempo de incubación durante varias horas a 30°C, en lugar del calentamiento a 100°C durante 3-10 minutos.

El método fue modificado posteriormente por Giles-Myers (1965), quienes al estudiar el contenido de ADN en plantas y algunos

microorganismos, incrementaron la concentración de la difenilamina del 2 al 4% en ácido acético glacial y además cambiaron el orden de adición de los reactivos, agregando el acetaldehído al final.

Después de las modificaciones de Burton y Giles-Myers la técnica con difenilamina quedó establecida en la siguiente forma: el estándar es solubilizado en ácido perclórico, la difenilamina en ácido acético, adición del acetaldehído, incubación durante toda la noche, lectura de absorción a 600 nm contra blanco de reactivos.

**Capítulo 3**  
**Material y Métodos.**

**3.1 Material.**

**Reactivos químicos.**

Acido perclórico	Allied Chemical
Acetaldehído	Eastman
Acido acético glacial	Merck
Difenilamina	Baker
Hidróxido de sodio	Merck

### 3.2 Material biológico.

Hígado de ratas adultas cepa Long-evans.

ADN de timo de ternera

Sigma Chemical

### 3.3 Equipo.

Espectrofotómetros

Pye Unicam SPS-100 y Gilford  
260

Baño serológico

Aparatos eléctricos para bac-  
teriología y química. J.M.  
Ortiz

Centrifuga

Beckman refrigerada J-6B

Centrifuga

Sorvall RC-5B con rotor de ángulo fijo tipo SM-24

Ultracentrifuga

Beckman L8-70 con rotor de ángulo fijo tipo 40 Ti

### 3.4 Método.

Para cuantificar el contenido de ADN hepático, éste fue extraído por el procedimiento de Setaro y Morley, publicado en 1977 y descrito en el capítulo anterior.

Cuantificación del ADN según la técnica de Giles-Myers.

Preparación de reactivos.

Acido perclórico 2 mol/L

Hidróxido de sodio 5 mmol/L

Difenilamina al 4% en ácido acético glacial



**Difenilamina al 4% en ácido acético glacial.**

Recomendaciones: El volumen que se prepare de esta solución dependerá de la cantidad de tubos que se requieran. El frasco de la difenilamina debe conservarse protegido de la luz y abrirse sólo cuando sea necesario, la luz y el aire descomponen el reactivo; lavar muy bien la espátula antes de introducirla al frasco y no regresar el sobrante al interior del mismo. La disolución se facilita empleando una varilla de vidrio y no introducir pipetas al frasco del ácido acético.

**Acetaldehído.**

Nota: Para la preparación de este reactivo todo el material empleado deberá ser enfriado previamente a 0-4°C.

En un tubo de centrifuga graduado diluir 0.5 ml de acetaldehído con 11.5 ml de agua desionizada (concentración final 32.5 mg/ml). Preparar esta solución cada semana y conservar en congelación.

Diluir 1 ml de esta solución en 20 ml de agua desionizada (concentración final 1.6 mg/ml). Preparar esta solución unos minutos antes de ser utilizada y descartar el sobrante.

**Estándar de ADN.**

Solución patrón de ADN. Pesar aproximadamente 10 mg de timo de ternera y disolver con 8 ml de NaOH 5 mmol/L, después de 30 minutos de agitación, aforar con el mismo disolvente (concentración final aproximada de 1 mg/ml).

La concentración final del ADN se obtiene por dilución de

la solución concentrada de éste, de acuerdo al valor del coeficiente de extinción que se determine a 260 nm.

**Determinación de la concentración final del estándar por absorción en U.V.**

Tomar 1 ml de la solución concentrada del estándar de ADN y diluir 1:100 con solución salina; leer en cubeta de cuarzo de un centímetro de paso óptico, en espectrofotómetro a 260 nm; y calcular la concentración aplicando la siguiente ecuación (23):

$$\text{Concentración ADN en mg/ml} = \frac{(\lambda_{260 \text{ nm}}) (\text{factor de dilución})}{(\text{coeficiente de extinción})} \quad (23.6)$$

Sustituir el valor de absorción para determinar la concentración real del ADN en la solución; con el resultado de esta ecuación, diluir el estándar de tal manera que de una concentración final de 1 mg/ml.

Solución de trabajo de ADN. En un matraz aforado de 10 ml, colocar 2.5 ml de la solución concentrada con pipeta volumétrica y agregar 2.5 ml de NaOH 5 mmol/L más 2.5 ml de HClO<sub>4</sub> 2 mol/L. Durante 25 minutos hidrolizar a 70°C, dejar enfriar a temperatura ambiente y aforar a 10 ml con HClO<sub>4</sub> 2 mol/L (concentración final 250 µg/ml)

Para la determinación cuantitativa del ADN, se seleccionó en método de Giles, K.W. y Myers, A., el cual se desarrolló bajo las condiciones señaladas por los autores, de acuerdo al siguiente esquema:

Esquema de la técnica de Giles-Myers.

Tubo	D F A 4 % ( $\mu$ l)	Estándar de A D N ( $\mu$ l)    ( $\mu$ g)		HClO <sub>4</sub> 1 mol/L ( $\mu$ l)	Acetaldehído 1.6 mg/ml ( $\mu$ l)
Blanco	500	--	--	500	100
1	"	40	10	460	"
2	"	80	20	420	"
3	"	120	30	380	"
4	"	160	40	340	"
5	"	200	50	300	"

Incubación durante 20 horas a 30°C.      Leer a 600 nm

Al valorar el contenido del ADN en homogeneizados del tejido hepático de la rata, se encontró que los blancos de reactivos mostraban valores elevados de absorción (0.080 ó mayores). Por este motivo, fue necesario estudiar y estandarizar las condiciones de trabajo en el desarrollo de la técnica.

La mejor curva se denominará a aquella cuyo intercepto corresponda al valor próximo a cero resultante de las diferencias de los valores de absorción de las concentraciones crecientes del estándar menos las del blanco.

Efectos de los diversos componentes sobre el desarrollo del color.

A continuación se dará una descripción detallada de los distintos análisis que se realizaron con el propósito de esclarecer cual o cuales reactivos, o bien cual o cuales condiciones en el desarrollo

de color están ejerciendo un efecto de aumento en la absorción del blanco de reactivos, que modifica en forma importante la sensibilidad, reproducibilidad y especificidad de la técnica. Los reactivos analizados fueron: DFA, solubilización del ADN,  $\text{HClO}_4$ , acetaldehído y condiciones de temperatura de incubación.

#### **Análisis del espectro de absorción del ADN estándar en la región ultravioleta.**

Un primer requisito en el estudio sistemático de una técnica colorimétrica involucra el análisis de la pureza química de la sustancia que será utilizada como patrón primario o secundario en la preparación de soluciones estándares para el montaje de curvas de calibración; para tal propósito el ADN es hidrolizado, diluido adecuadamente y determinado su espectro de absorción de 200 a 340 nm.

La técnica consiste en pesar aproximadamente 15 mg de ADN, hidrolizar en 10 ml de solución salina por agitación continua durante 48 horas (23); 1 ml de esta solución se diluye 1:100 y en cubeta de cuarzo de un centímetro de espesor, se realiza un barrido de absorción en la región del ultravioleta de 200 a 340 nm, con una velocidad de 20 seg/cm y un paso de luz de 1.0 cm con abertura de 0.3 mm, en el espectrofotómetro Gilford y con la selección de tres escalas en el graficador.

#### **Efectos de la concentración de la difenilamina (DFA).**

Para indagar cual o cuales reactivos contribuyeron al aumento de la absorción inespecífica en los blancos de reactivos, fue necesario analizar los efectos sobre el desarrollo de color en la

reacción con el ADN.

En virtud de que algunos autores han señalado que los cambios en la concentración de la difenilamina pueden aumentar o disminuir la absorción del ADN (6) se analizaron diversas concentraciones de la DFA: 2, 4, 8, 16, 20, 24 mg del reactivo por tubo.

Para el desarrollo de la reacción colorimétrica, los demás reactivos se utilizaron de acuerdo a la técnica original, la cantidad del estándar fue de 20  $\mu$ g por tubo, modificando únicamente las concentraciones de la difenilamina señaladas anteriormente y analizando cada una de ellas por triplicado, hasta completar un lote de 30 tubos por cada concentración utilizada.

#### Selección de la longitud de onda de la reacción colorimétrica.

Una vez que se ha desarrollado el color en una mezcla de reacción es indispensable realizar un análisis de absorción con el propósito de obtener un espectro dado por la sustancia patrón, en nuestro caso ADN, compararlo con el espectro del blanco de reactivos y seleccionar aquella longitud de onda donde se encuentre un pico máximo de absorción de la muestra y un mínimo del blanco, que garantice aumentar la sensibilidad de la técnica por la selección de una región del espectro donde la absorción inespecífica sea mínima (blanco de reactivos) y los cambios en la intensidad del color por las diferentes concentraciones de la sustancia a medir sea máxima.

