

CONCLUSIONES

El origen de este trabajo ha sido el de interpretar las medidas de birrefringencia eléctrica de soluciones acuosas de ADN sonicado en presencia de concentraciones débiles de NaCl (1mM)⁽⁶⁾. Las mismas muestran la aparición de una birrefringencia anómala positiva que desaparece con el aumento de la concentración de electrolito. Además los transitorios de birrefringencia eléctrica después de suprimir o invertir el campo eléctrico presentan una mezcla de componentes de birrefringencia eléctrica negativa (normal) y positiva (anormal) no explicado por la teoría de la birrefringencia eléctrica de soluciones macromoleculares diluidas.

La extensión realizada en este trabajo de la teoría del decaimiento de la birrefringencia eléctrica para soluciones diluidas de RIDGEWAY ⁽¹⁵⁾ empleando el modelo molecular de HOLCOMB y TINOCO ⁽⁸⁾ (sección I.6.1) permite concluir que los transitorios anormales de la birrefringencia eléctrica pueden explicarse eligiendo adecuadamente los parámetros eléctricos (polarizabilidad eléctrica y momento eléctrico permanente), óptico (polarizabilidad óptica) e hidrodinámicos (coeficientes de fricción rotacional). Sin embargo ciertos resultados experimentales indican que los macroiones de ADN sonicado en soluciones con concentraciones mayores de 5 mg/dl y concentraciones salinas débiles (<1mM en NaCl) son partículas interactuantes. Estas experiencias son:

-La dependencia de la magnitud de la componente positiva de la birrefringencia eléctrica con la concentración de ADN en las soluciones (sección XII.2).

-La turbiedad apreciable de las soluciones de ADN sonicado que dan una absorbancia de 0,1 (longitud de onda 550 nm y trayecto óptico de 1cm) para concentraciones de 100 mg/dl en ADN con NaCl 1mM que desaparece completamente con el aumento de la fuerza iónica del medio. Por ejemplo la adición de MgCl₂ 1mM elimina la turbiedad (XII.11) y paralelamente la componente positiva de la birrefringencia eléctrica (sección XII.3).

Estas experiencias inducen a postular la existencia de agregados en las soluciones de ADN sonicado para explicar el comportamiento anómalo de la birrefringencia eléctrica (ϵ).

El análisis de la energía de interacción entre macroiones tipo varilla realizado en la sección XIII.3 nos mostró que para concentraciones salinas débiles (NaCl 1 mM) las curvas de energía en función de la distancia $W(X)$ presentan mínimos del orden de algunas unidades de KT . Este nos permite decir que desde el punto de vista teórico están establecidas las condiciones para que se formen agregados de macroiones de ADN sonicado. Hay que destacar aquí la importancia de reconocer la influencia de la frecuencia de fluctuación de las cargas de los macroiones en el apantallamiento de la energía de interacción entre ellas. El apantallamiento de la energía de interacción (repulsión) entre las cargas estacionarias se tiene en cuenta mediante el típico factor exponencial de Debye-Huckel mientras que el apantallamiento de la energía de interacción originada en la correlación de cargas fluctuantes depende de la frecuencia de oscilación de estas y la concentración iónica del medio. Para fluctuaciones con frecuencias mucho mayores que un cierto valor crítico dependiente de la concentración del electrolito presente el medio se comporta como un dieléctrico puro con el consecuente apantallamiento débil de la energía (ϵ_{∞}).

Del cálculo de la energía de interacción entre macroiones (sección XIII.3) surge que el aumento de concentración del electrolito del medio disminuye drásticamente las energías de interacción entre los macroiones y consecuentemente la posibilidad de formación de agregados. Paralelamente el aumento de la fuerza iónica del medio hace desaparecer la birrefringencia positiva de las soluciones de ADN, por ejemplo cuando se le agrega $MgCl_2$ (sección XII.3).

Refiriendonos todavía al cálculo desarrollado en la sección XIII.3, vemos que la fuerza atractiva entre los macroiones tiene su origen en la correlación de fluctuaciones de la carga ligada (contraiones condensados) en ellos y crece con el aumento de la misma. Este hecho es

corroborado por la aparición del efecto anómalo en la birrefringencia eléctrica de la DNH (desoxirribonucleoproteína) cuando al extraerle progresivamente las histonas, se logran razones en peso Proteína/ADN menores que 1. Este proceso de desproteínización de la DNH va liberando grupos fosfatos cargados del ADN y aumentando la cantidad de contraiones condensados (secciones XII.4 y III.4).

Las experiencias de birrefringencia eléctrica de soluciones de ADN sonificado previamente filtradas en columna con gel (XII.5) muestran la ausencia de componente positiva de la birrefringencia eléctrica. Las soluciones de ADN sonificado obtenidas de ADN nativo previamente filtrado en columna con gel tampoco presentan componente positiva de la birrefringencia eléctrica (sección XII.6). Estos resultados podrían explicarse como sigue:

- a) El ADN utilizado experimentalmente por nosotros (y otros) tiene un cierto porcentaje de proteínas (0,5 a 5 % según las muestras). Los resultados experimentales del comportamiento electro-óptico han sido obtenidos con ese material, por lo tanto las conclusiones sobre la posibilidad de la existencia de los agregados basadas en esos datos corresponde exclusivamente a material ligeramente contaminado. La purificación con gel eliminaría las fracciones contaminadas. Esta contaminación debería ser tal que afecte los perfiles de potencial eléctrico donde se condensan los contraiones.
- b) Aún después de cromatografiado cabe la posibilidad de existencia de pequeñas fracciones proteicas intimamente unidas al ADN, por ejemplo en la garganta menor, que no sería excluida en la cromatografía de relativa baja resolución. La posterior adición de NaCl 2 M podría liberar o exponer mas a la superficie estas fracciones protéicas, modificando las propiedades superficiales desde el punto de vista de la superficie eléctrica y permitiendo el reestablecimiento del efecto anómalo (sección XII.5). Obviamente debido a la purificación efectuada este efecto remanente debe ser considerablemente menor que el original.

