

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

**“DETERMINACION DEL DNA EN EL TIMO  
DEL GANADO BOVINO”**

TESIS PRESENTADA POR

JOSE RICARDO LOPEZ BRITO

COMO ACTO PREVIO DE SU  
INVESTIDURA ACADEMICA PARA  
OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO  
EN QUIMICA FARMACEUTICA

SAN SALVADOR; EL SALVADOR, C. A.  
SEPTIEMBRE, DE 1969





J U R A D O S D E T E S I S

DR. P E D R O G E O F F R O Y L.

DR. J E F F N I C H O L S

DR. M A U R I C I O A L V A R C Z

D E D I C A T O R I A

---

A D I O S T O D O P O D E R O S O

A M I S P A D R E S:

JOSE ANTONIO LOPEZ RIVERA  
ROSA ELVIRA TENORIO DE LOPEZ

A M I E S P O S A:

MARIA CLEMENTINA DE LEON DE LOPEZ

A M I S H E R M A N O S:

MARIO SALVADOR  
ANA HORTENCIA  
GLADYS HAYDEE, Y  
DAISY.

A M I T I O:

JORGE BRITO

A M I S P R O F E S O R E S, C O M P A Ñ E R O S  
Y A M I G O S.

A G R A D E C I M I E N T O

A LOS DOCTORES PEDRO GEOFFROY  
Y JEFF NICHOLS POR SU ACERTADA  
DIRECCION Y CONSEJOS QUE  
ME BRINDARON Y EN GENERAL A  
TODO EL PERSONAL DOCENTE, ADMI  
NISTRATIVO Y DE SERVICIO DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS.

DETERMINACION DEL DNA

EN EL TIPO DEL GANADO

BOVINO.-

# I N D I C E

## I.-

### I N T R O D U C C I O N

- 1) Historia de los ACIDOS NUCLEICOS.
- 2) Importancia del DNA en los cromosomas.
- 3) Composición Química y Estructura del DNA según WATSON Y CRICK.
  - a) Composición Química
  - b) Estructura del DNA.
- 4) Historia de la Investigación de Extracción de los ACIDOS NUCLEICOS.
- 5) Resumen de los Tres Procesos de Extracción más importantes.
- 6) Proceso escogido por MUNRO Y FLECK
- 7) Propósito del presente trabajo.

## II.-

### P A R T E E X P E R I M E N T A L

- 1) Material y Equipo.
- 2) Desarrollo del Ensayo para la determinación del DNA
  - a) Teoría
  - b) Resultados
  - c) Resumen del Proceso de nuestra determinación del DNA.
- 3) Tratamiento Preliminar del Tejido
  - a) Teoría
  - b) Práctica

- 4) Extracción de lípidos en los tejidos.
  - a) Teoría
  - b) Práctica
  - c) Resultados.
- 5) Remoción de Compuestos de Bajo Peso Molecular
  - a) Teoría
  - b) Práctica
  - c) Resultados
- 6) Hidrólisis en Hidróxido de Sodio.
  - a) Teoría
  - b) Práctica
  - c) Resultados.

III.- C O N C L U S I O N E S .

IV.- B I B L I O G R A F I A .



1.-

INTRODUCCION.-

## HISTORIA DE LOS ACIDOS NUCLEICOS.-

Biologistas por muchos años se han interesado en el campo de sustancias químicas como ácidos nucleicos, las cuales junto con las proteínas, componen la principal macromoléculas constituyentes de las células. La historia de los ácidos nucleicos empieza en el año 1869 donde Friedrich Miescher (14) un bioquímico suizo, trabajó en Tubigen, Alemania, separando sustancias químicas de la células, una de las cuales las llamó "NUCLEIN", del núcleo de las células de pus. Miescher mas tarde retornó a Basle y continuó su trabajo sobre el "NUCLEIN" extrayéndolo del espermatozoide del salmón. Mas tarde descubrieron que el "NUCLEIN" tenía propiedades de ácido y así convinió en llamarlo como ácido "NUCLEICO".-

Existen dos tipos de ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), cuya química nosotros discutiremos cortamente.-

Análisis químicos y desarrollo de colorantes histoquímicos, revelaron técnicas de que el DNA de las células, está restringido al núcleo y aparece localizado en los chromosomas mientras que el RNA está sobre otra parte del núcleo como bien el citoplasma. Muchas evidencias indirectas eventualizaron a una íntima y universal asociación de DNA con el material genético, por ejemplo:

1) El DNA está presente en todas las células, como animales, - plantas o bacterias; en ellas está virtualmente restringida al núcleo.-

2) Todas las células somáticas de cualquier especie contienen una cantidad constante de DNA presindiendo de la función diferencial de RNA, sobre lo contrario, varía marcadamente con el mecanismo de actividad.-

3) La acción de la mutación genética de la luz U.V. tiene su - culminación que parte del espectro (253,7 A<sup>m</sup>) los cuales están específicamente absorbidos por los ácidos nucleicos.-

4) La adición de ácidos nucleicos de la misma especie pero con un genotipo diferente, cambia el fenotipo de la célula.-

Para decirlo en pocas palabras, la actual hipótesis de trabajo sienta el principio de que los genes, situados en el cromosoma, están compuestos de DNA (ácido desoxirribonucleico). Cada gene contiene información codificada en forma de una serie específica de nucleótidos - depúrina y pirimidina adjuntos a la molécula de DNA. Cada gene tiene una serie diferente. Esta información pasa del DNA de un gene a una - clase especial de RNA (ácido ribonucleico), llamada mensajero RNA. Este elemento que sintetiza el núcleo, pasa a los ribosomas del retículo endoplasmático, donde se combina con el RNA, presente, y da un modelo para la síntesis de una enzima o cualquier otra proteína, específica. La información primero codificada como una serie específica de nucleótidos en el mensajero RNA y por último es llevada en el mismo orden --

específico de aminoácidos a la molécula de proteína. A continuación po demos estudiar algunas pruebas y aspectos sobre los que se funda la hi pótesis.

#### IMPORTANCIA DEL DNA EN LOS CROMOSOMAS.-

Se ha demostrado que los cromosomas contienen DNA, RNA y bas tantes variedades de proteínas. Científicos han procedido a análisis - químicos directos de los cromosomas aislados. Mediante la homogeniza-- ción de células y separación de sus núcleos por centrifugación, con - nueva homogenización de los mismos, dichos científicos han logrado - - muestras de cromosomas puros con ultracentrifugación. Con el previo re cuento celular y luego el análisis químico, Mirsky (15), del instituto Rockefeller, demostró que hay alrededor de  $6 \times 10^{-9}$  miligramos de DNA por núcleo de las células somáticas y  $3 \times 10^{-9}$  miligramos en los nú--- cleos de óvulos o de los espermatozoos. En los tejidos de reconocido - carácter poliploide (con mas de dos pares de cromosomas por núcleo), La cantidad de DNA en el núcleo corresponde al múltiplo de cromosomas de los que se sabe su presencia. Las células con cuatro pares de cromoso- mas (tetraploides) se han visto con un contenido nuclear de  $12 \times 10^{-9}$  de DNA. En otros análisis se ha demostrado que dicha cantidad es esen- cialmente la misma en todas las células de un organismo determinado. - La cantidad de variedad de proteína (la histona), también es constante en las diferentes células. Por contraste, la cantidad de RNA es bastan

te variable en las células; de este hecho se deduce que, por la constancia de DNA como de genes en todas las células, y por ser de la mitad de las germinales, el DNA es parte esencial de la materia genética.-

Si los cromosomas se trataran con desoxirribonucleasa, enzima que específicamente hidroliza el DNA, éste se elimina de cromosomas, pero queda lo que podríamos llamar la "sombra" del mismo. Por el contrario, un cromosoma tratado con enzimas proteolíticas se fragmenta lo que sugiere su estructura a base de un núcleo continuo de proteínas a lo largo de la cual hay concentraciones de DNA. Daniel Mazia (15), de la Universidad de California, ha demostrado que los cromosomas pueden hacerse solubles mediante agentes como el Vernese, el cual solo debería desintegrar los lazos salinos. El tratamiento con dicho agente de partículas del tamaño de una banda de cromosomas. Mazia interpretó esta observación en el sentido de que el DNA y las proteínas de los cromosomas están reunidos normalmente por cationes bivalentes como los calcio y magnesio, de manera que al ser eliminados por la acción del Vernese, se desintegra el ácido nucleico y las proteínas. Si se sacan conclusiones de este conjunto de hechos se llega al concepto de que el cromosoma, está formado por una proteína fundamental, a lo largo de la cual están implantados moléculas de proteínas las que conservan su posición por eslabones de sales cálcica y magnésicas.

COMPOSICION QUIMICA Y ESTRUCTURA DEL DNA SEGUN

WATSON Y CRICK.

COMPOSICION QUIMICA: Del gran número de vegetales, animales y agentes bacterianos se ha logrado extraer DNA en alto grado de pureza. Con el análisis se ha puesto de relieve que consta de un azúcar, la de soxirribosa, ácido fosfórico y bases nitrogenadas; de éstas últimas se han encontrado cuatro clases; dos purinas (adenina y guanina) y dos pi rimidinas (citosina y timina). Al poderse aislar, purificar y analizar, mas muestras de DNA, han descubierto que las proporciones de estas cla ses purínica y pirimídica eran distintas, aunque según un tipo común. En todas las muestras, la cantidad total de purinas era igual a la de pirimidina, la de adenina igual a la timina, y la de guanina igual a - la citosina.- El DNA aislado de los tejidos de los mamíferos es en - general más abundante en guanina y citosina, y relativamente mas esca sa en adenina y timina.-

ESTRUCTURA DEL DNA: La regularidad de las estructuras repeti-- das constituía una paradoja, porque los análisis químicos indicaban - que las bases purina y pirimidina presentaban una sucesión al azar, y a pesar de esta distribución casual, las imágenes obtenidas con los - rayos X mostraban una regularidad repetitiva. Wilkins puso estos cono-- cimientos a disposición de sus colegas de Cambridge. Watson y Crick co nocían los resultados analíticos de Chargaff, que indicaban la equiva-- lencia cuantitativa de la guanina y la citosina con la adenina y la ti

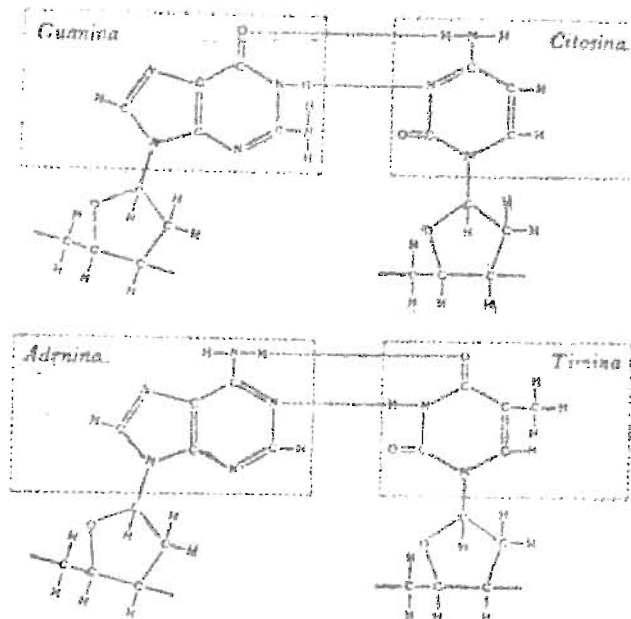
mina. Por último, Gulland había insistido en la existencia de numerosos enlaces de hidrógeno, e incluso había sugerido que las cadenas de DNA podían reunirse por enlaces de hidrógeno para formar complejos de muchas cadenas.-

Watson y Crick aportaron nueva herramienta a la tarea; el análisis conformacional. Este pasatiempo intelectual constituye un apéndice de los conocimientos sobre la estructura de los átomos y moléculas reunidos por los cristalógrafos de rayos X. Se conoce con mucha precisión el tamaño real de los diversos átomos, representándolos con esferas unidas por pequeñas varitas que reproducen la distancia de los enlaces. La investigación científica se ha titulado jocosamente juego - organizado para adultos; nuestros juegos para armar son los modelos moleculares, por medio de los cuales pueden explorarse la plausibilidad de varias estructuras moleculares. Porque si un átomo no puede alcanzar a otro, o es demasiado voluminoso para ocupar determinado sitio en el modelo a escala, su existencia en una molécula estable resulta muy improbable.