#### Solubilización del ADN.

Con el propósito de garantizar una completa solubilización del ADN para preparar las soluciones estándares de trabajo, fue

necesario buscar otros procedimientos a aquel señalado por Burton (6) y Giles-Myers (14); puesto que al inicio del estudio, las curvas de calibración dieron amplios límites de variación en los valores de absorción de cada una de las concentraciones del ADN utilizado y cambios de pendiente en las curvas patrón se consideró que una de las causas podría ser una solubilización incompleta del ADN.

Ante este problema, un segundo proceso de solubilización que se analizó, consistió en pesar aproximadamente 10 mg de timo de ternera y disolverlos en 8 ml de NaOH 5 mmol/L, agitar durante 30 minutos y aforar a 10 ml; tomar 2.5 ml de esta solución, agregar 2.5 ml de NaOH 5 mmol/L, más 2.5 ml de HClO<sub>4</sub> 2 mol/L. Durante 25 minutos hidrolizar a 70°C y aforar a 10 ml con HClO<sub>4</sub> 2 mol/L.

#### Efecto del ácido perclórico.

Giles- Myers en la curva de calibración desarrollaron el color agregando cantidades variables de HClO<sub>4</sub> 1 mol/L (ver esquema de la técnica) completando un volumen final de 1.1 ml. En virtud que otros autores como Metcuff (23) y Burton (6) utilizan otras concentraciones del mismo ácido en este trabajo se probaron las concentraciones 2 y 3 mol/L del reactivo con el propósito de mejorar la sensibilidad y linealidad de la curva.

#### Efecto del acetaldehído.

De acuerdo con las especificaciones señaladas en la técnica original se utilizó el acetaldehído con una concentración de 1.6 mg/ml; por el hecho de que el blanco de reactivos mostró absorción

inespecífica elevada, fue necesario analizar otras concentraciones del reactivo. Para el trabajo experimental se desarrollaron curvas de calibración con 1.6, 3.2, 4.8 y 6.4 mg/ml.

Como este estudio se realizó con el propósito de disminuir la absorción inespecífica, las demás condiciones de la técnica se mantuvieron constantes.

#### **Influencia de la temperatura de incubación.**

Con el propósito de determinar si la absorción inespecífica fue efecto de la temperatura de incubación, se desarrollaron curvas y se incubaron a dos temperaturas: 30°C y 37°C.

#### **Análisis matemático de las curvas de calibración.**

Con el propósito de establecer las posibles funciones de relación entre las distintas concentraciones de las sustancias estándares o de las sustancias problema representadas por "X", en el eje de las abscisas de la curva de calibración, contra las absorbencias resultantes de estas sustancias representadas por "Y" en el eje de las ordenadas estos datos fueron analizados por el método de los mínimos cuadrados y se hizo la correspondiente representación gráfica de la recta de ajuste o de regresión (22).

## Capítulo 4

### Resultados.

Extracción del ADN hepático de la rata por el método de Setaro-Morley.

Como fue señalado en la introducción, existía la necesidad de establecer técnicas que permitieran extraer el ADN de tejido hepático para medir la capacidad de unión de un esteroide con marca radiactiva al núcleo, relacionándolo con la cantidad de ADN presente.

Por tal motivo, se seleccionó al método de Setaro-Morley (29) que, como se indicó en material y método fue modificado para los propósitos del presente trabajo.



De acuerdo con el esquema de extracción del ADN hepático descrito en la figura 12, después de los pasos de centrifugación 6 y 7 se extrajo al ADN por solubilización en ácido perclórico.

La técnica colorimétrica de la DFA, permitió la cuantificación del ADN en las fracciones de extracción, obteniendo recuperaciones del 93 al 108% de esta molécula, como se muestra en la tabla 3.

#### **Modificaciones a la técnica de Giles-Myers para la cuantificación del ADN hepático de la rata.**

Como fue planteado, al realizar la cuantificación del ADN extraído a partir de homogeneizados de hígado de rata, a pesar de seguir las condiciones señaladas por los autores, el tubo blanco de reactivos mostró valores elevados de absorción de 0.080 o mayores. Esto sugirió la posible existencia de sustancias contaminantes en el desarrollo de la reacción colorimétrica, posibles alteraciones de reactivos o efectos de las condiciones de la técnica. Por ello, fue necesario estudiar cada paso del procedimiento, de acuerdo con lo descrito en material y método, presentando aquí los resultados obtenidos con las modificaciones que fueron necesarias realizar a la técnica original.

#### **Determinación del espectro de absorción.**

La solución patrón del ADN diluida adecuadamente, fue sujeta al análisis de su espectro entre 200 y 340 nm, con escalas seleccionadas de 1:2, 1:1 y 1:0.5, encontrándose un pico máximo de absorción a 260 nm (figura 13) en cada uno de los espectros, dentro del intervalo de longitudes de onda analizados.

#### Efecto de la concentración de la difenilamina.

De acuerdo a lo señalado en material y método, al estudiar el efecto de la concentración sobre el desarrollo de color desde 2 hasta 24 mg de la DFA en la mezcla de reacción por tubo, en la tabla 4, se muestran los valores promedio de absorción obtenidos con muestras de 20  $\mu\text{g}$  de ADN por tubo; se presentan con fines comparativos los valores promedio de absorción que mostraron los blancos de reactivos correspondientes a 600 nm.

Con el propósito de ilustrar el efecto de la DFA sobre el desarrollo de color de los datos de absorción de las muestras se graficaron contra las diversas concentraciones de DFA analizada. Las concentraciones del resto de reactivos se mantuvieron constantes, con una sola concentración de ADN.

En la figura 15, se observa que la curva de blancos de reactivos muestra variaciones en absorción de 0.020 a 0.035, sin que muestre tendencia alguna por el efecto de las diferentes concentraciones de la DFA, excepto en la máxima concentración, 24 mg del reactivo, donde se observó un aumento de absorción a 0.045. En cuanto a los tubos con ADN se encuentra que conforme aumenta la concentración de la DFA, existe un incremento en color con valores de absorción de 0.030 hasta 0.310.

#### Selección de la longitud de onda.

Para la determinación de la longitud de onda adecuada se desarrolló una curva patrón y al tubo correspondiente a 30  $\mu\text{g}$  de ADN se le determinó su absorción entre 200 y 700 nm, encontrándose

a 600 nm un pico máximo, con un mínimo de absorción de su respectivo blanco de reactivo (figura 14). En el espectro de barrido, no hubo algún otro pico de absorción dado por el tubo de muestra. También se analizó el espectro de absorción del ADN extraído del hígado de rata, según la técnica de Setaro-Morley (29); para tal propósito, el extracto de ADN se diluyó bajo las mismas condiciones señaladas para la solución patrón y sujeta al desarrollo del color con DFA. En la figura 14, se muestran los espectros de absorción de dos extractos distintos, leídos contra sus respectivos blancos de reactivos; como se observa, los espectros de estos extractos mostraron un solo pico de absorción máxima a 600 nm.

#### Solubilización del ADN.

La disolución del ADN en  $\text{HClO}_4$  1 mol/L, según la técnica original dió absorbencias promedio de 0.130 a 0.940, como se muestra en la tabla 5. La representación gráfica de estos datos permitió hacer un análisis de la curva patrón con valores promedio, que se observa en la figura 16, cuyo intercepto tiene un valor negativo (-0.065); además, en los valores de ADN correspondientes a las diferentes concentraciones en la curva, por ejemplo 10 y 20 ó 20 y 40  $\mu\text{g}$  no hay proporcionalidad en los valores de absorción obtenidos.

La disolución del ADN en  $\text{NaOH}$  5 mmol/L más  $\text{HClO}_4$  2 mol/L dió absorbencias promedio de 0.160 a 0.800 (tabla 5), cuya representación gráfica en la figura 16 dió un intercepto próximo a cero (0.016).

#### Efecto del ácido perclórico.

Con relación al desarrollo del color a pH ácido, en la técnica

original se agrega  $\text{HClO}_4$  1 mol/L a los tubos de reacción; en este trabajo, con el propósito de disminuir el incremento de absorción inespecífica se adicionó  $\text{HClO}_4$  2 y 3 mol/L.

A continuación se muestran los resultados de los valores de absorción promedio para cada una de las correspondientes concentraciones de  $\text{HClO}_4$ . Para la curva con  $\text{HClO}_4$  1 mol/L, las absorciones promedio fueron 0.150 a 0.470, para la concentración 2 mol/L, las absorciones promedio fueron 0.180 a 0.800 y para 3 mol/L fueron de 0.300 a 0.960 (tabla 6).

Las curvas patrón resultantes se muestran en la figura 17. El análisis por mínimos cuadrados de la curva  $\text{HClO}_4$  1 mol/L dió la menor pendiente  $7.7 \times 10^{-3}$  y con un intercepto de 0.061; la curva correspondiente a  $\text{HClO}_4$  3 mol/L dió una pendiente de 0.0166 y fue paralela a la de 2 mol/L, pero con un intercepto de 0.126, que es mayor al de la curva de menor concentración de  $\text{HClO}_4$ ; la pendiente de la curva con  $\text{HClO}_4$  2 mol/L fue de 0.0156 con un intercepto de 0.020.

