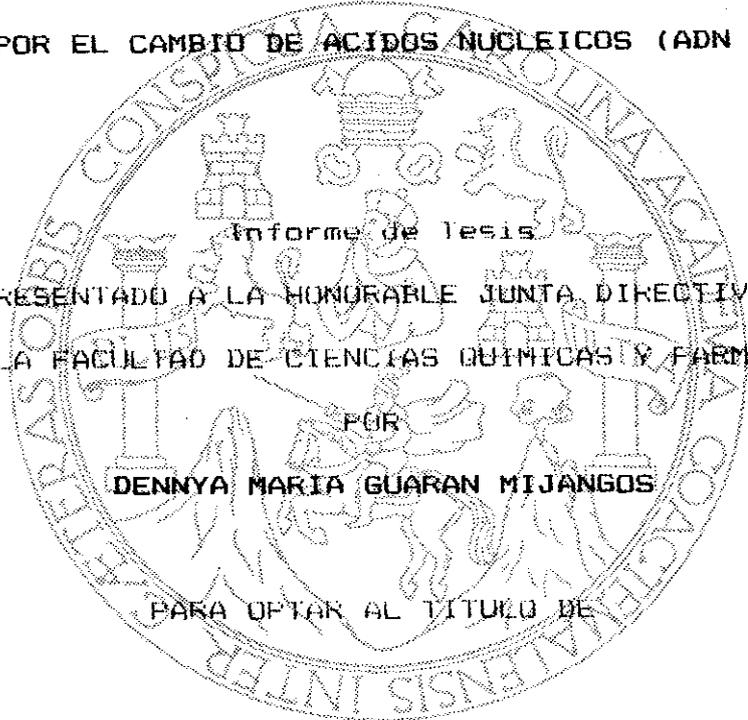


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

LA ACTIVIDAD LACTOGENICA DEL IXBUT (Euphorbia lancifolia)  
Y SU POSIBLE EFECTO A NIVEL DE SINTESIS PROTEICA  
MEDIDA POR EL CAMBIO DE ACIDOS NUCLEICOS (ADN y ARNm)



Informe de tesis  
PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
POR  
DENNYA MARIA GUARAN MIJANGOS  
PARA OPTAR AL TITULO DE  
QUIMICO BIOLOGO

Guatemala. septiembre 1994

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

Dv  
2  
(1633)

JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
DE LA  
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

- DECANO: Lic. Jorge Rodolfo Pérez Folgar
- SECRETARIA: Licda. Eleonora Gaitan Izaquirre
- VOCAL PRIMERO: Lic. Miguel Angel Herrera Gálvez
- VOCAL SEGUNDO: Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán
- VOCAL TERCERO: Lic. Miguel Orlando Garza Sagastume
- VOCAL CUARTO: Br. Jorge Luis Galindo Arevalo
- VOCAL QUINTO: Br. Edgar Antonio Garcia del Pozo

ACTO QUE DEDICO:

A JEHOVA DIOS

A MIS PADRES: María Milandos.

Eduardo Chigüichón.

A MIS HERMANOS: Héctor. Miriam y Luis Eduardo.

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS QUE HICIERON POSIBLE LA  
REALIZACION DE ESTE TRABAJO: ESPECIALMENTE A LA  
SRA. NITIDA ALDECOA.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Nutricion de Centro América y Panamá (INCAP) por su valioso aporte para la realización de este trabajo.

A los Dres. Juan de Dios Calle y Miquel Angel Ortiz, asesores de este trabajo de tesis, por su colaboración y orientación.

## INDICE

	página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ANTECEDENTES	5
IV. JUSTIFICACIONES	19
V. OBJETIVOS	20
VI. HIPOTESIS	21
VII. MATERIALES Y METODOS	22
VIII. RESULTADOS	33
IX. DISCUSION DE RESULTADOS	34
X. CONCLUSIONES	36
XI. RECOMENDACIONES	37
XII. REFERENCIAS	38
XIII. ANEXOS	41

## I. RESUMEN

El Ixbut es una de las plantas de uso popular más extenso, debido a que se le atribuyen propiedades galactogénicas. Por este motivo el presente estudio fue realizado para tratar de validar científicamente las propiedades de la planta.