Watson y Crick hicieron modelos a escala de las cuatro bases del DNA, y encontramos que si se colocan juntas (como si se uniera por un enlace de hidrógeno) adenina con timina y guanina con citosina, las dimensiones totales de esas dos parejas son idénticas. Esto fué motivo de regocijo, porque de acuerdo con los datos de Chargaff, en cada uno

de estos pares, las unidades se encuentran en cantidades equivalentes y si formaban tales parejas en el DNA, esta equivalencia analítica era obligatoria.-

La formación de estos pares unidos por enlaces de hidrógeno, con dimensiones idénticas, podía resolver la paradoja que constituían los datos de los rayos X, la aparición de estructuras repetitivas casi idénticas a pesar del desorden de la sucesión al azar de las bases. Las unidades que se repiten, no son bases aisladas de diferentes tamaños, sino pares de bases de dimensiones iguales. Las estructuras unidas por enlaces de hidrógeno de dos pares de bases complementarias, son las que se muestran enseguida:





*Arquitectura de los Acidos Nucleicos*



*Sucesión complementaria de las bases en los dos hilos de la doble hélice.*

9

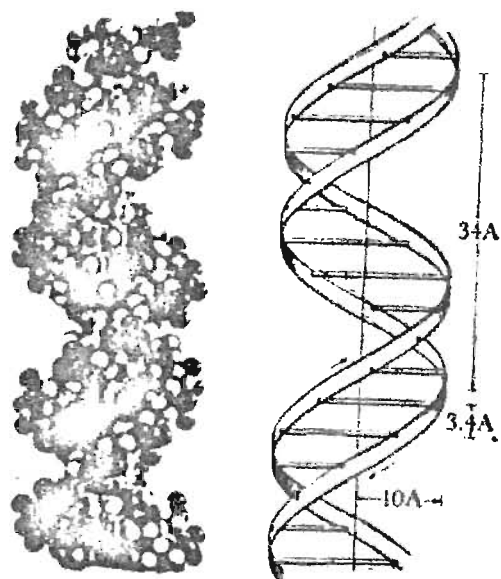
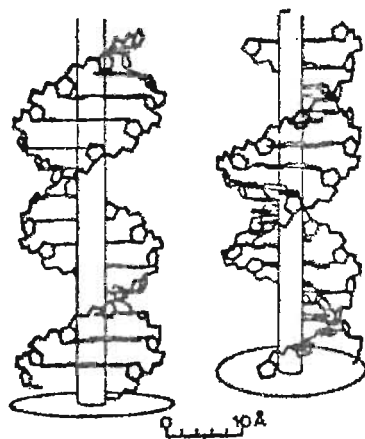


Fig. 7.2.

9

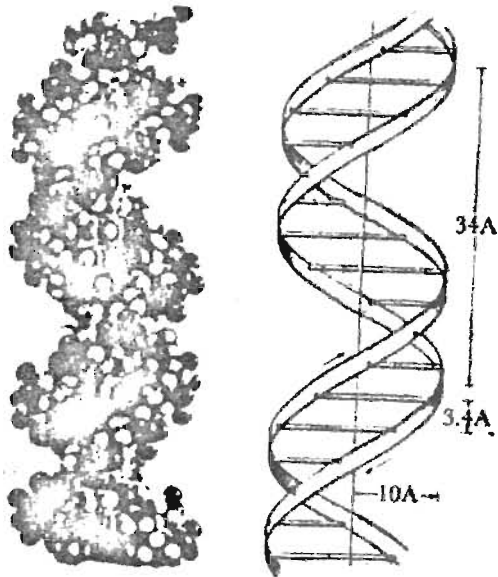
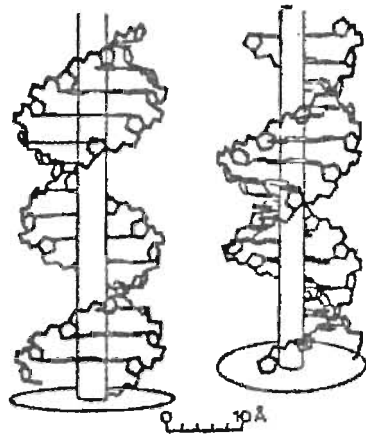


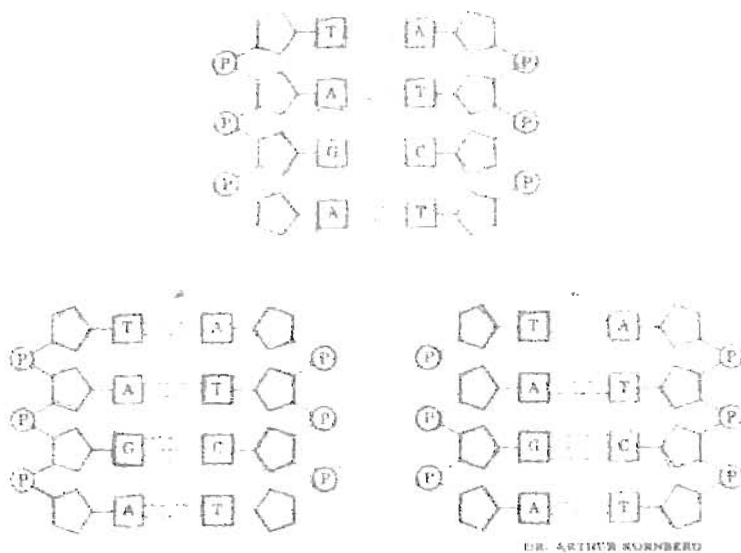
Fig. 7.2.

El modelo de Watson y Crick (6) del DNA, como se le llama, -  
 consiste pues en una doble hélice, con una cadena girando alrededor -  
 de la otra. La sucesión de bases en cada cadena complementa la de la  
 otra. Enseguida se asienta una representación bidimensional de un seg  
mento de DNA. En 10 años el modelo DNA ha salido de la torre de mar--  
 fil de los laboratorios, a la exhibición pública. Esta brillante hipóú  
 tesis es compatible con todos los caracteres físicos conocidos del -  
 DNA, y además predice una de sus importantes funciones biológicas, su  
 modo de duplicación. Por su trabajo y brillante explicación de la es-  
 tructura del DNA, Watson y Crick ganaron en 1951, el premio Nobel.-

Antes de dividirse la célula, su contenido de DNA, debe dupli-  
 carse, para que cada célula hija quede dotada con reproducciones impe-  
 cables del material genético total. Una estructura de DNA con dos hé-  
 lices idénticas unidas por enlaces de hidrógeno proporciona el modelo  
 ideal para ésta duplicación. Si los dos hilos se separan como las dos  
 mitades de un cierre automático, y cada medio resorte sirve de modelo  
 sobre el cual puede reproducirse la otra mitad, por ejemplo una timina  
 frente a una adenina, y una guanina frente a una citosina, esto garan-  
 tiza la duplicación exacta del DNA, y en consecuencia, del gene.

Este método de duplicación del DNA está representado esquemáú  
 ticamente a continuación, donde la letras mayúsculas representan las -  
 bases ( T en lugar de timina, A de adenina, C de citosina, y G, de gua

nina; P representa el enlace de fosfato, y los pentágonos, la desoxirribosa):



Esquema de la duplicación de un modelo de Watson y Crick del DNA. Las cadenas de polinucleósidos en línea gruesa de las dos moléculas hijas, representan los filamentos recién sintetizados.-

HISTORIA DE LA INVESTIGACION DE LA EXTRACCION DE  
LOS ACIDOS NUCLEICOS.

En vista del rápido desarrollo en las técnicas para el fraccionamiento de ácidos nucleicos, hay un interés considerable en la medición de la cantidad total de ácidos nucleicos en tejidos de planta, animal y bacterias. En 1961 Hutchisem y Munro (8), hacen un detallado estudio de toda la literatura sobre ácidos nucleicos publicando datos y concluyendo que no son infalible los procesos hasta ahora ideados.-

Desde 1961 no han sido introducidos principios importantes lo cual hace patente el valor como métodos de estimación de ácidos nucleicos. Sin embargo algunos de los problemas asociados con varios métodos han sido ahora resueltos y esto es consecuentemente apropiado a hacer patente la reaparición de valiosos procesos para la estimación de ácidos nucleicos.-

Los métodos revisados aquí, haran reestrictas una aplicación de determinación cuetitativa de ácidos nucleicos en material biológico.-

Mas adelante, métodos específicos para la estimación de ácidos nucleicos pueden ser aplicados a un tejido, esto es generalmente necesario sujetar el tejido a ciertos procesos preliminares para la remoción de componentes que pueden interferir con la estimación de los ácidos, después de ústo los ácidos son extraídos en un estado parcial--

mente purificados y finalmente estimados.-

Aunque haya muchos métodos para la extracción de los ácidos nucleicos, la mayoría de los investigadores han usado variantes de tres métodos, llamados por sus originadores: Schmidt y Thannhauser (13); Schneider (11) y Ogur y Rosen (10).

#### RESUMEN DE LOS TRES METODOS DE EXTRACCION MAS IMPORTANTES.

En los tres procesos, el paso inicial es designado a remover las moléculas pequeñas (nucleótidos libres) y lípidos, sobre la región en que los componentes ácido-solubles y lípidos pueden interferir con las reacciones químicas aplicadas en la estimación de los ácidos nucleicos. En el caso de Schmidt-Thannhauser y Schneider, el tejido homogenizado es previamente extraído con ácido frío y luego por solventes lípidos. En el método de Ogur-Rosen, el primer paso es remoción de lípidos, seguido por el tratamiento con ácido frío.-

Después de éstos tratamientos preliminares, los ácidos nucleicos son extraídos del residuo de tejidos. En el caso de Schmidt-Thannhauser el residuo de tejido es digerido en álcali el cual cambia el RNA en una forma no grandemente precipitable por ácido. Consecuentemente puede ser separado del tejido el DNA por digestión ácida la cual causa precipitación de DNA y proteína. En el proceso de Schneider, TCA caliente ó ácido perclórico caliente es usado en extracción de ambos ácidos nucleicos; el tejido de proteínas es relativamente insoluble

ble en ácido caliente. Finalmente, en el método de Ogur-Rosen, RNA es extraído con ácido perclórico frío de conveniente fuerza y el DNA es subsecuentemente removido con ácido perclórico caliente.

La etapa final de los tres procesos es la estimación de las cantidades de RNA y DNA en el extracto, Los ácidos nucleicos contienen tres distintos componentes químicos:

- a) purinas y bases pirimidicas
- b) ribosa y desoxirribosa
- c) fosfuros.