#### Efecto de la concentración del acetaldehído.

Otro de los parámetros que se analizó fue el efecto sobre el desarrollo del color por cambio en las concentraciones del acetaldehído que en la técnica original se prepara en cantidad de 1.6 mg/ml, agregando al tubo de reacción 100  $\mu\text{l}$  de esta solución (concentración final 160  $\mu\text{g}$ /tubo).

Al desarrollar el color, el blanco de reactivos dió un intercepto de 0.080, por lo cual fue necesario analizar otras concentraciones

del reactivo, que fueron 1.6, 3.2, 4.8, 6.4 mg/ml, agregando 25  $\mu$ l de cada concentración a la mezcla de reacción. En la tabla 7, se indican las absorciones promedio correspondientes a las cuatro diferentes cantidades de acetaldehído analizadas.

En la figura 18, se presentan las curvas respectivas, cuando el reactivo se utilizó a la concentración original, el intercepto fue de 0.026 y la pendiente 0.0154, mientras que al duplicar la concentración, hubo un incremento en las absorciones resultando una curva paralela pero con un intercepto de 0.076 y pendiente de 0.0156; en cambio cuando se triplicó o cuadruplicó la cantidad de acetaldehído hubo un aumento en la absorción con cambios de pendiente de 0.017 e intercepto de 0.096 para 4.8 mg/ml y de pendiente de 0.0186 e intercepto de 0.012 para 6.4 mg/ml.

#### Influencia de la temperatura de incubación sobre el desarrollo de color.

Para el desarrollo del color, se indica una temperatura de 30°C y las curvas tuvieron absorciones promedio de 0.160 a 0.800 pero cuando la temperatura de incubación fue de 37°C fueron de 0.190 a 0.820, como se muestra en la tabla 8. La representación gráfica de estos datos para la incubación a 30°C dió una curva con intercepto de cero y una pendiente de 0.016. Ambas temperaturas de incubación dieron valores de absorción semejantes, sobreponiéndose casi totalmente las curvas patrón (figura 19).

#### Condiciones finales en el desarrollo del color por la DFA.

A través del desarrollo experimental en este trabajo, se

han presentado las modificaciones que fueron necesarias realizar, con el propósito de integrar una técnica que proporcione resultados confiables en la cuantificación del ADN por análisis colorimétrico con DFA. Por lo tanto, una vez establecidas estas modificaciones, el procedimiento para la ejecución de la curva patrón con soluciones estándares de ADN quedó de la siguiente manera:

**Soluciones reactivas.**

- a).- Solución patrón de ADN concentrada disuelta en NaOH  
5 mmol/L, 1 mg/ml.
- b).- Solución patrón de ADN de trabajo, disuelta en NaOH  
5 mmol/L más  $\text{HClO}_4$  2 mol/L, 250  $\mu\text{g/ml}$ .
- c).- Acetaldehído, 1.6 mg/ml.
- d).- Difenilamina al 4% disuelta en ácido acético glacial.

Cuando estas condiciones de trabajo se aplicaron a soluciones de ADN en la ejecución de curvas patrón, el análisis de la determinación de las pendientes, los interceptos, covarianzas y coeficientes de correlación, conformarán si es o no adecuada la reproducibilidad de la técnica modificada de la DFA. Además, la interpolación de los valores de absorción del ADN problema extraído de tejidos hepáticos de rata en el laboratorio, también mostrará si se logró la precisión esperada en la cuantificación de este compuesto; como ejemplo de este análisis se muestran en la tabla 9 los datos de absorción y la ecuación de la recta y los parámetros covarianza y coeficiente de correlación, y en la figura 20, la representación gráfica de la recta de regresión resultante que

integra a la curva de calibración.

Con los datos de absorción, se calculó la pendiente de 0.0162 con un intercepto de 0.020, y una covarianza de 0.004 cercanos a cero y un coeficiente de correlación casi igual a uno (0.9998) tabla 9.

La técnica ya modificada quedó establecida en este trabajo de acuerdo al esquema siguiente:

Esquema de la técnica de Giles-Myers modificada.

Tubo	D F A 4 % ( $\mu$ l)	Estándar de ADN ( $\mu$ l)	( $\mu$ g)	HClO <sub>4</sub> 2 mol/L ( $\mu$ l)	Acetaldehído 1.6 mg/ml ( $\mu$ l)
Blanco	500	--	--	500	25
1	"	40	10	460	"
2	"	80	20	420	"
3	"	120	30	380	"
4	"	160	40	340	"
5	"	200	50	300	"

Incubación durante 20 horas a 30°C. Leer a 600 nm.

Análisis de las curvas patrón con la técnica propuesta.

Tomando en cuenta todas las modificaciones de la técnica con DFA, que fueron sujetas a evaluación en el presente trabajo, se desarrollaron varias curvas colorimétricas durante tres meses, los datos de absorción del blanco de reactivos y las correspondientes a las distintas concentraciones del ADN coloridas fueron sujetas

al análisis de resultados con el propósito de determinar las variables de la curva de calibración de la técnica ya estandarizada.

Con el propósito de evaluar la sensibilidad porcentual de la técnica (19), utilizando los datos de absorción del ADN obtenidos de la curva de calibración mostrada en la figura 20, se consideró como 100% a la absorbencia obtenida con 25 mg/dl del ADN (tabla 10) por corresponder al tubo con la más alta cromogenicidad y este valor porcentual se relacionó con cada una de las absorciones de las concentraciones menores del ADN estándar. La gráfica resultante que muestra la sensibilidad porcentual de la técnica colorimétrica al ADN se muestra en la figura 21 donde el valor de pendiente es de 0.0162 con un coeficiente de correlación de 0.9998 y un intercepto de 0.020.

**Análisis de los datos experimentales de la curva patrón mediante el método de Ringbom.**

Con el propósito de determinar el intervalo útil de concentración en la curva estándar y la sensibilidad de la técnica propuesta en este trabajo para la cuantificación del ADN, los datos de concentración y absorción de la tabla 9, se analizaron matemáticamente según lo propuesto por Ringbom (13); en la tabla 11 se muestran los resultados de este análisis y en la figura 22 se presenta la curva de Ringbom resultante, correlacionando el logaritmo de la concentración del ADN contra sus respectivos valores de absorbancia (Absorbancia =  $100 - \% T$  ;  $\% T = \text{antilog de } 2 - A$ ).

Con estos valores se calculó el error fotométrico porcentual, indicado en la tabla 12.



El error fotométrico correspondió a 2.87% cuando la pendiente fue de 80.07; la interpolación de este dato en la curva (figura 22) permitió determinar la sensibilidad de la técnica que fue de 1.0 µg. De acuerdo a lo establecido por Ringbom, los valores de los errores fotométricos obtenidos según las pendientes calculadas, fueron menores del 5% (tabla 12), lo que significa que el intervalo útil de la curva al relacionar la absorción contra la concentración del ADN en muestras problema, estará entre 10 µg/ml, como límite inferior y 50 µg/ml de ADN como límite superior.

(% error fotométrico =  $\frac{230}{m}$ , donde m = pendiente).

## Capítulo 5

### Comentarios y conclusiones.

En el análisis de la interacción de la hormona esteroide radiactiva con su receptor intranuclear, es primordial medir la cantidad de hormona radiactiva incorporada por unidad de ADN; por lo cual, en el laboratorio de Endocrinología Molecular surgió la necesidad de establecer una técnica que en forma rápida y confiable conduzca a la cuantificación del ADN hepático.

En este trabajo, el propósito fundamental fue establecer las condiciones y el procedimiento que permitan sistematizar una técnica colorimétrica con la DFA (6) para cuantificar el ADN extraído del hígado total y de los núcleos purificados del hígado de la

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

rata recién nacida.

Con la técnica de Setaro-Morley con agentes precipitantes, disolventes, centrifugaciones y solubilización en caliente, se lograron extracciones eficientes del ADN hepático con recuperaciones óptimas alrededor del 100%.

En su propósito de extraer el ADN, este procedimiento se semeja a la técnica propuesta por Schneider (31), que comprende una extracción ácida en frío, solubilización de lípidos en disolventes y una solubilización ácida posterior del ADN en caliente; pero a diferencia de éste, Setaro utiliza inicialmente disolventes con solubilización en caliente lo cual conduce a una separación exhaustiva de lípidos y dos pasos sucesivos de solubilización del ADN en ácido perclórico.

La crítica al método de Setaro podría ser un mayor número de pasos en el proceso; sin embargo, éste es una garantía de lograr recuperaciones adecuadas del ADN hepático, además de ofrecer la ventaja de agregar disolventes saturados con acetato de potasio lo cual disminuye significativamente la hidrólisis del ADN (29).

En este trabajo se confirma que en las condiciones de ensayo, la técnica de extracción resultó la mas adecuada, a diferencia de otras que fueron desarrolladas en el laboratorio (23) y que proporcionaron porcentajes bajos de recuperación.

En la estandarización de la reacción colorimétrica con DFA para la cuantificación del ADN, una de las primeras condiciones de análisis fue descartar la presencia posible de sustancias

contaminantes en el ADN del timo de ternera utilizado para la solución patrón.