Para medir el efecto producido por el Ixbut, se realizó el estudio en un modelo animal empleando glándulas mamarias de ratas tipo Wistar, en periodo de lactancia, las ratas fueron distribuidas en 4 grupos de 6 cada uno; a cada grupo se le administró un tratamiento diferente, el cual fue iniciado desde el primer día después del parto. Los tratamientos fueron administrados disueltos en el agua de bebida de la siguiente forma: Grupo A Agua, Grupo B Metoclopramida, Grupo C Ixbut más azúcar y Grupo D Azúcar; el azúcar fue agregado al Ixbut para eliminar el sabor amargo que es desagradable para las ratas, por este motivo se evaluó un grupo solo con azúcar para observar un posible efecto por este ingrediente agregado.

Con el fin de determinar un posible efecto hiperplásico o hipertrófico y su diferenciación, se trató de medir los cambios producidos por la planta a nivel de glándula mamaria de la rata por medio de la determinación de la concentración de ácidos nucleicos, específicamente ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque también se trató de medir

el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) no siendo posible esta última medición debido a las condiciones de extracción, ya que el ARNm fue destruido durante el proceso; luego para la medición del ADN se utilizó una reacción colorimétrica por medio del método de difenilamina.

Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos no hubo ninguna diferencia entre los tratamientos. Se esperaba que al menos uno de los tratamientos fuera diferente, el caso del control positivo, se concluye que debe evaluarse varios métodos de extracción de los ácidos nucleicos para determinar la posibilidad de que el método de extracción empleado se le pueda atribuir la falta de resultados.

## II. INTRODUCCION

El uso de plantas en la medicina popular es una práctica muy común en nuestro medio, sin embargo muchas de estas plantas no cuentan con un estudio científico que apoye sus propiedades curativas, que validen su aplicación clínica y aseguren su carencia de propiedades tóxicas.

El Ixbut (Euphorbia lancifolia) es una de las plantas de uso popular más amplio a la que se atribuyen propiedades lactogénicas y su estudio es importante ya que de ser comprobado su efecto, podría ser utilizado terapéuticamente en madres con deficiencia en la producción de leche, dando así la oportunidad de dar a sus hijos un alimento más completo, seguro y económico.

Durante la lactogénesis se establece una estimulación de la síntesis de proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) sirve como fuente de información genética para la síntesis de todas las moléculas de proteínas de la célula y el ácido ribonucleico (ARN) participa en dicha síntesis directamente como ARN mensajero, ribosómico y de transferencia.

Este estudio trató de verificar, si el efecto que tiene el Ixbut sobre la glándula mamaria es a nivel del incremento del número de células o del tamaño de las mismas en la glándula mamaria mediante la determinación cuantitativa de los ácidos nucleicos y también un efecto sobre la síntesis proteica, medido por el aumento del ARNm durante los procesos

de síntesis protéica mediante la cuantificación del ADN y del ARNm presentes en las células de téjido mamario. Se emplearon animales de laboratorio específicamente ratas hembras de raza Wistar en período de lactación, que recibieron tratamiento que incluye la administración de la planta incorporada en su alimentación.

Para cuantificar los ácidos nucleicos, se separaron de glándulas mamarias por el método de extracción de fenol y posteriormente fueron estos compuestos cuantificados espectrofotométricamente.

### III. ANTECEDENTES

#### A. GLANDULA MAMARIA (En humanos)

La glándula mamaria en la prepubertad esta formada por unos cuantos conductos pequeños lineales rudimentarios. En las hembras, con el principio de la pubertad, el tejido de los conductos mamarios empieza a ser estimulado por las hormonas estrogénicas. Después de la ovulación y al inicio de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo, en conjunto con la acción de los estrógenos producen las modificaciones típicas de la estructura de los conductos lobulo alveolares maduros, de la glándula funcional (1).