Consecuentemente los métodos de determinación de ácidos nucleicos pueden basarse sobre la intensidad de absorción ultravioleta sobre reacciones específicas para las pentosas o sobre la estimación de fosfuros en el extracto. Un método de estimación dependiendo de absorción ultravioleta o sobreestimación de fosfuros, sin distinguir entre RNA y DNA, estos son los métodos de Schmidt-Thannhauser y Ogur-Rosen, por lo tanto puede ser aplicado solamente cuando los dos ácidos son primeramente bien separados. Por otro lado reacción de color específica para ribosa y desoxirribosa, admite hacer la estimación de RNA y DNA independientemente en la misma solución. Esta es la base del proceso de Schneider.

Durante los pasados 20 años, numerosos investigadores han usado estos tres procesos básicos, al analizar el ácido nucleico contenido en tejido de plantas y animales, y microorganismos. Muchas modifica



ciones en los métodos originales han sido descritas.

Sin embargo, con cada tejido hay que desarrollar por medio de la investigación, un método específico para la extracción de los ácidos nucleicos.-

PROCESO ESCOGIDO . POR MUNRO Y FLECK

Munro y Fleck (9), hicieron un estudio de los tres métodos y concluyeron que en general el método de Schmidt-Thannhauser, tiene la mejor base técnica y práctica. De las varias modificaciones de este método, ellos escogieron el siguiente proceso para la extracción de hígado de ratón:

"Hacer una solución 1:20 del tejido homogenizado en ácido frío con agua destilada. Pipetear 5 c.c. (equivalente a 250 miligramos de peso húmedo) de el tejido dentro de un tubo de 15 c.c. adicionar 2.5 c.c. de ácido frío, mezclar y mantenerlo por espacio de 10 minutos a 0°C.- Centrifugar, y luego descartar la fracción supernadante (fracción ácido-soluble) y lavar el precipitado dos veces con ácido perclórico 0.2 N frío. Desaguar el exceso de ácido por inversión al tubo brevemente sobre papel filtro.-

Adicionar 4 c.c. de KOH, 3 N e incubar a 37°C por espacio de 1 hora (horno o baño de maría), después de la incubación enfriar con hielo y precipitar las proteínas y el DNA por adición de ácido perclórico 2 N. Después de esperar por tiempo de 10 minutos en frío, centriu

fugar el precipitado y decantar la fracción supernadante (RNA). Lavar dos veces con 5 cc. de ácido fosfórico 0.2 N y adicionar los lavados a la fracción de RNA. Seguidamente adicionar 10 c.c. de ácido perclórico 0.6 N a la fracción de RNA y lavados esta fracción se lleva hasta 100 c.c. con agua destilada, donde una solución de ribonucleótidos en ácido perclórico 0.1 N de absorción ultravioleta la cual es leída a 260 milimicras.

La estimación del contenido de DNA en el precipitado obtenido sobre la acidificación de digestión alcalina, es disuelta en 5 c.c. de KOH 0.3 N por calentamiento breve a 37°C, si es necesario la solución es llevada a 50 c.c., incluyendo una adición de 12 mililitros de KOH 0.3 N dando una solución de DNA en KOH 0.1 N.- 2 c.c. de ésta solución es usada para la estimación de DNA por el método de Ceriotti (4).-

El mencionado método de Ceriotti, es una modificación de la reacción de Dische en que "desoxipentosa hace una reacción con difenilamina en una mezcla de ácido acético glacial y ácido sulfúrico a 100°C para dar un color azul, que es estable después de 10 minutos de calentado (5)".

PROPOSITO DEL PRESENTE TRABAJO.

Nosotros empezamos con el método escogido por Munro-Fleck realizando que cada tejido tiene sus peculiaridades y que por lo tan-

to es necesario hacer modificaciones para la mejor extracción de los -  
ácidos nucleicos en cada tejido.

Así que el propósito de éste trabajo presentado aquí, es el de  
sarrollo de una modificación del método de Munro-Fleck (originalmente  
Schmidt-Thannhauser) para la extracción de los ácidos nucleicos del Ti  
MO del ganado bovino.-

2.-

P A R T E   E X P E R I M E N T A L

MATERIAL Y EQUIPO

1.- a) MATERIAL GENERAL:

Osterizador, centrífuga, refri-  
gerador, mechero y material de rutina en el laborato--  
rio de microbiología.-

b) MATERIAL ESPECIAL:

Alcohol 90%; ácido tricloro -  
acético (TCA); éter, cloroformo, hidróxido de potasio,  
ácido perclórico, ácido acético, difenil amina reacti-  
vo (ácido sulfúrico difenilamina, ácido acético), ace-  
taldehído.-

2.- TIMO extraído del ganado bovino.

EQUIPO: Calorímetro BAUSCH AND LOMB.

3.- METODO DEL TRABAJO: Cada experimento fué repetido por  
lo mínimo dos veces y el DNA determinado a varias con-  
centraciones.-

DESARROLLO DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE DNA.

Según la recomendación de Munro y Fleck (9), escogí primeramente un ensayo para la determinación de DNA basado en la reacción de la porción de desoxirribosa. El ensayo escogido por ellos para hígado, es la reacción de la desoxirribosa con difenilamina, descrita en página - de la presente tesis. Dicho proceso es una modificación de la reac--- ción descubierta originalmente por Discho (5) y modificada por Burton (1).

Según Burton (2), el mecanismo de la reacción es el siguiente; Los enlaces entre las purinas y la desoxirribosa son débiles y la difenilamina reacciona con los residuos de pentosa originalmente combina-- dos con las purinas. Por la distribución al azar de las bases la deter<sup>u</sup> minación es válida para cualquier DNA.

Burton cambió las condiciones para el desarrollo del color en el ensayo por la adición de acetaldehído y también varió el tiempo de desarrollo de dicho color: en lugar de 10 minutos a 100°C que usaba -- Discho, tomó un tiempo de más horas.- Burton (2), Creft y Lubran (4); Giles y Myers (7), propusieron otros cambios en adición de otros reac- tivos, la proporción de acetaldehído a la solución de DNA y el tiempo de desarrollo de color. La reacción de Discho es una reacción en que el calor de solución es proporcional a la cantidad de DNA presente en el ensayo. Los cambios propuestos son con el propósito de exagerar el

color y entonces hacer un ensayo mas fino. Naturalmente, el ensayo es cogido por un investigador dependerá del tejido, las condiciones de ex tracción del DNA y el estado de los re ctivos. El mejor método de de terminación sería el que hace la mayor diferenciación entre dos canti dades DNA (la diferencia de color de los dos, medidos por la densidad optical es máxima) y naturalmente el proceso en que la densidad opti-- cal es directamente proporcional a la concentración de DNA.

Nosotros probamos las modificaciones propuestas por Ceriotti - (3), Burton (2), Creft y Lubran (4) y por Giles y Myers (7), con va- - rios tiempos y condiciones del desarrollo del color.-

Ceriotti, propuso el método descrito en la página de la - presente tesis. Usando nuestros reactivos, no nos fué posible desarro llar ningún calor por calentamiento de la solución en NaOH 0.2 N por - solamente 10 minutos. El color desarrollado después de neutralizar la solución con  $\text{HClO}_4$ , fué insuficiente y no fué porporcional a la conce tración de DNA.

Siguiendo la proposición de Burton, añadimos: "ácido porclóri co hasta una concentración de 0.2 N, luego añadimos 1 c.c. de la solu ción DE DNA a 2 c.c. de una solución al 2% de difenilamina y 1.5% áci do sulfúrico en ácido acético glacial, conteniendo 0.08 mgr/ml de ace taldohído. La mezcla fué incubada a 30°C toda la noche y el color azul obtenido fué medido en un espectofotómetro (7)". Según los resultados de Giles y Miles

(7), la adición del ácido sulfúrico es innecesaria, y los resultados mejores son obtenidos usando doble la proporción recomendada por Burton, de la solución prueba de DNA a solución de reactivo. También ellos recomiendan lecturas de la absorción a 595 m $\mu$  y a 700 m $\mu$  con la gráfica de la diferencia de los dos valores (595-700) proporcional a la concentración del DNA.

Craft y Lubran (4), recomiendan una concentración de difenilamina al 2% y un tiempo de desarrollo de 48 horas. Ellos dicen también que se consiguen mejores resultados con la adición de acetaldehído. Schneider (12), también dice que se consiguen los mejores resultados en la ausencia de acetaldehído. Nosotros probamos las tres modificaciones con varios tiempos de desarrollo. Con cada prueba leímos la absorción a 595 m $\mu$  y 700 m $\mu$ . La solución del DNA fué diluída antes del tratamiento en cada caso para determinar si la concentración del DNA es proporcional a la absorbancia.

RESULTADOS: En la figura 1 se ve los resultados de la modificación de Burton a 16, 36 y 66 horas del desarrollo del color, con gráficas de las lecturas a 595 m $\mu$  y la diferencia de las lecturas a 595 m $\mu$  y 700 m $\mu$ .

La figura 2, enseña la modificación de Craft y Lubran y la figura 3, el proceso de Miles y Giles en las mismas condiciones. La figura 4 es la proporción de solución prueba del DNA a solución reactivo



propuesta por Miles y Giles, pero sin acetaldehído.

Como se puede observar en las gráficas, el color es estable después de 36 horas a temperatura ambiente. La diferencia en el tiempo de desarrollo, es probablemente debido a la del acetaldehído en nuestro laboratorio. Según Burton (2), se consiguen mejores resultados solamente con acetaldehído fresco. Los métodos de Burton (fig. 1) y de Croft y Lubran ( fig. 2) dan curvas bien rectas en las concentraciones usadas. La mejor diferenciación (la inclinación de la línea) se consigue del método de Burton. De las dos líneas (absorbancia a 595 y la diferencia de absorbancia de 595 m $\mu$  - absorbancia a 700 m $\mu$ ) dan casi los mismos resultados. Pero la línea de la absorbancia de 595 pasa más cerca de cero absorbancia a cero concentración de DNA y por esta razón escogimos este proceso.