A través del barrido del espectro de absorción entre 200 y 340 nm, la presencia de un solo pico de absorción a 260 nm, indica la pureza del ADN contenido en las soluciones patrón y confirma lo señalado por los proveedores en el producto comercial.

Los incrementos inespecíficos de absorción por los ácidos nucleicos en la región del U.V. sugieren la presencia de peptidos y proteínas, entre otras sustancias contaminantes (6).

Para la cuantificación colorimétrica del ADN, se encontró que la concentración adecuada de la DFA para el desarrollo del color, fueron 20 mg que se adicionaron en la mezcla de reacción y produjeron la intensidad de color adecuada con un valor de absorción mínimo para el blanco de reactivos, y aunque concentraciones mayores del reactivo aumentan la intensidad del color, el reactivo blanco correspondiente también incrementa su absorción.

Por lo anterior, resultaría inadecuado utilizar cantidades mayores del reactivo a la concentración utilizada en esta técnica, que corresponde a la concentración indicada en la técnica original (6), por tal razón este reactivo no interfirió inicialmente en los aumentos de absorción inespecífica, en el reactivo blanco. Aunque no se ha establecido claramente el mecanismo de reacción de la DFA, se ha demostrado que reacciona con la desoxirribosa unida a las purinas (6).

### Selección de la longitud de onda.

En cuanto a la selección de la longitud de onda para leer las muestras coloridas resultantes entre las diferentes concentraciones del ADN y la DFA, el valor de máxima absorción por la muestra (30  $\mu\text{g}$  de ADN) fue de 600 nm, valor que corresponde al señalado en la técnica original (6), que se observa en el espectro de absorción de la reacción colorimétrica (figura 14). Aunque hay una absorción importante después de 380 a 425 nm, también existe una absorción casi en paralelo del reactivo blanco, mientras que a 600 nm la absorción de este blanco, es la mínima.

La longitud de onda a la que debe leerse una reacción colorida, será aquella donde se detecten cambios en el desarrollo de color, como consecuencia de las diferentes concentraciones de la sustancia a medir y que el reactivo blanco al dar la mínima lectura de absorción, garantiza la eliminación de absorción inespecífica. Es conocido que el pico máximo de absorción dado por la muestra a medir, no siempre corresponde a una longitud de onda donde la técnica sea más sensible, sino ésto tiene que ser probado experimentalmente, es decir en cantidades diferentes de la muestra a medir, trazar las curvas de calibración correspondientes y analizar sus parámetros, como pendiente, intercepto, coeficiente de correlación, etc., para definir este límite de sensibilidad (7).

### Solubilización del ADN.

Con relación a la preparación de las soluciones patrón del ADN utilizando un producto comercial purificado de timo de ternera, la solubilización en  $\text{HClO}_4$  1 mol/L. no dió curvas de calibración

con la linealidad y reproducibilidad adecuadas; Munro (24), en la parte de procedimientos para la extracción y separación de ácidos nucleicos, cita los múltiples trabajos que a través de la literatura han sido publicados sobre la estabilidad del ADN en reactivos ácidos o alcalinos. Algunos autores indican en esta exhaustiva revisión, que el ADN presenta una mayor estabilidad cuando se utilizan condiciones moderadas en su solubilización en el ácido perclórico, por ejemplo las concentraciones menores de 1 mol/L del reactivo, las bajas temperaturas (principalmente a temperatura ambiente) y tiempos cortos de solubilización.

En este trabajo, la solubilización del ADN en NaOH para su utilización en las soluciones patrón, dió curvas de calibración con linealidad y sensibilidad adecuadas, lo que sugiere que la solubilización del ADN en el álcali es satisfactoria, aunque este hecho no pudo compararse con datos en la literatura; Munro (24) señala que el ADN es resistente a la exposición alcalina, por las siguientes razones:

En el ARN la hidrólisis alcalina afecta al grupo hidroxilo del carbono 2 de la ribosa, provocando la transformación espontánea del compuesto a 2' ó 3' nucleótidos; mientras que en el ADN, el carbono 2 de la desoxirribosa por carecer de hidroxilos, no es afectado por el álcali y transformarlo en los compuestos 2'3' fosfotriésteres.

#### Acido perclórico.

Durante el desarrollo del color resultante de la mezcla de  $HClO_4$  con DFA en presencia de ADN, cuando se utilizó la concentración

2 mol/L del ácido, se obtuvieron curvas de calibración con la linealidad y sensibilidad útiles para la cuantificación del ácido nucleico; en cambio las concentraciones de  $\text{HClO}_4$  1 y 3 mol/L no cumplen con los requisitos.

Durante la estandarización de la técnica de la DFA (6), Burton utiliza concentraciones de  $\text{HClO}_4$  de 0.05, 1 y 2 mol/L del reactivo a diferencia de los resultados aquí obtenidos, él encontró que esta última concentración disminuyó el desarrollo del color en un 30% con relación al máximo obtenido con las concentraciones de 0.05 a 1 mol/L del reactivo en presencia de la DFA.

Cuando se comparan volúmenes finales de las mezclas de reacción coloridas de la presente técnica y la propuesta por Burton, se encuentra que nuestro procedimiento contiene menor cantidad de DFA (21 contra 24 mg), una molaridad mayor (0.0002 contra 0.0001 mol/L) de  $\text{HClO}_4$  y una concentración menor de acetaldehído (0.164 contra 0.176 mg); cuando se comparan las concentraciones equivalentes de 1 ml de la mezcla de reacción, la única diferencia es que la técnica de Burton contiene una molaridad menor de  $\text{HClO}_4$  (0.0001 mol/ml).

Las proporciones entre la DFA,  $\text{HClO}_4$  y acetaldehído probablemente favorezcan el desarrollo del color, de tal manera que las concentraciones anteriormente señaladas para nuestra técnica dió como resultado, un procedimiento colorimétrico adecuado para la cuantificación del ADN (tabla 13).

#### Acetaldehído.

Con el fin de disminuir la alta absorción del reactivo blanco,

otra modificación a la técnica fue cambiar la concentración del acetaldehído señalada por Giles-Myers (14); al duplicar la concentración del reactivo en la mezcla de reacción ADN-DFA, se logró un incremento en la absorción; de tal manera que la curva de calibración resultante comparada con aquella de la técnica original dió un valor de pendiente semejante, pero con un intercepto tres veces mayor, las concentraciones al triple o cuádruple del reactivo también intensifican el color, pero igualmente aumenta el intercepto alrededor de 0.1 o más de absorción.

Burton, quien introdujo por vez primera el uso de aldehídos en la reacción colorida con la DFA, demostró que una concentración de 16 mg/ml de acetaldehído aumentó la intensidad de color, a diferencia de otros aldehídos que probó, siendo este reactivo el único que mostró bajas absorciones en ausencia de ADN. El autor señala que se desconoce el mecanismo de reacción (6).

Giles-Myers observaron la presencia de un color verde en las soluciones reactivas mezcladas con acetaldehído al agregarlo a la DFA, por lo cual decidieron adicionarlo por separado al final de la reacción, logrando una importante disminución en la absorción del reactivo blanco (a una tercera parte); además al cambiar el  $H_2SO_4$  por  $HClO_4$ , la absorción disminuyó hasta una tercera parte.

Otra modificación de los autores, fue aumentar al doble la concentración de la DFA (de 2 al 4%) y disminuir la concentración del acetaldehído diez veces de la original (16 a 1.6 mg/ml) con lo cual aumentó en un 70% la sensibilidad de la técnica.



En virtud que en la presente técnica, el cambio de concentraciones del acetaldehído no mejoró la sensibilidad de las curvas, la concentración del reactivo quedó sin cambio; aunque disminuyó la cantidad de este reactivo, por agregar un volumen diferente de este (25  $\mu$ l), en el desarrollo del color (tabla 13).

#### Temperatura.

Una última valoración que hubo de realizarse, fue la incubación de los tubos en la mezcla total de soluciones reactivas para lograr una coloración óptima por efecto de la temperatura. La única temperatura probada fue a 37°C durante 20 horas, además de la señalada por Burton a 30°C durante 18 horas. Al comparar las curvas de calibración incubadas a 30 y 37°C no hubo diferencia en la intensidad del color ni modificaciones importantes en los parámetros de la curva, tal vez, porque el intervalo de temperaturas probado fue demasiado corto.

La reacción original de la DFA en una mezcla de ácidos acético y sulfúrico se desarrollaba calentando a 100°C por 10 minutos (6); sin embargo, Burton aumentó la sensibilidad de la técnica 3.5 veces más que la original por disminución de la temperatura de incubación de 100 a 30°C y prolongando el tiempo de incubación de 10 minutos a 18 horas. Este autor, señaló que la temperatura constante no fue importante y que las variaciones entre 25 y 35°C probadas por él, no tuvieron un efecto importante en el aumento del color, por lo cual la temperatura de incubación no fue necesario modificarla y al final quedó establecida a 30°C durante 20 horas.