Durante el embarazo, los conductos lobulos alveolares mamarios sufren cambios, además de ser estimulados, son incrementados en número por el aumento de la cantidad de estrógenos de origen sexual producidos por el cuerpo lúteo y por la placenta, y este efecto es favorecida por la prolactina, la hormona lactogeno-placentaria y otras hormonas metabólicas maternas. En el post-parto la ausencia de la placenta, la cual ha sido expulsada en el parto, hace que los esteroides sexuales aumenten su acción sobre la lactogénesis especialmente bajo los efectos de prolactina, hormona inductora de síntesis y expulsión de leche (1-3).

El tejido parenquimatoso constituido por pequeños conductos y alveolos de las glándulas mamarias de las nulíparas no preñadas, forman principalmente una capa doble de epitelio embebido en el tejido adiposo. En el embarazo, a los 7 días de gestación la glándula sufre una adenosis de preñez que se define como una gran proliferación alveolar mamaria que es fácilmente detectable. Posteriormente a los catorce días de gestación la adenosis mamaria del embarazo ha avanzado en alto grado y mas áreas de grasa mamaria son remplazadas por proliferación de tejido parenquimatoso. Al alcanzar los 19 días de gestación la actividad secretora ha progresado a un estado que representa una condición óptima para el proceso de lactancia, el epitelio alveolar muestra actividad máxima de secreción. Por último el lumen alveolar mamario, post-parto, se llena de leche, mostrando distensión y dilatación del alveolo (3,4).

Cada alveolo consiste en células glandulares productoras y glandulares secretoras que rodean en ductulo. Células mioepiteliales rodean el mismo alveolo y son éstas las que se contraen y expulsan la leche hacia el sistema conductor, lo que da lugar a un reflejo galactogogo por la hormona oxitocina (3,4).

De acuerdo al estudio realizado por Sinha y Tucker, mostró que la glándula mamaria en ratas incrementa su tamaño de 9.3 mm a los 10 días hasta 450.9 mm a los 100 días. En

cuanto a la cantidad de ADN, se incrementa de 0.33 mg a los 10 días hasta 3.52mg a los 100 días. Este estudio demostró que el crecimiento y aumento de ADN se da al inicio de la pubertad (5).

#### B. FISIOLOGIA DE LA LACTANCIA (En humanos)

Como preparación para la lactancia, hay una proliferación considerable de lobulillos y de sus unidades productoras de leche durante el embarazo. Los primeros cambios se llevan a cabo en la mama mas o menos a la octava semana del embarazo. Las areolas se oscurecen y los pezones se hacen mas erectos. Las mamas se hacen más firmes y turgente, aumentando gradualmente de tamaño, pesando cerca de 700g cada una. El calostro comienza a elaborarse al final del embarazo manteniéndose a niveles bajos por acción de la supresión de la prolactina, por las altas concentraciones de estrógenos y progesterona características de las fases del embarazo. Después del parto disminuyen los niveles de estrógenos y se eleva la prolactina (3).

La succión por parte del bebé provoca la disminución de la concentración del factor inhibidor de prolactina de origen pituitario para que libere oxitocina. Esta hace que la leche salga de los alveolos y continúe hacia el sistema conductor (3,4,6).

### C. CAMBIOS A NIVEL MOLECULAR

Debido a que la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) por célula en el núcleo de las células del tejido somático en cada especie en particular es constante, su contenido en el tejido se emplea como un índice del número de células presentes en éste. Los cambios en la cantidad de ADN total contenido en la glándula mamaria por unidad de peso corporal, pueden ser empleadas para obtener una estimación del número de células. Por otro lado, la cantidad de ácido ribonucleico (ARN) es utilizado como un índice que refleja la actividad de síntesis de proteínas en el tejido (4,6).

A la 12a. hora después del parto la relación del contenido de ARN/ADN cambia y puede ser detectado; en el post-parto esta relación puede aumentar hasta el día 160. de lactancia (3,4).

El contenido de ARN en la glándula mamaria en el momento de la lactancia depende de muchos factores, tales como: intensidad de succión (aumentando los niveles de prolactina) estimulación de los niveles de síntesis y excreción del complejo hipotálamo-hipofisiario. También la síntesis y excreción de hormona promotora de galactopoyesis y de la secreción apócrina de leche a nivel de los alveolos y pequeños conductos galactóforos (7-9).