La posibilidad de existencia de agregados se demuestra

mediante el ajuste de las curvas experimentales de la birrefringencia eléctrica estacionaria ($\Delta n = f(E^2)$) y dinámica ($\Delta n = f(t)$ para $E = \text{cte.}$) con las curvas teóricas. Estas últimas se obtienen considerando una mezcla de macroiones de ADN libres (sin agregar) y distintos tipos de agregados. Cada agregado está formado por un número m de macroiones tipo varilla de ADN de longitud L_a dispuestos en forma paralela. Se determinan experimentalmente las propiedades hidrodinámicas, eléctricas, y ópticas de los macroiones de ADN sonificado (secciones XIII.2) y se calculan las correspondientes a los agregados (secciones XIII.4)

El mejor ajuste se logra mediante el método de ensayo y error variando la longitud del agregado y la concentración en la mezcla de los distintos tipos de agregados. Los tipos de agregados seleccionados son los formados con $m=9, 16$ y 25 macroiones. La longitud de agregado que dió mejores resultados es $L_a = 600 \text{ \AA}$

Las características medias de los macroiones libres de ADN sonificado son las siguientes:

- longitud $L = 1130 \text{ \AA}$
- anisotropía de la polarizabilidad óptica:
 - (experimental) $(\alpha^o_{33} - \alpha^o_{11}) = -4,15 \times 10^{-21} \text{ cm}^3$
- términos del tensor polarizabilidad óptica:
 - (experimentales) $\alpha^o_{11} = 2,28 \times 10^{-20} \text{ cm}^3$
 - $\alpha^o_{33} = 1,87 \times 10^{-20} \text{ cm}^3$
- anisotropía de la polarizabilidad eléctrica:
 - (experimental) $(\alpha^E_{33} - \alpha^E_{11}) = 1,46 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$
 - (calculada) $(\alpha^E_{33} - \alpha^E_{11}) = 1,36 \times 10^{-15} \text{ cm}^3$

Las características calculadas de los agregados son las siguientes:

- longitud $L_a = 600 \text{ \AA}$
- radio del agregado correspondientes a una concentración de macroiones en el mismo de 535 mg/dl :

número de macroiones del agregado:	radio del agregado supuesto cilindrico A_a (Å)
m	
9	400
16	533
25	667

-anisotropía de la polarizabilidad eléctrica:

número de macroiones del agregado: m	$\Delta\alpha_{a^E} = (\alpha_{a^E})_{zz} - (\alpha_{a^E})_{xx}$
9	$-1,48 \times 10^{-14}$
16	$-4,52 \times 10^{-14}$
25	$-1,04 \times 10^{-13}$

-tiempo de relajación del momento inducido transversal al eje del agregado originado por la transferencia de contraiones entre los macroiones del agregado:

m	t_a (µs)
9	306
16	544
25	850

-anisotropía de la polarizabilidad óptica:

número de macroiones del agregado: m	$\Delta\alpha_{a^o} = (\alpha_{a^o})_{zz} - (\alpha_{a^o})_{xx}$
9	$-1,98 \times 10^{-20}$
16	$-3,52 \times 10^{-20}$
25	$-5,50 \times 10^{-20}$

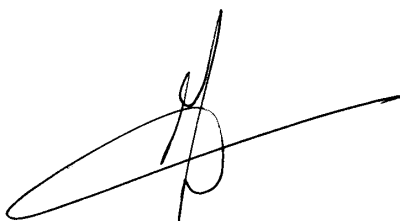
Se concluye que el mejor ajuste entre las curvas experimentales y las calculadas de $\Delta n = f(E^2)$ se logran para las siguientes concentraciones de macroiones de ADN y agregados (sección XIII.5):

$$\begin{aligned}
 c_{ADN} &= 1,08 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3} \\
 c_{m=9} &= 2,8 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3} \\
 c_{m=16} &= 2,4 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3} \\
 c_{m=25} &= 1,1 \times 10^{12} \text{ cm}^{-3}
 \end{aligned}$$

Con estas características de macroiones de ADN y agregados de los mismos se explican también los resultados

experimentales de la birrefringencia dinámica: El transitorio de la birrefringencia eléctrica después de invertir el campo eléctrico (sección XIII.6) y el decaimiento de la birrefringencia eléctrica (sección XIII.7).

La existencia de agregados resulta ser la explicación más plausible de la birrefringencia eléctrica positiva en soluciones de ADN sonificado ya que, a pesar de las consideraciones cualitativas necesarias para interpretar los efectos de la cromatografía sobre gel, este modelo resulta hasta el momento la única propuesta que de cuenta de los resultados experimentales disponibles.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop with a vertical line through it and a horizontal line extending to the right.

J. BERTOLOTTO