#### Evaluación de la técnica colorimétrica modificada propuesta.

De acuerdo con la determinación de los parámetros de pendiente, intercepto, covarianza y coeficiente de correlación de una curva patrón figura 20, se observa que la técnica ofrece una sensibilidad adecuada según se observa por la inclinación de la pendiente en la curva y un intercepto con un valor muy próximo a cero (absorción muy baja del reactivo blanco que sugiere ausencia de contaminantes) y una mínima dispersión por una correlación adecuada entre los valores de absorción y los incrementos en la concentración del ADN estándar (covarianza próxima a cero y coeficiente de correlación cercano a uno).

#### Determinación del intervalo útil y sensibilidad en la curva patrón.

De acuerdo a los datos mostrados en la tabla 9 y a la curva de la figura 22, según el manejo matemático por el método de Ringbom (13) se encontró que la sensibilidad con la técnica colorimétrica propuesta alcanza el valor de 1.0  $\mu\text{g}$ , lo que permite garantizar la reproducibilidad de la misma al lograr diferencias de absorción, con pequeños cambios en la concentración del ADN. El intervalo útil de concentración de la curva de calibración permitió cuantificar con precisión el contenido de ADN de las muestras hepáticas problema de rata puesto que la cantidad del compuesto a medir correspondió a valores intermedios entre los límites superior e inferior de la curva.

En el presente trabajo, para la extracción de ADN del tejido hepático de la rata, se demostró que el método adecuado para ello,

es el propuesto por Setaro-Morley bajo las condiciones experimentales aquí señaladas.

En la cuantificación del ADN por técnicas colorimétricas es primordial tener presente que la confiabilidad de estos procesos comienza desde la preparación de los reactivos; que desafortunadamente sobre su manipulación y conservación, la información es insuficiente o ni siquiera existe, como en el presente caso, donde las propiedades químicas peculiares de los reactivos DFA y acetaldehído necesitan un manejo especial.

La manipulación de estos reactivos y la preparación de sus soluciones reactivas deben ajustarse fielmente a las indicaciones señaladas, es más, reactivos como la DFA deben repartirse en alícuotas adecuadas dentro de frascos opacos a la luz y mantenerse bajo las condiciones señaladas por los proveedores e ir utilizando y desechando frasco por frasco, según las necesidades de trabajo.

El ADN para su disolución como estándar debe agregarse al NaOH 5 mmol/L y para la solución de trabajo diluirse en  $\text{HClO}_4$  2 mol/L.

Otro requisito importante es adquirir los reactivos analíticos con las características señaladas en este trabajo. Ya que al pasar por alto la presencia de ciertos contaminantes o estados de oxidación de los reactivos, inducirá a cambios en la absorción de la reacción colorimétrica.

El desarrollo de la técnica colorimétrica con la DFA para la cuantificación del ADN hepático ejecutada bajo los lineamientos establecidos en este trabajo, permiten proponer la técnica modificada

con la precisión y la sensibilidad necesarias para la medición del compuesto de interés y así cumplir los objetivos específicos de cuantificación del ADN, en los proyectos de investigación que determinaron el estudio y la adaptación de este procedimiento cuantitativo.

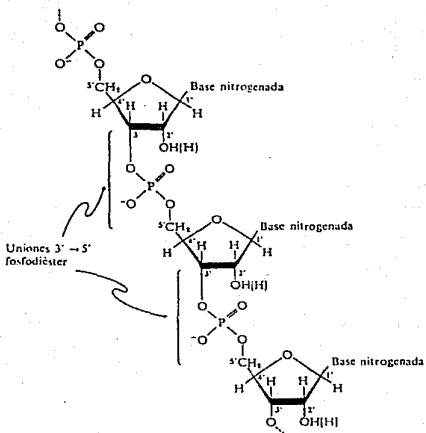


Figura 1. Estructura de una cadena polinucleotídica.\*

\*Bohinski, R.C. Bioq. p. 212, 1978

Pirimidinas principales

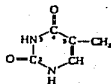
Citosina  
(2-oxi-4-aminopirimidina)



Uracilo  
(2,4-dioxipirimidina)

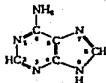


Timina  
(5-metil-2,4-dioxipirimidina)



Purinas principales

Adenina  
(6-aminopurina)



Guanina  
(2-amino-6-oxipurina)

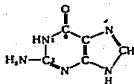
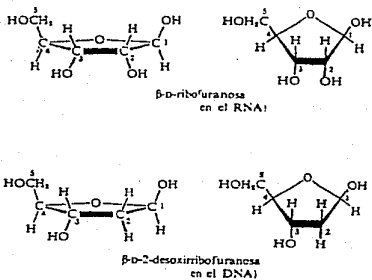


Figura 2. Estructuras químicas de las principales bases púricas y pirimidínicas.\*

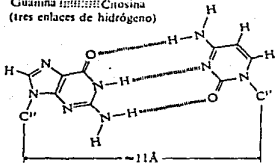
\*Lehninger, A. Bioq. p. 256, 1977



**Figura 3.** Estructuras químicas de los carbohidratos existentes en los ácidos nucleicos.\*

\*Bohinski, R.C. Bioq. p. 203, 1978

Guanina ..... Citosina  
(tres enlaces de hidrógeno)



Adenina ..... Timina  
(dos enlaces de hidrógeno)

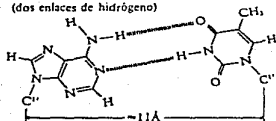


Figura 4. Esquema de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno entre las bases A - T y G - C.\*

\*Bohinski, R.C. Bioq. p. 220, 1978



T a b l a 1\*

Contenido en ADN en células de pollo.

Tejido	A D N (pg/célula)
Corazón	2.45
Riñón	2.20
Hígado	2.66
Bazo	2.55
Páncreas	2.61
Eritrocito	2.49
Células espermáticas	1.26

\*A. Lehninger. Bioquímica p. 677, 1977

T a b l a 2\*

Contenido aproximado en ADN de algunas células y virus.

Especies	A D N (pg/célula)	Número de pares de nucleótidos (millones)
Mamíferos	6	5500
Anfibios	7	6500
Peces	2	2000
Reptiles	5	4500
Aves	2	2000
Crustáceos	3	2800
Moluscos	1.2	1100
Esponjas	0.5	100
Plantas superiores	2.5	2300
Hongos	0.02 - 0.17	20
Bacterias	0.002 - 0.06	2
Bacteriófago T <sub>4</sub> (por virión)	0.00024	0.22
Bacteriófago $\lambda$ (por virión)	0.00008	0.07

\*A. Lehninger. Bioquímica p. 676, 1977

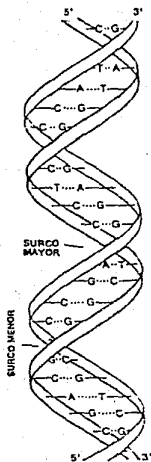
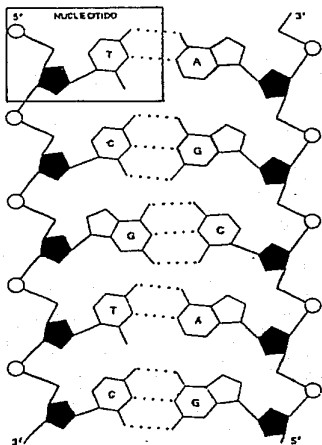


Figura 5. Estructura del ADN en la cual se identifican las cadenas antiparalelas y los surcos mayor y menor.\*

\*Felsenfel, G. I y C. p. 26, 1978



**Figura 6.** Estructura del ADN en dos dimensiones, en la cual se muestra la complementariedad de bases adenina-timina y guanina-citosina.\*

\*Felsenfeld, G. I y C. p. 26, 1978

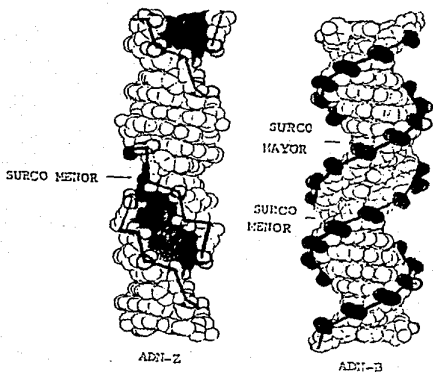


Figura 7. Esquema que muestra los modelos ADN-B y ADN-Z.\*

\*Rich, A. Ann. Rev. Biochem. 53: p. 791, 1984



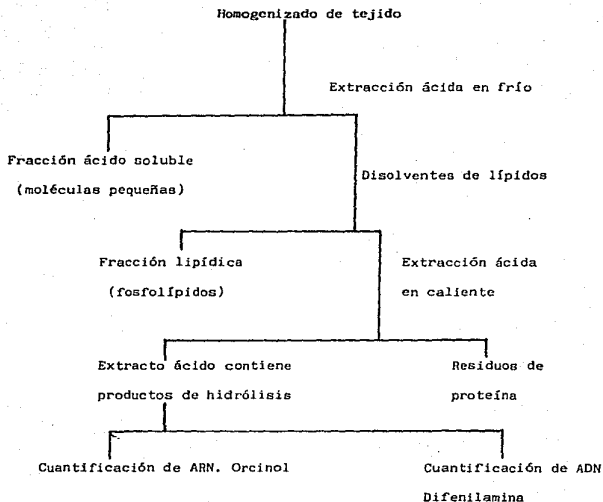


Figura 9. Procedimiento de Schneider para la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.\*