#### RESUMEN DEL PROCESO DE NUESTRA DETERMINACION DEL DNA

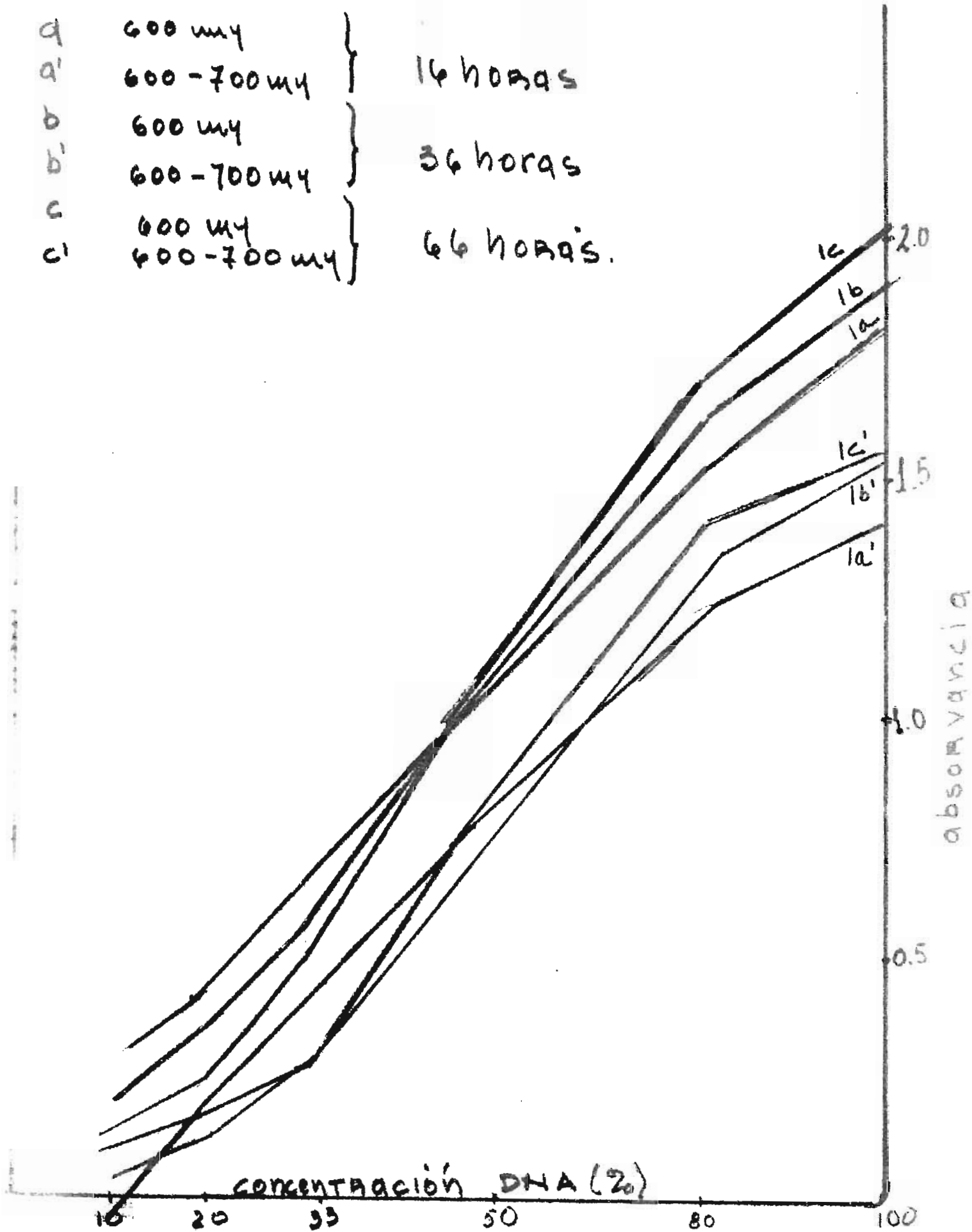
Después del tratamiento con NaOH 1N, por espacio de 1 hora, acidificando la solución hasta ácido perclórico 0.2 N. Diluimos la solución a concentraciones de 10%, 20%, 33%, 50%, 80% y 100% de la concentración original, con un blanco de 0%. Colocamos 3 ml. de cada una de dichas soluciones con 3 ml. de una solución al 2% de difenilamina en ácido acético glacial conteniendo 0.08 mgr/ml. de ace

taldehído. Omitimos el 1.5% de ácido sulfúrico recomendado por Burton, porque la solución estaba acidificada por la adición del ácido perclórico antes. Incubamos la mezcla a temperatura ambiente, por espacio de 36 horas y luego leímos la absorvancia a 595 m~~u~~ en el espectofotómetro.



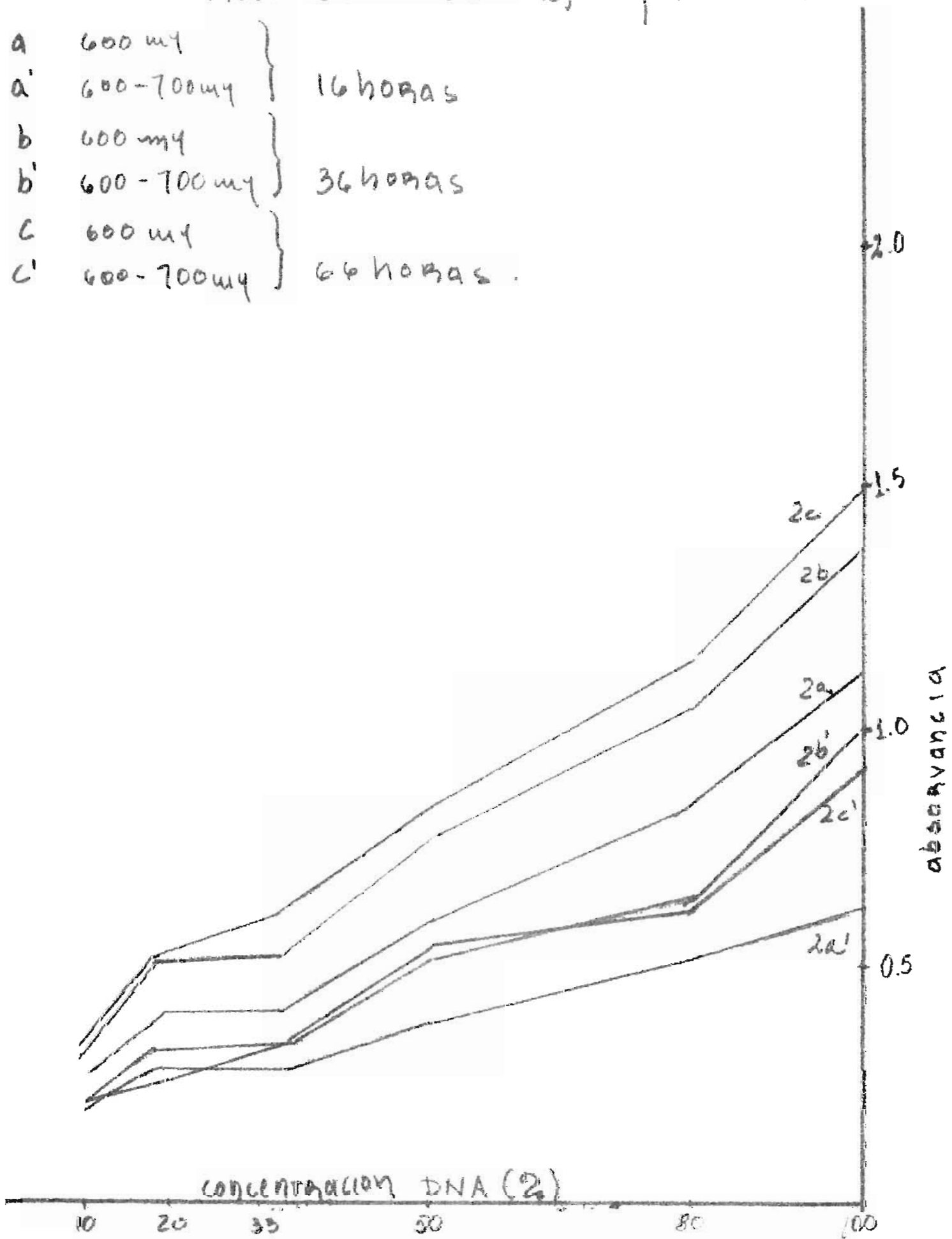
DETERMINACIÓN SEGÚN BURTON

a	600 mμ	}	16 horas
a'	600-700 mμ		
b	600 mμ	}	36 horas
b'	600-700 mμ		
c	600 mμ	}	66 horas
c'	600-700 mμ		



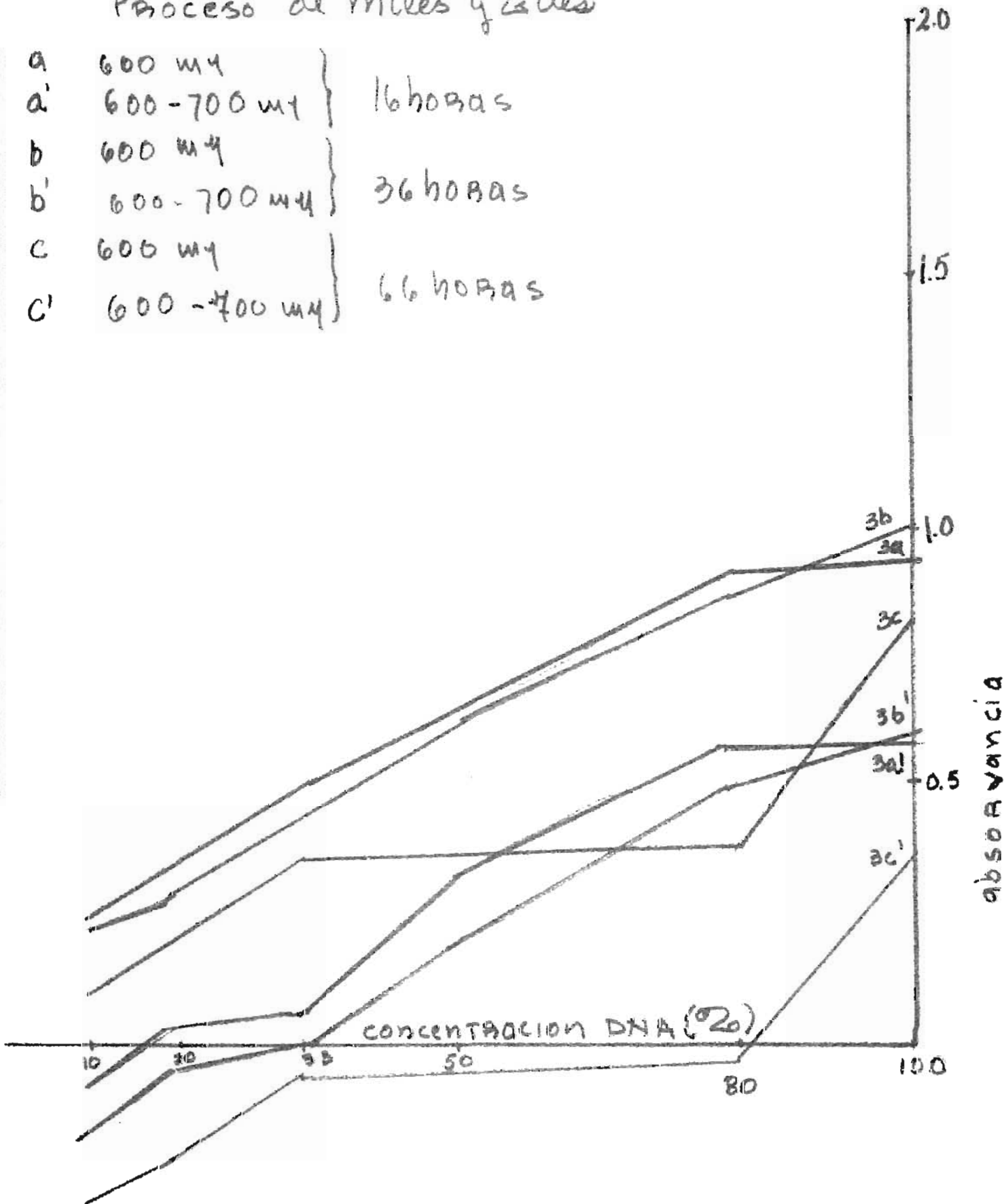
MODIFICACION DE CROFT- y Lubman

- a 600 m $\mu$
  - a' 600-700 m $\mu$
  - b 600 m $\mu$
  - b' 600-700 m $\mu$
  - c 600 m $\mu$
  - c' 600-700 m $\mu$
- } 16 HORAS  
 } 36 HORAS  
 } 66 HORAS.