Las hormonas en general pueden aumentar la función de sus respectivos órganos blanco, principalmente por dos

formas generales de acción: 1) efectuando una estimulación de procesos celulares en las células ya existentes, y 2) incrementando el número de células diferenciadas o unidades fundamentales durante el desarrollo. El caso de la hormona insulina la cual incrementa la síntesis de ADN en un ejemplo del segundo proceso (7,8).

Otros estudios en diferentes especies indican que los niveles de ARN en glándula mamaria durante la primera semana después del parto se encuentran aumentados, manteniéndose estos niveles durante todo el período de producción intensiva de leche y decreciendo durante el séptimo mes de lactancia (7,9,10).

Además el ADN de la glándula mamaria esta aumentando durante el período preparatorio a la lactancia y durante la primera semana después del parto (10,11).

#### D. ACIDOS NUCLEICOS

Específicamente el ADN almacena la información genética en las células, así como los mecanismos modelos de lectura. Estas macromoléculas constituyen copia en dos dimensiones de toda la información genética de un organismo, la que se expresara posteriormente en un fenotipo (12).

La columna vertebral básica de los ácidos nucleicos es una unidad de repetición continua de un enlace éster de fosfatos con los azúcares L-ribosa o L-desoxirribosa; esta

estructura proporciona estabilidad a la gran molécula y su naturaleza polianiónica asegura y amplía la estructura y la modulación (11,12).

La estructura del ADN comprende también bases nitrogenadas púricas y pirimidicas, de una pentosa desoxirribosa y ácido fosfórico. Las bases pirimidicas presentes en el ADN son: la timina y citosina, y las púricas son: adenina y guanina (13,14).

La molécula de ADN esta formada por dos largos filamentos constituidos por dos cadenas de polinucleótidos enrolladas una sobre la otra en forma antiparalela formando una doble hélice. La función del ADN es proporcionar información genética para la síntesis de todas las moléculas proteicas de la célula y el organismo (13,14).

#### 1. Propiedades Bioquímicas:

La estructura del ADN puede perderse incrementando o disminuyendo la concentración salina. Debido al apilamiento de las bases y a los enlaces de hidrógeno entre las pilas, las moléculas de ADN de doble hebra exhiben las propiedades de una fibra y en solución es un material viscoso (13).

#### 2. Acido Ribonucleico

El ARN es un polímero de ribonucleótidos púricos y pirimidinicos enlazados por puentes 3',5'-fosfodiéster análogos a los de ADN. Aunque el ARN contiene los ribonucleótidos de adenina, guanina y citosina, no posee

timina, y en su lugar contiene el ribonucleotido de uracilo. Por lo tanto, los componentes pirimidicos de ARN difieren de los de ADN.

En todos los organismos procarioticos y eucarioticos existen tres clases principales de moléculas de ARN que se clasifican atendiendo a su función en : mensajero (ARNm), es el más heterogéneo en tamaño y estabilidad. La mayor parte de las moléculas de ARNm tienen adherido en el extremo 3'-hidroxilo un polímero de residuos adenilato de 20 -250 nucleótidos de longitud [Poli(A)] y su función es mantener la estabilidad de la molécula; esta propiedad es usada para extracción de ARNm de las otras formas de ARN, esto se hace por medio de cromatografía de afinidad. Todos los miembros de esta clase funcionan como un mensajero transportando la información de un gen a la maquinaria que sintetiza proteínas. Además lee la secuencia nucleotídica del ADN. El ARN de transferencia (ARNt) sirve como adaptador para traducir la información contenida en la secuencia de nucleótidos del ARNm a los aminoácidos específicos. Las moléculas de ARN ribosomico (ARNr) contribuyen a la formación de ribosomas (12-15).

El procesamiento del ARN incluye tanto la modificación química como la adición y delección de bases, parece estar relacionado con la estabilidad del ARN, puesto que el grado de modificación de las moléculas del ARN tras la transcrip-

cion se encuentra correlacionada positivamente con su vida media. Además ciertas alteraciones refinan la estructura del ARN y permiten que éste sea reconocido por otros componentes celulares (13).