\*Methods of Biochem Anal. Vol XIV p. 115, 1967

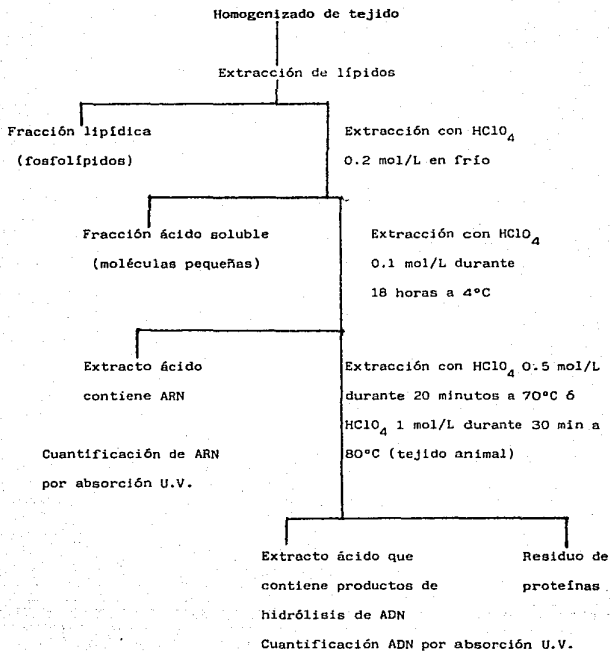


Figura 10. Procedimiento de Ogur-Rosen para la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.\*

\*Methods of Biochem Anal. Vol XIV p. 116, 1967



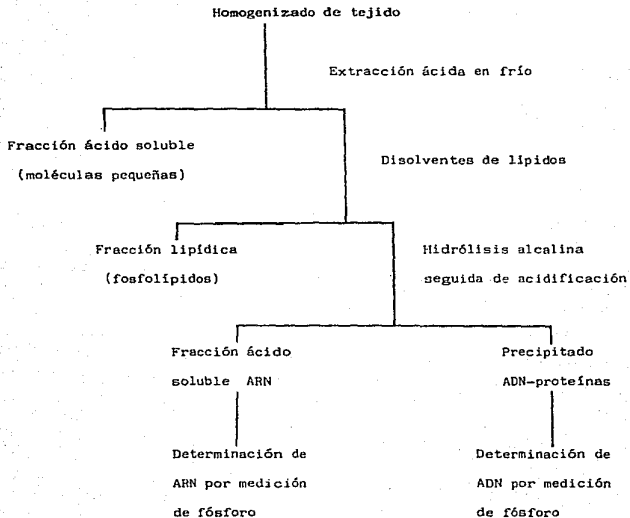


Figura 11. Procedimiento de Schmidt-Thannhauser para la extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.\*

\*Methods Biochem Anal. Vol XIV p. 114, 1967

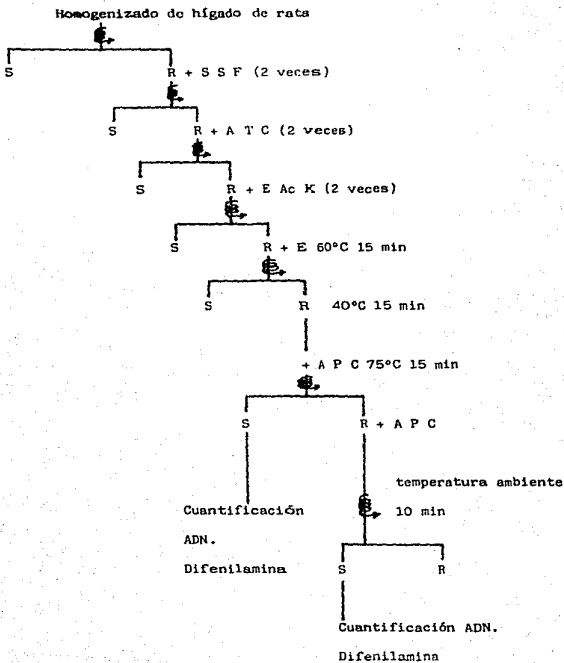



Figura 12. Procedimiento de Setaro y Morley para la extracción y cuantificación de ADN de hígado de rata.\*

\*Anal Biochem 81: p. 467-471, 1977

**Abreviaturas:**

- S S F - Solución salina fisiológica 0.9%
- A P C - Acido perclórico 1 mol/L
- A T C - Acido tricloroacético 0.6 mol/L
- E Ac K - Etanol-acetato de potasio 1%
- E - Etanol absoluto
- S - Sobrenadante
- R - Residuo
-  - 3500 rpm durante 20 min a 4°C

T a b l a 3

Hígado (g)	A D N (mg/g tejido)*	Recuperación %
5.36	12.33	100
5.49	12.63	102
5.24	12.05	98
4.96	11.41	93
5.78	13.29	108

\*1 g de tejido húmedo contiene 2.3 mg de ADN (25)

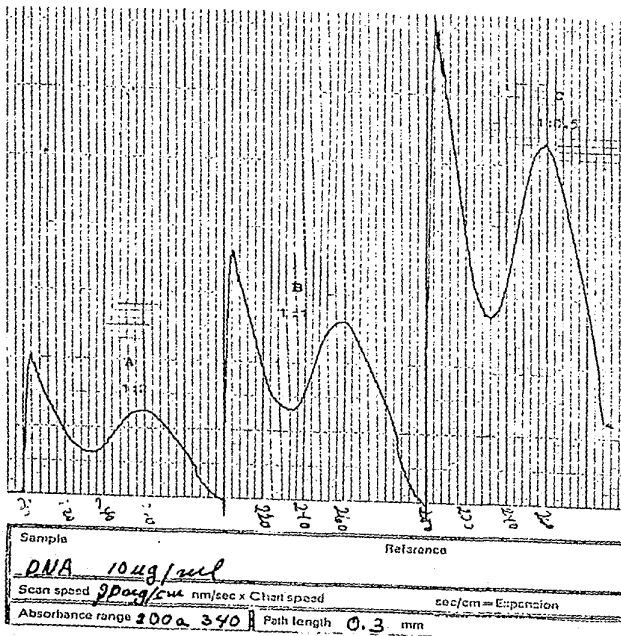


Figura 13. Espectros de absorción del ADN a longitudes de onda de 200 a 340 nm.

La solución de ADN de 10 µg se analizó a tres escalas del graficador: A. 1:2, B. 1:1 y C. 1:0.5

T a b l a 4

D F A (mg)	Tubos de reacción colorida	
	Blanco de reactivos	A D N *
	Absorbencias a 600 nm	
2	0.020	0.032
4	0.025	0.080
8	0.030	0.157
12	0.035	0.180
16	0.030	0.242
20	0.030	0.300
24	0.045	0.310

\*Concentración de 20  $\mu$ g de ADN en todos los tubos

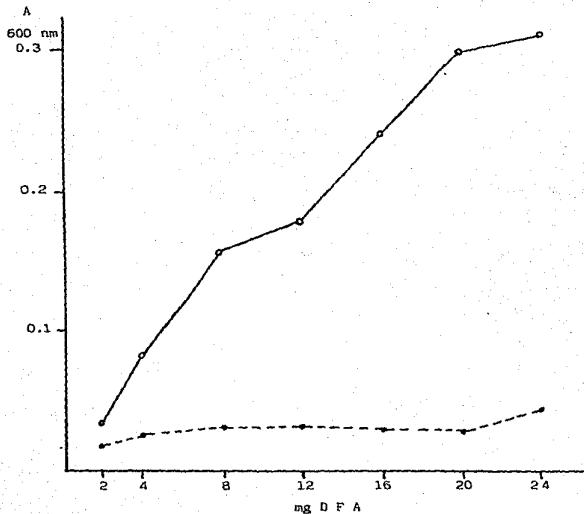


Figura 14. Gráfica que muestra el efecto de las concentraciones de difenilamina (D F A) en la reacción colorimétrica. La línea continua muestra la absorción de 20 µg de ADN y la línea discontinua indica la absorción del correspondiente blanco de reactivos, a las concentraciones de la DFA.