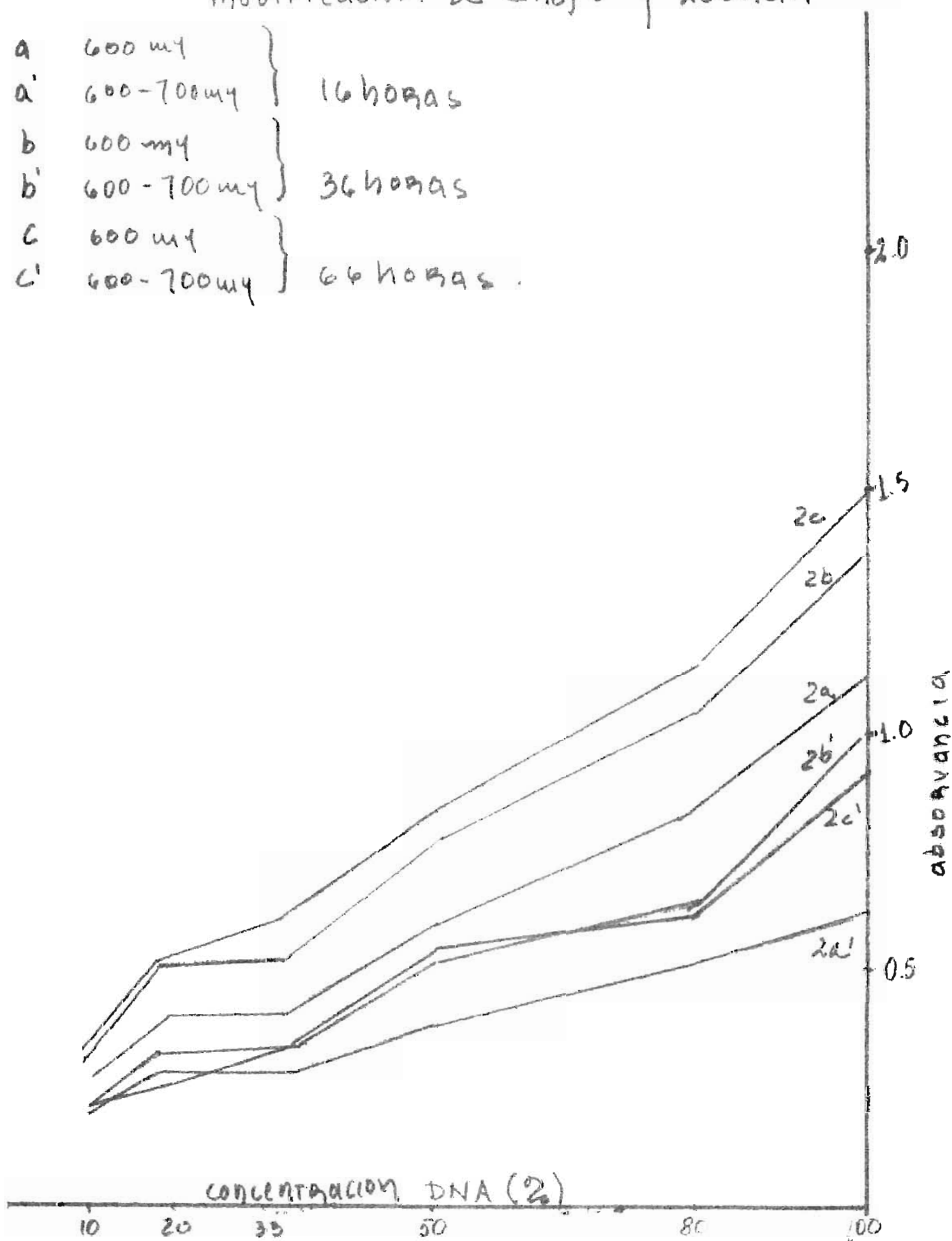
Proceso de miles y Giles

- a 600 m $\mu$
  - a' 600-700 m $\mu$
  - b 600 m $\mu$
  - b' 600-700 m $\mu$
  - c 600 m $\mu$
  - c' 600-700 m $\mu$
- } 16 horas
- } 36 horas
- } 66 horas



125. MODIFICACION DE CROFT- y Lubran

a	600 my	}	16 HORAS
a'	600-700 my		
b	600 my	}	36 HORAS
b'	600-700 my		
c	600 my	}	64 HORAS
c'	600-700 my		



TRATAMIENTO PRELIMINAR DEL TEJIDO

2.- b) TEORIA:

Debido a la presencia corriente de nucleasa en los tejidos, es conveniente tomar precauciones al tiempo de obtener el tejido muestra. Muchos investigadores asumen que es suficiente enfriar la muestra rápidamente. Hasta ahora, es práctica común el homogenizar el tejido brevemente en hielo, o amortiguar y subsecuentemente precipitar las proteínas y ácidos nucleicos con ácido frío, el cual es más probable que causar la inactivación de la nucleasa y a la vez desalojar la grasa interferente.-

Ciertos autores, han enfatizado la necesidad de enfriamiento durante la escisión de los tejidos animales.

La desintegración de la muestra tejido es un paso crítico en la obtención exacta de contenido estimado de ácido nucleico. Para hacerse efectiva debe permitirse la obtención de muestra uniforme y también romper el material suficiente para facilitar la completa extracción de ácidos nucleicos antes estimados.-

En resumen, se deberá hacer en <sup>los</sup> más casos la escisión de tejidos lo más pronto posible, entonces homogenizar en agua fría y finalmente la muestra es homogenizada.-



PRÁCTICA:

Primeramente la muestra fué desalojada de su contenido de grasa superficial, por cortes hechos con un objeto con filo, enseguida la muestra se colocó en contacto con una solución de sal común al 0.5% con el fin de mantener baja la temperatura. Luego homogenizamos la muestra por medio de un osterizer, para separar el material grasoso superficial en reserva, por lo que fué necesario centrifugar la muestra. Habiendo obtenido una muestra homogenizada en alto porcentaje (99%), se procedió a separar el material grasoso de su interior, para ésto se trató la muestra con alcohol de 90º hirviendo.-

Con el fin de lograr u obtener el tiempo en que se debe de mantener la muestra en alcohol hirviendo para determinar mayores cantidades de ácidos nucleico, variamos los tiempos en un rango de 15 minutos a 2 horas. Después de aplicar éstos tiempos obtuvimos los resultados que describiremos a continuación:

RESULTADOS: Como ya hemos dicho, variamos los tiempos de mantenimiento de la muestra en alcohol hirviendo y al analizar los resultados obtenidos, deducimos que el tiempo óptimo deberá de ser de 60 minutos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Al mantener la muestra en alcohol hirviendo durante un tiempo de 15 minutos, se obtuvo una absorvancia de 0.30; enseguida se mantuvo

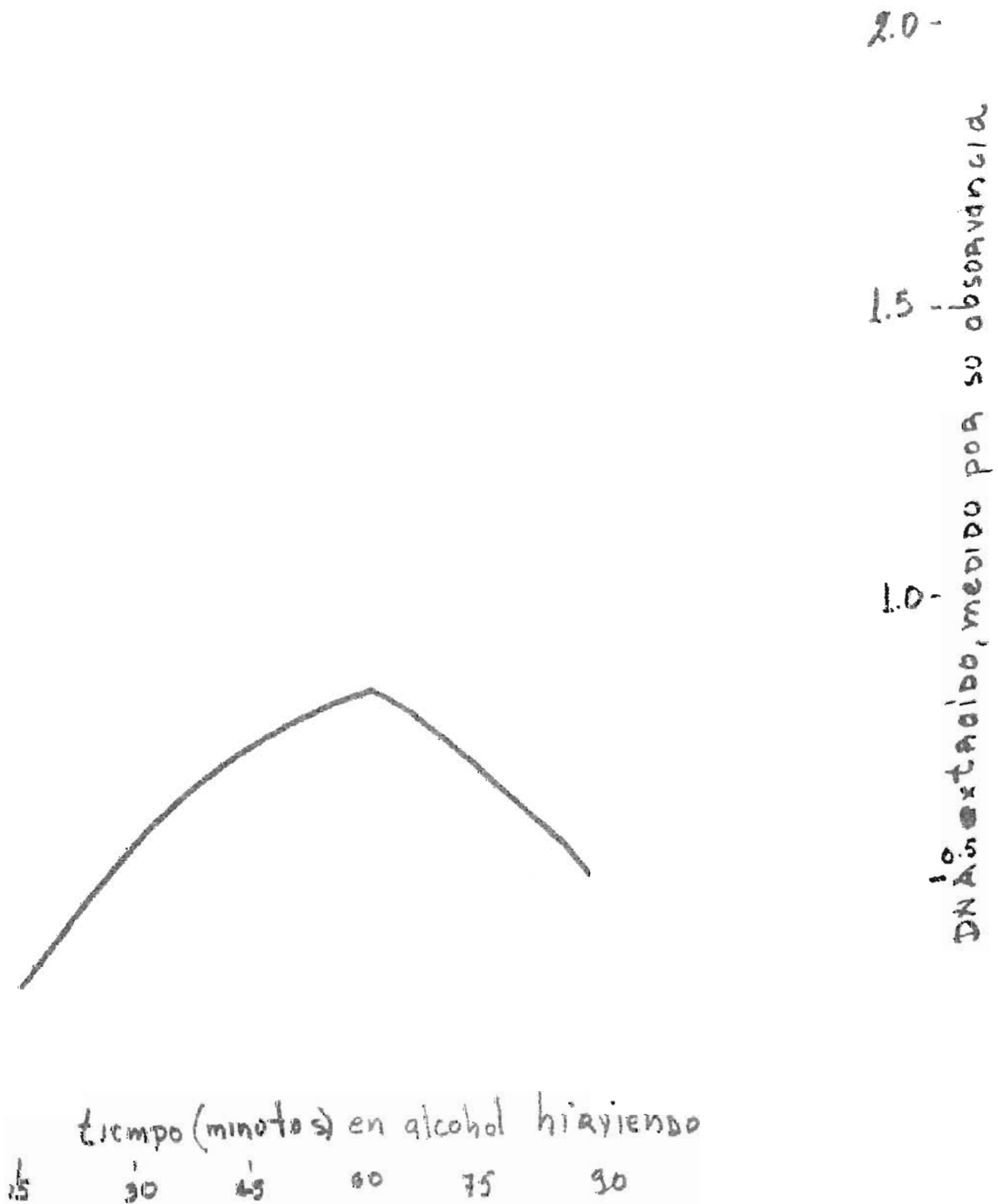
la muestra por un tiempo de 30 minutos con una determinación de 0.60; con un tiempo de 45 minutos obtuvimos una estimación de 0.74; al emplear un tiempo de 60 minutos obtuvimos el tiempo óptimo, ya que se determinó el 0.81. Al emplear tiempos mayores de 60 minutos se determinaron porcentajes menores de 81%, tales como: con 75 minutos, 69%; - con 90 minutos, 48%.

Como podemos observar el tiempo óptimo es de 1 hora, debido a su máxima determinación de DNA.

Hay que hacer notar que la muestra y el alcohol para hacerlos hervir, se mantuvieron en baño de maría.

Lo siguiente gráfica nos demuestra lo dicho anteriormente:

Efecto de la variación del tiempo en alcohol hirviendo en la extracción del DNA.



EXTRACCION DE LIPIDOS EN LOS TEJIDOS.

TEORIA: En los métodos originales de Schmidt-Thannhauser y de Schneider, por análisis del ácido nucleico, las cantidades de ácido nucleico en el tejido fueron finalmente obtenidas o chequeadas por fosfolípidos por medio de solventes lípidos y en consecuencia, la inclusión de un paso de extracción de lípidos ha venido a ser original en estimaciones de ácido nucleico ya sea que aparezca o no para mantener cualquier ventaja especial. La variedad de solventes lípidos usados por diferentes investigadores es muy considerable, después de la precipitación con ácido frío, una secuencia común ha sido el extraer el residuo de tejido con etanol frío al 95% y entonces hervido en una mezcla de 3:1 en etanol y éter. Algunos autores han seguido ésto por extracción con éter y algunas veces con etanol-cloroformo ó metanol-éter.-

En general, dos extracciones con metanol (para remover las lecitinas) y dos con 3:1 etanol-cloroformo ( para remover las cefalinas y esfingomielinas) eliminaremos los fosfolípidos del tejido. Si éste paso es seguido por un lavado con 3:1 etanol-éter, luego con éter, un pulverizado seco puede ser obtenido permitiendo que el éter se evapore a temperatura ambiente.

Munro y Fleck, dicen que este paso, refiriéndose al tratamiento de solventes, que no es siempre necesario y a veces se pierde DNA.-

PRACTICA: Hicimos determinaciones de DNA empleando en una etapa del proceso mezclas del solvente, como los indicados en la teoría.

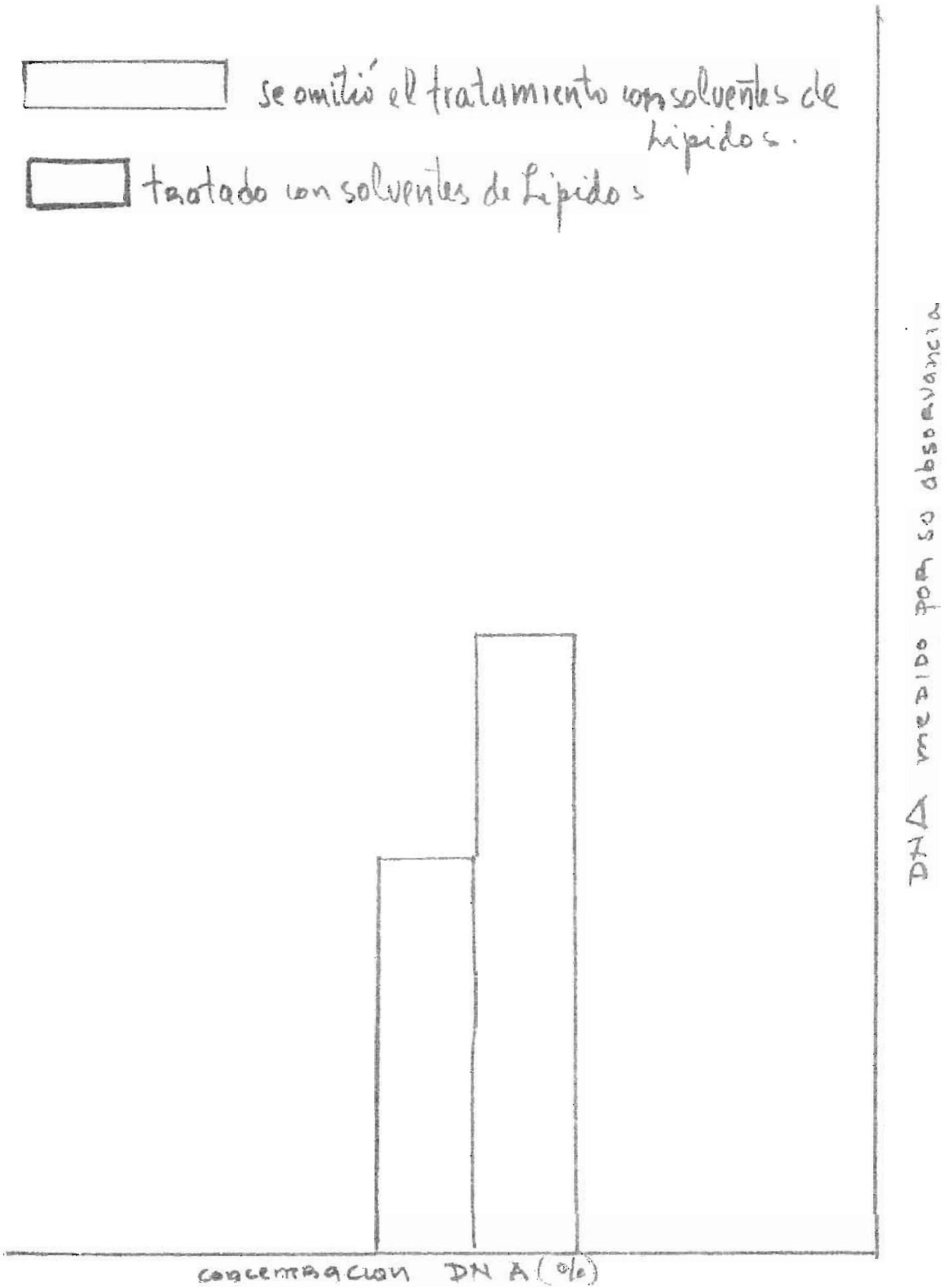
También hicimos determinaciones de DNA, empleando un proceso en el cual se suprimía la etapa de extracción de lípidos con dichos solventes. Al analizar los datos obtenidos nos dimos cuenta que las determinaciones con el segundo proceso fueron mayores que las determinaciones logradas con el primero.

Con esto comprobamos lo dicho por Munro y Fleck quienes demostraron que la extracción de lípidos no era necesaria.

#### RESULTADOS:

Al omitir la extracción de lípidos con los solventes antes mencionados, hubo un aumento del 40%, como es demostrado en la figura siguiente:

□ se omitió el tratamiento con solventes de lípidos.  
□ tratado con solventes de lípidos



REMOCIÓN DE COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR.TEORÍA:

Dependiendo del método escogido para el análisis de ácidos nucleicos, tres grupos de componentes de tejido de bajo peso molecular pueden interferir en las estimaciones finales:

- a) nucleótidos libres y enzimas de nucleótidos
- b) azúcares
- c) fosfato inorgánico y fósforo inorgánico, compuestos de bajo peso molecular.

Por ejemplo, una porción de hígado contiene aproximadamente - 8 mgr. de RNA por gramo de tejido, así falte remover los nucleótidos adenínicos que pueden así mismo causar una sobreestimación de 110% - del contenido en el tejido. En tejidos bajos de RNA (músculos), el error puede dar mayor. Similarmente azúcares libres pueden interfe-- rir con los colores de las reacciones para ribosa y desoxirribosa. - Es un peligro particular para analistas estudiantes en tejidos de - plantas, pero en resumen el uso común de homogenizar el tejido animal en soluciones de sucrosa, puede guiar algunas veces a subsecuentes di- ficultades en la determinación de RNA por el método de Orcicol para ribosa a menos que la sucrosa sea cuidadosamente removida. Finalmente la remoción de compuestos de fosforos de bajo peso molecular, es esen- cial para el acertado uso del método de Schmidt-Thannhauser, el prime

ro descrito en el cual los ácidos nucleicos son estimados por medio del contenido de fósforos, entonces el proceso original no es muy usado ahora muy a menudo, esto tiene resultado de poca importancia.

Los métodos usados en la remoción de éstas sustancias interferentes es precipitación de estos ácidos nucleicos, proteínas y otras moléculas largas con ácido frío, usualmente TCA o ácido perclórico.

#### PRACTICA EMPLEADA:

Con respecto a la extracción de moléculas pequeñas tratando de modificar el método de Schmidt-Thannhauser, hemos removido todos esos compuestos de bajo peso molecular con ácido tricloroacético, variando ya sea su concentración o el número de remociones o extracciones logradas con dicho ácido.

La temperatura bajo la cual se efectuaron dichas remociones fué dentro de un rango mínimo de 0°C a 2°C.

Con respecto a las concentraciones usadas estas fueron las siguientes: 5%; 7%; 10%; 12%; ahora con respecto al número de lavados, éstos se variaron en un rango de 1 lavado a 8 lavados.

Después de estudiar los resultados llegamos a un acuerdo de que el porcentaje de ácido a ocupar debía de ser de 10% y 12%, y en lo que concierne al número de remociones, éstas debían de ser en un número de tres o cuatro.



RESULTADOS:

Con respecto a la extracción de moléculas pequeñas tratando de modificar el método de Schmidt-Thannhauser, hemos hecho determinaciones de DNA, ya sea variando la concentración del TCA o el número de lavados hechos con dicho ácido.

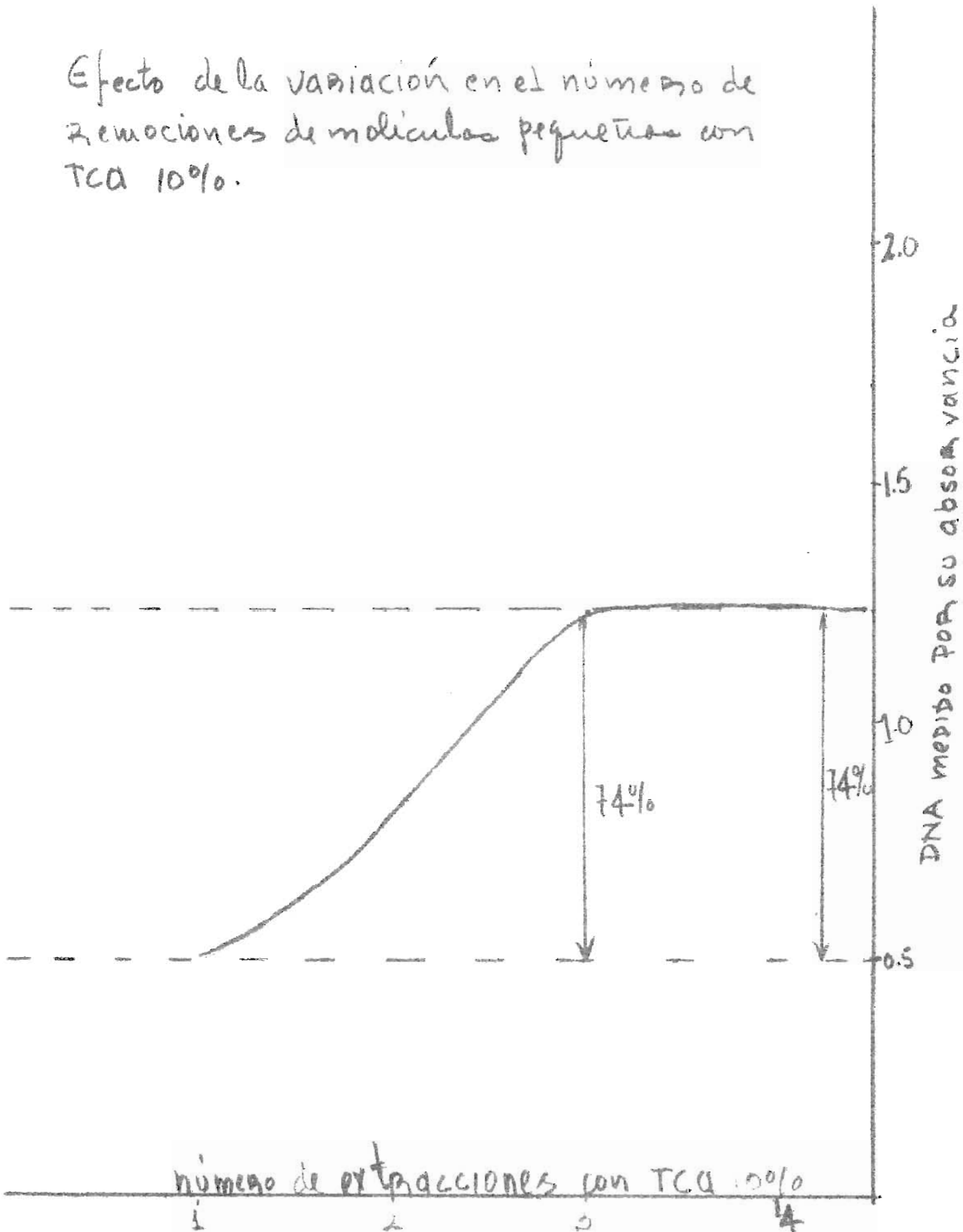
Al variar la concentración del ácido, se obtuvieron los siguientes resultados: con TCA 5% la absorvancia es de 0.68; pero con TCA 7%; se obtuvo un aumento del 9%. Luego removimos las moléculas pequeñas usando una concentración del ácido de 10% y 12%, entonces hubo un aumento del 48%, es decir, que con respecto a la determinación con TCA 5% obtuvimos un aumento del 57%. Al hacer determinaciones con porcentaje de TCA mayores de 10% y 12% hubo la misma concentración de DNA, la cual nos viene a comprobar la demostración por Schmidt-Thannhauser, de que un porcentaje de 10 y 12, deben de ser los porcentajes óptimos. Se observan estos resultados en la figura

Hay que notar, que al llevar a cabo las remociones con los diferentes porcentajes de TCA, las remociones fueron hechas en un número de 3, con un tiempo de duración de 15 minutos cada una.