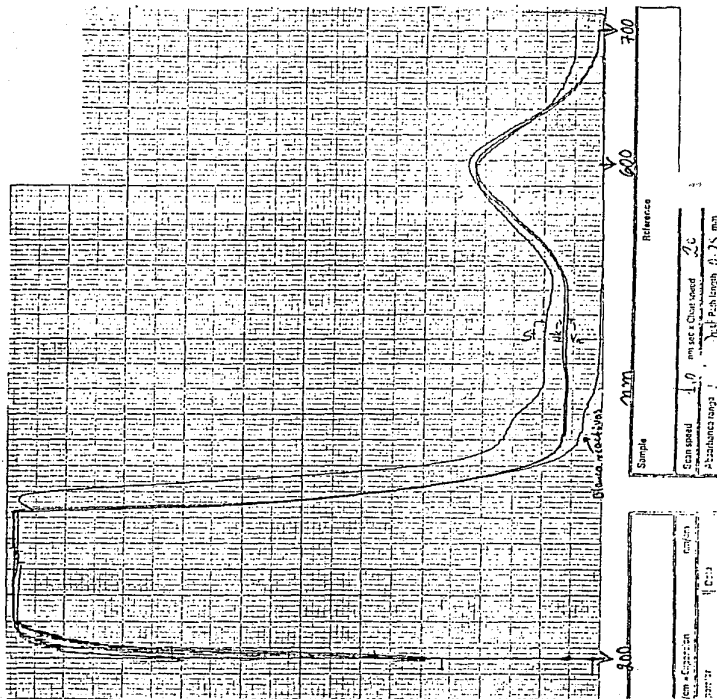


Figura 15. Espectro de absorción de la reacción colorimétrica del ADN con la DFA.

La solución de ADN de 30  $\mu\text{g/ml}$  se analizó de 200 a 700 nm más el blanco de reactivo contra agua. También se muestran los espectros de dos extractos de ADN hepático, analizados bajo las mismas condiciones.



T a b l a 5

A D N ( $\mu\text{g}$ )	$\text{HClO}_4$ 2 mol/L	$\text{HClO}_4 + \text{NaOH}$ 2 mol/L    5 mmol/L
Absorbencias a 600 nm		
10	0.130	0.160
20	0.350	0.320
30	0.580	0.480
40	0.840	0.650
50	0.940	0.800

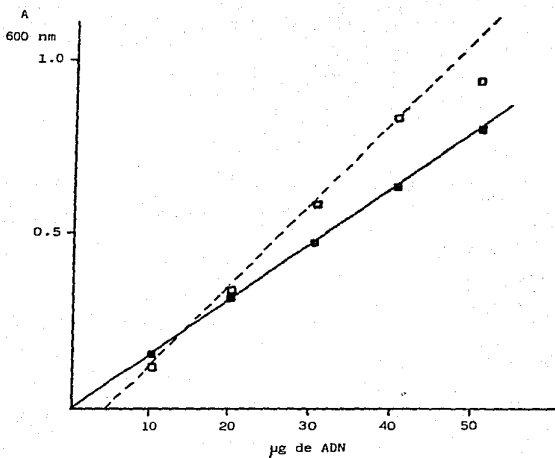


Figura 16. Gráfica de la solubilización del ADN en  $\text{HClO}_4$  1 mol/L y en  $\text{NaOH-HClO}_4$  2 mol/L. La línea continua representa la absorción del ADN solubilizado en  $\text{NaOH-HClO}_4$  y la discontinua al ADN solubilizado en  $\text{HClO}_4$ .

Tabla 6

A D N ( $\mu\text{g}$ )	Acido perclórico		
	1 mol/L	2 mol/L	3 mol/L
	Absorbencias a 600 nm		
10	0.150	0.180	0.300
20	0.190	0.330	0.460
30	0.330	0.480	0.600
40	0.320	0.650	0.800
50	0.470	0.800	0.960

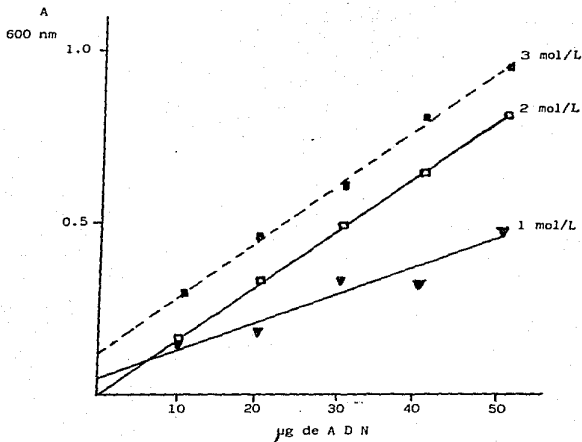


Figura 17. Gráfica que representa el efecto de la solubilización del ADN en diversas concentraciones del  $\text{HClO}_4$  en la reacción colorimétrica.

Cada línea muestra la absorción del ADN a las concentraciones indicadas en soluciones de 1 a 3 mol/L de  $\text{HClO}_4$ .

T a b l a 7

A D N (µg)	Acetaldehído (mg/ml)			
	1.6	3.2	4.8	6.4
	Absorbencias a 600 nm			
10	0.180	0.220	0.250	0.300
20	0.330	0.400	0.450	0.490
30	0.480	0.550	0.630	0.700
40	0.670	0.700	0.750	0.850
50	0.780	0.850	0.950	1.050

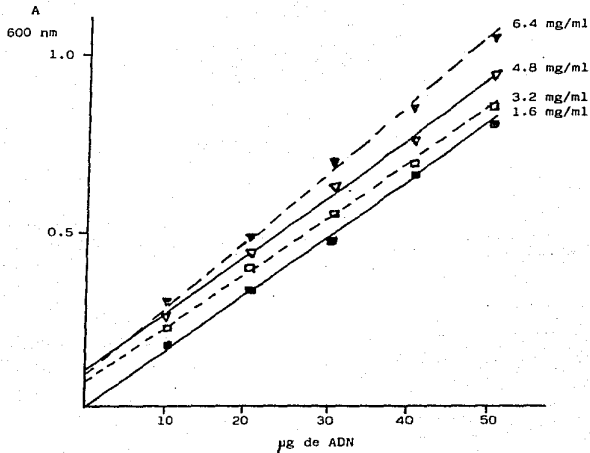


Figura 18. Gráfica que muestra el efecto de la concentración del acetaldehído en la reacción colorimétrica. Cada línea indica los valores de absorción del ADN con cada una de las diferentes concentraciones señaladas del acetaldehído.

T a b l a 8

A D N ( $\mu\text{g}$ )	Temperatura de incubación	
	30°C	37°C
	Absorbencias a 600 nm	
10	0.160	0.190
20	0.320	0.340
30	0.480	0.520
40	0.640	0.660
50	0.800	0.820

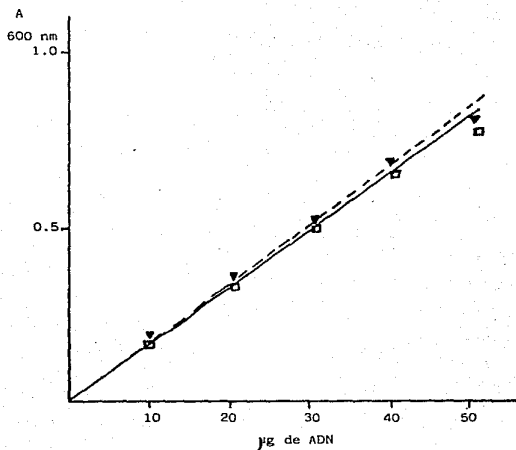


Figura 19. Gráfica que representa el efecto de la temperatura de incubación (18 horas) en la reacción colorimétrica.

La línea continua representa la absorción del ADN incubado a 30°C y la línea discontinua muestra la absorción del ADN incubado a 37°C.



T a b l a 9

A D N ( $\mu\text{g}$ )	Absorción 600 nm
0	0.025
10	0.180
20	0.350
30	0.500
40	0.670
50	0.830

$$y = 0.0162 x + 0.02$$

$$S_{xy} = 0.004$$

$$r = 0.9998$$

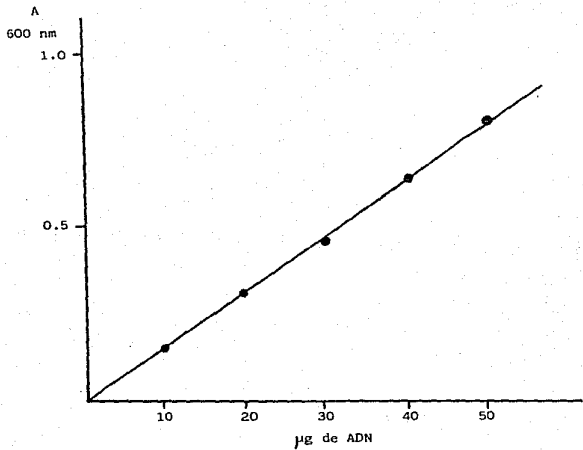


Figura 20. Gráfica de la curva patrón con solución estándar de ADN a diferentes concentraciones, de acuerdo a las condiciones establecidas en el trabajo experimental.