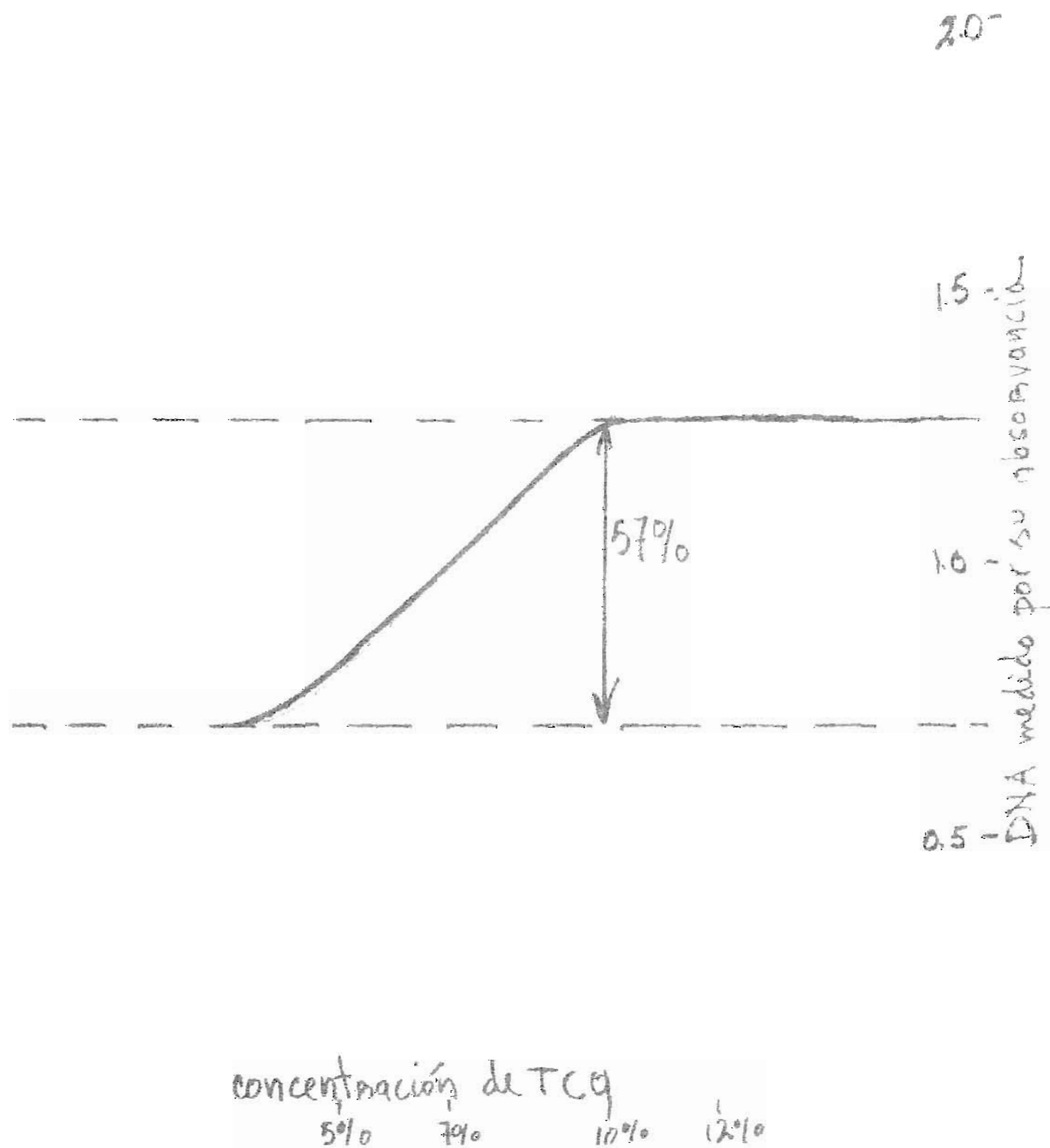
Este número de 3 remociones, se dedujo luego de hacer varios ensayos con diferentes números de remociones. Con 1 remoción se obtuvo una absorvancia de 0.51; luego removimos dos veces y la absorvan--

cia determinada fué de 0.78. Con tres y cuatro remociones hubo una -  
determinación de 1.25 con lo cual nosotros deducimos que era el número  
de remociones óptimas.-

Efecto de la variación en el número de  
 remociones de moléculas pequeñas con  
 TCA 10%.



Efecto de la variación de la concentración de TCA, en la extracción de DNA.



HIDROLISIS EN HIDROXIDO DE SODIO.

TEORIA: La función del hidróxido de sodio es en sí, separar - ambos ácidos nucleicos mediante el mecanismo de diferencia en resisten - cia al álcali. Es por el comportamiento diferente hacia el álcali de los eslabones 3,5' fosfodiéster, entre los nucleótidosadyacentes en - tre el RNA y DNA. En el caso del RNA expuesto al álcali encíclico, - triéster es formado con el grupo hidroxilo en el C<sub>2</sub>' de la ribosa y - este espontáneamente hidroliza a dar dos o tres nucleótidos. En el ca - so del DNA dualipentosa, no contiene el grupo hidroxilo en C<sub>2</sub>' y a - consecuencia no puede formar la esencial 2,3' fosfodiéster luego, en - tonces es resistente a la digestión alcalina.

Aunque varios alcalís han sido empleados en ésta hidrólisis, - solo el hidróxido de sodio y el hidróxido de potasio han sido los mas utilizados.

PRACTICA:

Entre los procedimientos que hemos llevado a cabo con el fin - de lograr el tiempo necesario en el cual se debe mantener la muestra - en contacto con el álcali, hemos determinado que el tiempo de diges - tióndebérá de ser de tres horas y media y a una temperatura similar - a la del ambiente.

RESULTADOS:

En lo que concierne a hidrólisis alcalina, hicimos varios ensayos con el fin de lograr el tiempo necesario en el cual se debía de mantener la muestra en contacto con el álcali, para así separar ambos ácidos nucleicos.

ESTIMACION-SEPARACION DE DNA:

Después de hacer los ensayos ante dichos, obtuvimos los resultados siguientes:

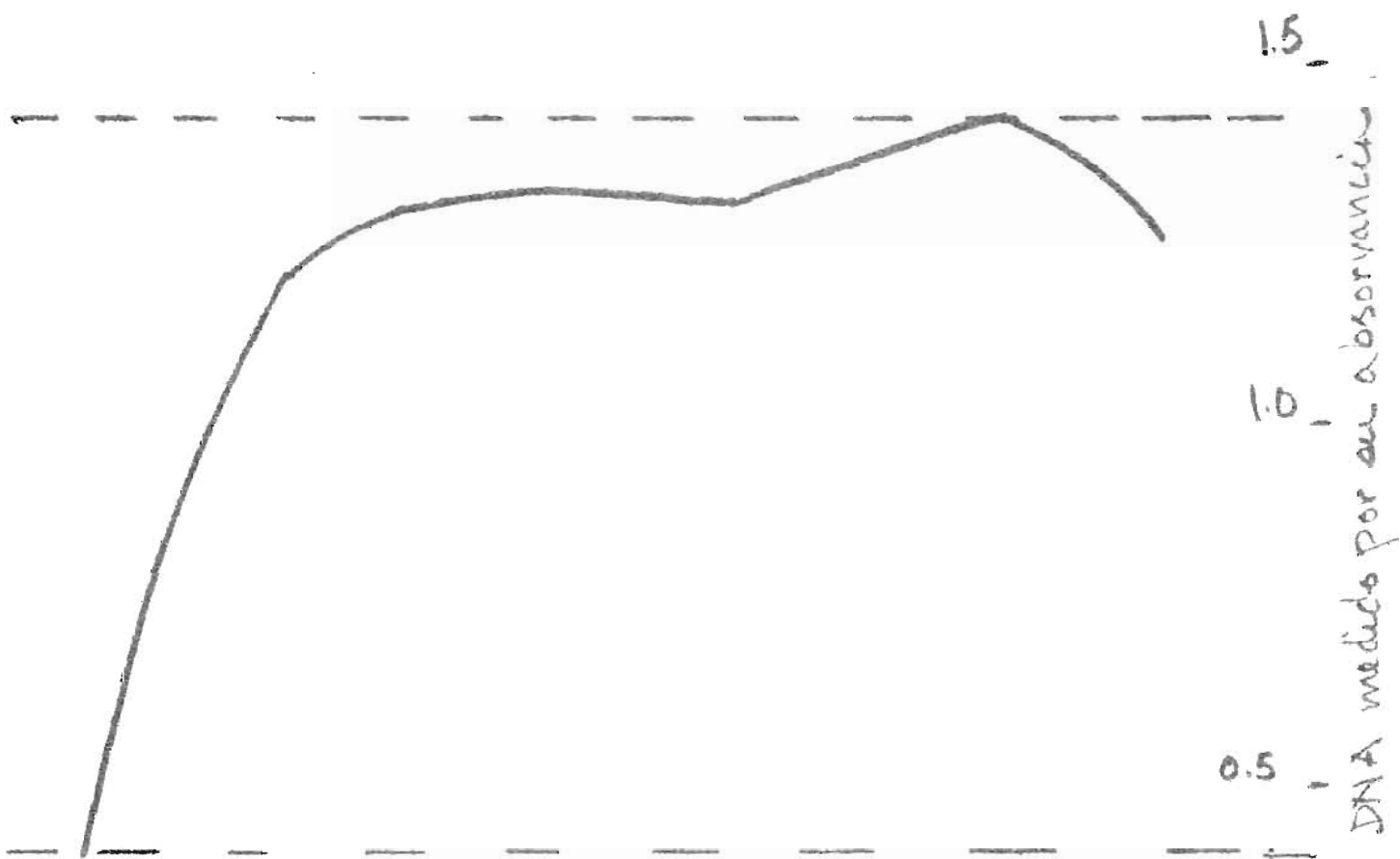
TIEMPO DE HIDROLISIS (minutos)      DETERMINACION DE DNA POR ABSORVANCIA:

15.....	0.53
30.....	0.61
45.....	0.70
60.....	1.25
150.....	1.28
180.....	1.36
210.....	1.40

Al aplicar un tiempo de 240 minutos (4 horas), disminuyó el porcentaje de DETERMINACION de DNA considerablemente, debido al tratamiento vigoroso.-

Efecto del tiempo de hidrólisis alcalina, en la determinación de DNA

2.0



3.-

C O N C L U S I O N E S .



La conclusión de éste trabajo consistirá en enumerar el aumento en cada etapa del proceso y según las variaciones hechas, y las condiciones óptimas escogidas para el proceso final en cada paso del proceso.

Con respecto al proceso de nuestra determinación del DNA hemos concluido que deberá ser el siguiente:

Después del tratamiento con NaOH 1N, por espacio de 1 hora, acidificamos la solución hasta ácido perclórico 0.2 N. Diluimos la solución a concentraciones de 10%, 20%, 33%, 50%, 80% y 100% de la concentración original, con un blanco de 0%. Colocamos 3 ml. de cada una de dichas soluciones con 3 ml. de una solución al 2% de difenilamina en ácido acético glacial conteniendo 0.08 % mgr/ml. de acetaldehído. Incubamos la mezcla a temperatura ambiente, por espacio de 36 horas y luego leímos la absorbancia a 595 m en el espectofotómetro.

En cuanto al aumento logrado al hacer una variación de tiempo en el tratamiento inicial con alcohol de 90° hirviendo fué de un pequeño porcentaje, pero en fin se logró el aumento que se esperaba. El resultado fué de que la muestra debía de mantener en alcohol de 90° hirviendo por espacio de 1 hora. Hay que hacer notar, que el alcohol se hacía hervir por medio de baño maría.-

Con respecto a la extracción de moléculas pequeñas, hicimos va rios procesos variando la concentración del extractor, en éste caso - TCA, y también variando el número de remociones. La concentración del TCA fué variada en un rango de 5% a 15%: 5%, 7%, 10%, 12%, - 15%.-

Con TCA	5%	el DNA	extraído	dió una absorvancia de	0.68
Con TCA	7%	el DNA	extraído	dió una absorvancia de	0.77
Con TCA	10%	el DNA	extraído	dió una absorvancia de	1.30
Con TCA	12%	el DNA	extraído	dió una absorvancia de	1.30
Con TCA	15%	el DNA	extraído	dió una absorvancia de	1.20

Como podemos observar, con TCA 10% y TCA 12%, hubo una mayor determinación; con TCA 15% una disminución del 10% que fué estimada - debido al tratamiento vigoroso aplicado.

Este ensayo fué llevado a cabo a una temperatura de 0°C a 2°C. Las remociones fueron llevadas, en un número de tres, por - espacio de 15 minutos cada una.

Con respecto al número de remociones, hicimos varios ensayos empleando en éste caso TCA 10% por espacio de 15 minutos cada una de ellas, a una temperatura de 0°C a 2°C.

Con 1 remoción se determinó una absorvancia de 0.52

Con 2 remociones se determinó una absorvancia de 0.78

Con 3 remociones se determinó una absorvancia de 1.25

Con 4 remociones se determinó una absorvancia de 1.25

Con 5 remociones se determinó una absorvancia de 0.64

Con 6 remociones se determinó una absorvancia de 0.64

Con 7 remociones se determinó una absorvancia de 0.64

Con 5, 6, 7, remociones hubo una disminución en la determinación, - debido al tratamiento vigoroso.

Nos toca ahora hablar de la Hidrólisis alcalina.

Llevamos a cabo un ensayo con el fin de determinar el tiempo necesario en el cual se debía de mantener en el álcali para determinar mayores cantidades de DNA. El álcali empleado fué NaOH ; 1N.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

<u>TIEMPO: (minutos)</u>	<u>ABSORVANCIA DE LA SOLUCION DE DNA</u>
15.....	0.53
30.....	0.61
60.....	1.25
150.....	1.28
180.....	1.35
210.....	1.40
240.....	1.20

Podemos concluir que en un tiempo de 3 horas y media - -


(210 minutos) podemos determinar mayores cantidades de DNA.-

De los varios experimentos, escogimos las condiciones óptimas en cada paso para seleccionar un proceso final.-

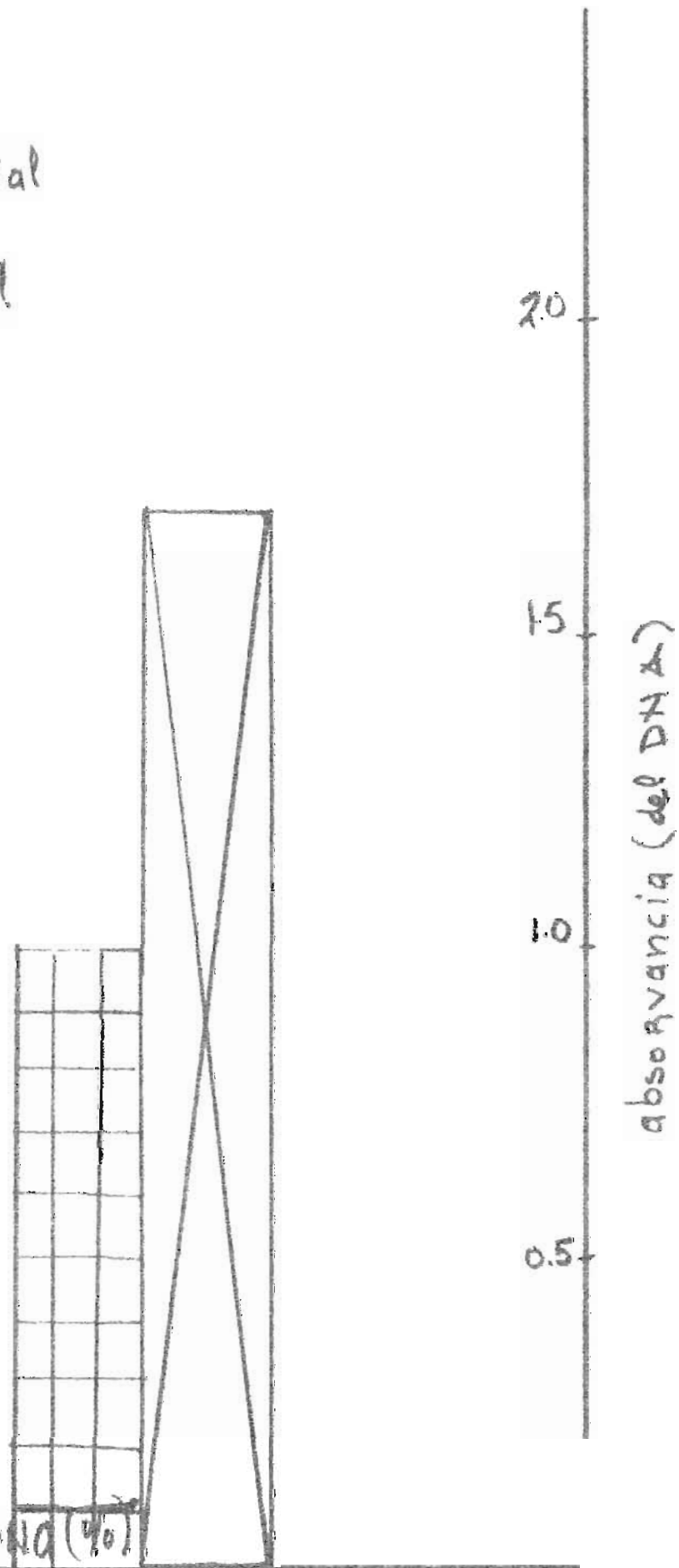
COMPARACION DEL PROCESO INICIAL CON EL PROCESO FINAL:

	<u>PROC. INICIAL</u>	<u>PROC. FINAL</u>
<u>TRATAMIENTO PRELIMINAR</u>	30 minutos en alcohol hirviendo.	60 minutos en alcohol hirviendo.
<u>EXTRACCION DE MOLECULAS PEQUEÑAS:</u>	TCA 10% a 0°C-2°C 3 veces por 15 minutos cada vez.	TCA 10% a 0°C-2°C 3 veces por 15 minutos cada vez.
<u>EXTRACCION DE LIPIDOS:</u>	Cl <sub>3</sub> CH-alcohol (1:3) éter-alcohol (1:3) a la temperatura ambiente; 3 extracciones con cada mezcla, por espacio de 15 minutos cada una.	se omitió.
<u>HIDROLISIS ALCALINA:</u>	1 hora en NaOH: 1N	3,1/2 hora en NaOH: 1N.

Se observa la comparación del proceso inicial y del proceso final en la figura. El proceso desarrollado por nosotros da un aumento del 50%, más del proceso de Munro y Fleck.-

 Proceso inicial

 Proceso final



## B I B L I O G R A F I A

- (1) DORES, ERNEST "LA CELULA CLAVE DE LA VIDA"  
(1966)
- (2) BURTON, K "A STUDY OF THE CONDITIONS AND  
MECHANISM OF THE DIPHENYLAMINE REACTION  
FOR THE CALORIMETRIC ESTIMATIONS OF DNA"  
BIOCHEMICAL JOURNAL 62,315 (1956).
- (3) BURTON, "A STUDY OF THE CONDITIONS AND MECHA-  
NISM OF THE DIPHENYLAMINE REACTIONS FOR THE  
CALORIMETRIC ESTIMATION OF DESOXYRIBONUCLEIC  
ACID"  
BIOCHEMICAL JOURNAL 62,315 (1950).
- (4) CERIOTTI, G. J. BIOL. CHEM. 214,59 (1955).
- (5) CROFT, D.N. y LUBRAN N. "THE ESTINATION OF  
DESOXYRIBONUCLEIC ACID IN THE PRESENCIE OF  
SALIC ACID"  
BIOCHEMICAL JOURNAL 95,62
- (6) DISCHE, Z "COLOR REACTIONS OF NUCLEIC ACID  
COMPONENTS" IN E CHARGAFF AND J. N. DAVIDSON  
Eds., THE NUCLEICS, Vol. 1 ACADEMIC PRESS  
NEW YORK 1955, pc 680.

- (7) GILES K. W. Y MYERS A. "AN IMPROVED DIPCHE-  
NYLANINE METHOD FOR THE ESTIMATION OF DESO-  
XYRIBONUCLEIC ACID"  
NATURE 206,93
- (8) HUTCHISON, W. C. AND MUNRO H. N. "ANALYST"  
86,768 (1961); 87,303 (1962)
- (9) MUNRO Y FLECK, "DETERMINATION OF NUCLEIC  
ACID METHODS OF BIOCHEMICAL ANALYSIS".  
Pag. 146
- (10) OGUR M. AND G. ROSEN, ARCH BIOCHEM, 25,262  
(1950)
- (11) SCHNEIDER, W.C.J. BIOL. CHEM. 161,293 (1945)
- (12) SCHNEIDER, W.C. "DETERMINATION OF NUCLEIC ACIDS
- (13) SCHMIDT BAND S.J. Y THANNHAUSER J. BIOL. CHEM  
161,83 (1945) 23 (1955)
- (14) WILLIAM HAYES, "THE GENETICS OF BACTERIA AND  
THEIR VIRUSES THEIR PRINTING" pag, 221, (1965).
- (15) VILLEE, CLAUDE A, BIOLOGIA (1966).-