T a b l a 10

A D N mg/dl	Absorción porcentual
5	21.69
10	42.17
15	60.24
20	80.72
25	100.00

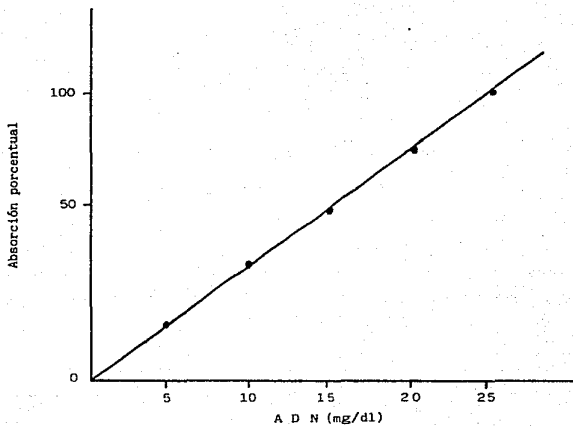
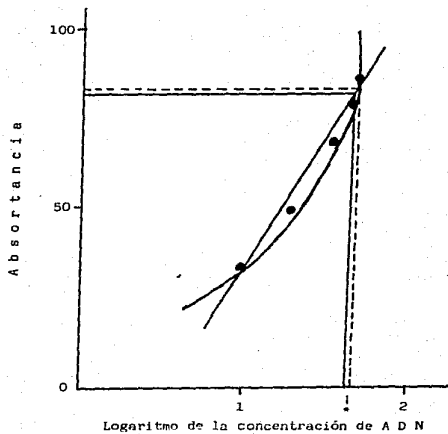


Figura 21. Gráfica de la curva patrón con solución estandar de ADN a diferentes concentraciones y su relación con sus respectivos valores de absorción. Determinación de la sensibilidad porcentual del ADN.

T a b l a 11

Solución estandar ug de A D N	log. de Conc. A D N	A <sub>600 nm</sub>	% de T	Absortancia
10	1.0000	0.182	65.77	34.23
20	1.3010	0.344	45.29	54.71
30	1.4771	0.506	31.19	68.81
40	1.6021	0.668	21.49	78.51
50	1.6990	0.830	14.79	85.21



**Figura 22.** Gráfica de la curva patrón con solución estándar de ADN a diferentes concentraciones. Correlación del logaritmo de las concentraciones del ADN contra sus respectivos valores de absorbancia. Determinación de la sensibilidad igual a 1.0 µg de ADN (\*).

T a b l a 1 2

Logaritmo de la concentración		Valores de absortancia		Ecuación de la recta	Error fotométrico porcentual
$X_1$	$X_2$	"Y <sub>1</sub> "	"Y <sub>2</sub> "	$y = m x + b$	
1.0000	1.3010	34.23	54.71	$y = 68.03 x + 0.263$	3.38
1.3010	1.4771	54.71	68.81	$y = 80.07 x + 0.425$	2.87
1.4771	1.6021	68.81	78.51	$y = 77.64 x + 0.587$	2.96
1.6021	1.6990	78.51	85.21	$y = 69.14 x + 0.749$	3.33

T a b l a 13

Técnica propuesta por	Componentes de la mezcla de reacción					
	Disolvente	A D N	D F A	H C L O <sub>4</sub>	Acetaldehído	Volumen por tubo
Burton K.	HClO <sub>4</sub> 1 mol/L	250 ug/ml	4 %	1 mol/L	1.5 mg/ml	1.1 ml
	Concentración/ml	10-50 ug	20 mg	0.0001 mol	0.16 mg	
	Concentración final por tubo	10-50 ug	24 mg	0.0001 mol	0.176 mg	
Técnica modificada propuesta	Disolvente	A D N	D F A	H C L O <sub>4</sub>	Acetaldehído	Volumen por tubo
	NaOH - HClO <sub>4</sub> 5 mmol/L 2 mol/L	250 ug/ml	4 %	2 mol/L	1.6 mg/ml	
	Concentración/ml	10-50 ug	20 mg	0.0002 mol	0.16 mg	1.025 ml
Concentración	10-50 ug	21 mg	0.0002 mol	0.164 mg		



## Referencias bibliográficas.

- 1.- ATEN F.R., Weinberger J.M. y Eisenfeld J.A.  
Estrogen receptor in rat liver: translocation to the nucleus in vivo.  
Endocrinol. 102: 433-442, 1978.
- 2.- AVERY O.T., Maleod C.M. y McCarty M.  
Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III.  
J. Exptl. Med. 79: 137-158, 1949.
- 3.- BAULIE E.E., Raynaud J.P. y Milgron E.  
Measurement of steroid binding proteins.  
Acta Endocrinol. Suppl. 147: 104-121, 1970.
- 4.- CHARGAFF E.  
Chemical specificity of nucleic acid and mechanism of their enzymatic degradation.  
Experientia. 6: 201-209, 1950.
- 5.- BOHINSKI R.C.  
Bioquímica.  
México, Fondo Educativo Interamericano, 1978.
- 6.- BURTON K.  
Determination of DNA concentration with diphenylamine.  
Methods in Enzymology. 12B, 163-166, 1968.
- 7.- DAVIDSOHN I. y Henry B.J.  
Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Todd-Sanford.  
Barcelona. Salvat, Editores, S.A., 1979.

8.- DE MOOR P. y Denef C.

The puberty of the rat liver, femenine pattern of cortisol.  
Metabolism in rats castrated at birth.  
Endocrinol. 82: 480-492, 1968.

9.- DENEf C. y De Moor F.

The puberty of the rat liver, II. Permanent changes  
in steroid metabolizing enzymes after treatment with  
a single injection of testosterone propionate at birth.  
Endocrinol. 83/4: 791-798, 1968.

10.- EINARSSON K., Gustafsson J.A. y Stenberg A.

Neonatal imprinting of liver microsomal hydroxylation  
and reduction of steroids.  
J. Biol. Chem. 248/14: 4987-4997, 1973.

11.- EISENFELD J.A. Weinberger M.A. y Haselbacher G.

Estrogen receptor in the mammalian liver.  
Science. 191/4229: 862-864, 1976.

12.- FELSENFELD G.

The double helix can change its shape, enabling it  
to interact with various regulatory molecules.  
Scientific American. 253/4: 44-53, 1985.

13.- GALEN W.E.

Métodos Instrumentales de Análisis Químicos.

México, Mc Graw-Hill. 1978.

14.- GILES K.W. y Myers A.

An improved diphenilamine method for the estimation  
of deoxyribonucleic acid.  
Nature. 206: 93, 1965.

- 15.- GORSKI R.A.  
The neuroendocrinology of reproduction: An overview.  
Biol. Reprod. 20: 111-127, 1979.
- 16.- GURRIA R.M.  
Taller de control de calidad en el laboratorio clínico.  
s/e, México, 1978.
- 17.- GUSTAFSSON J.A., Ingelman-Sundberg M. y Stenberg A.  
Neonatal programing of androgen responsiveness of adult  
rats.  
J. Biol. Chem. 249: 719-723, 1970.
- 18.- HUTCHISON W.C., Downie E.D. y Munro H.N.  
Biochim. Biophys. Acta. 55: 561, 1962.
- 19.- INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL.  
Manual de prácticas de laboratorio del curso de técnicas  
especiales.  
Depto. de Bioquímica, ENCB. IPN., 1982.
- 20.- KELLER R. y Neville M.  
Determination of total protein in human milk. Comparison  
of methods.  
Clin. Chem. 32: 120-123, 1986.
- 21.- LEHNINGER A.L.  
Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura  
y función celular.  
Barcelona, Ediciones Omega. 1977.
- 22.- LEHNINGER A.L.  
Bioenergética.  
E.U.A., Fondo Educativo Interamericano., 1975.

23.- LIZARRAGA G. I.M.

Estadística.

México, Mc. Graw Hill., 1985.

24.- METCOFF J., Yoshida T., Morales M., Rosado A. y Al-Ubardi Y.

Biomolecular studies of fetal malnutrition in maternal leukocytes.

Pediatrics. 47/1: part. II, 1971.

25.- MUJICA De Hernández A.

Estudio de las alteraciones iniciales en hígado de rata producidas por la intoxicación con hidrazina.

Tesis de Maestría en Ciencias, Especialidad Bioquímica.  
CIEA. IPN., 1969.

26.- MUNRO H.N.

The determination of nucleic acids.

Methods of Biochemical Anal. XIV, 113-176, 1967.

27.- NHORA de Merino.

Instrumentación en el laboratorio clínico.

México, Ames Company. 1976.

28.- OLVERA M.A.

Receptores estrogénicos en el citosol del hígado y del páncreas durante la ontogenia de la rata.

Tesis de Maestría en Ciencias, especialidad en Bioquímica  
CIEA, IPN, 1978.

29.- OGUR M. y Rosen G.

Arch. Biochem. 25: 262, 1950.

30.- RICH. A., Nordheim A. y Wang A.H.J.

The chemistry and biology of left-handed Z-DNA.

Ann. Rev. Biochem. 53: 791-846, 1984.

- 31.- SETARO F., Morley C.D.G.

A rapid colorimetric assay for DNA.

Anal. Biochem. 81: 467-471, 1977.

- 32.- SCHMIDT G. y Thannhauser S.J.

J. Biol. Chem. 161: 83, 1945.

- 33.- SCHNEIDER W.C.

J. Biol. Chem. 161: 293, 1945.

- 34.- WATSON J.D. y Crick F.H.C.

Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid.

Nature. 171: 737-738, 1953.

- 35.- WILKINS M.H.F.

Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 21: 75-87, 1953.

- 36.- WILLARD H.N., Merritt L.L. y Dean J.A.

Métodos instrumentales de análisis.

México, C.E.C.S.A., 1974.