El ARN Puede ser hidrolizado por alcalis, labilidad que es útil tanto para diagnósticos clínicos como para procesos analíticos (12).

#### E. METODOS DE CUANTIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

##### 1. Métodos ópticos:

a) Medición con luz ultravioleta: tanto el ADN como el ARN absorben luz ultravioleta tan eficientemente que la absorbancia óptica puede ser usada como una medida exacta, rápida y no destructiva hasta de concentraciones de 2.5 ug/ml.

b) Métodos colorimétricos: La determinación de ADN con el reactivo de difenilamina, se basa en una depurinación de ADN con ácido caliente, éste rompe el enlace de fosfato de azúcar y deshidrata la 2-desoxi-d-ribosa a aldehído w-hidroxi-levulinico, el cual se condensa con difenilamina dando productos con una absorbancia a 595nm.

En el caso del ARN, forma un complejo coloreado con el orcinol, complejo que se forma por la D-ribosa de ARN y tiene un máximo de absorción a 665nm alcanzando un máximo de color en 15 minutos (16-22).

Para cuantificar el ARNm es necesario purificarlo por medio de cromatografía de afinidad, haciendolo pasar por una columna de Oligo (dt)-celulosa y con un posterior medición con el espectrofotometro a 260nm (16,18,19).

2. Métodos fluorometricos con Bromuro de Etidio: Es un método rápido semicuantitativo para la estimación de cantidades de ADN en muestras conteniendo sustancias contaminantes. Este método se basa en la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio inducida por luz ultravioleta (U.V.).

La cantidad de ADN puede ser estimada por comparación de la intensidad de la muestra fluorescente con una serie de patrones el ensayo es sensible para concentraciones de 0.5 a 20 ug/ml (18).

3. Métodos del Southern y Northern Blot: El método del Southern Blot tiene un uso más cualitativo ya que se utiliza para establecer la secuencia de ADN y por hibridización con cadenas de oligonucleótidos marcados. Hibridización significa apareamiento de las bases, técnica que se utiliza para identificar y determinar la localización, secuencias de ácidos nucleicos específicas dentro de grandes secuencias, como puede ser un genoma, moléculas de ADN recombinantes o mezclas de moléculas de ARN.

En el Southern Blot se digiere el ADN con una o más endonucleasas de restricción, separandose fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN

bicatenario se tiñen para ser localizados, se desnaturalizan in situ introduciendo el gel de hidróxido sódico y se transfieren por capilaridad a una membrana utilizando una solución de alta concentración salina. Los fragmentos de ADN que son separados sobre geles de agarosa son desnaturalizados y transferidos a nitrocelulosa. El ADN o ARN sobre la nitrocelulosa es marcado con fosforo 32 (radioactivo) y la secuencia complementaria es localizada por autoradiografía o por fluorescencia si ha sido marcada con fluorocromos. El northern Blot es un método análogo al anterior para detectar secuencias específicas de ARN (16,17,22).

4. Electroforesis en gel de poliacrilamida: Este proceso separa moléculas de ADN por tamaño y carga eléctrica de las moléculas de ADN o ARN. Tienen el inconveniente que debe esperarse mucho tiempo para que el gel de poliacrilamida se polimerice totalmente (17).

5. Electroforesis en gel de Agarosa con Bromuro de Etidio: Este procedimiento separa moléculas de ADN por tamaño, y las moléculas se hacen evidentes usando un colorante fluorescente que puede ser el bromuro de etidio. El método es rápido y simple, es mas sensible y tiene alta resolución (19).

#### F. GALACTOGENICOS

Los galactogénicos son sustancias que incrementan la secreción de leche. En primer lugar están las hormonas,

especialmente la prolactina y la hormona liberadora de tirotrópina (23).

#### 1. Artificiales:

Algunas drogas incrementan la producción de leche al promover la secreción de prolactina como son: la Sulpirida, Clorpromazina y Metoclopramida, La clorpromazina es un potente antipsicótico con gran variedad de efectos secundarios, por lo que no es utilizado con este fin (24,25).

La metoclopramida se considera el prototipo de los antagonistas dopaminérgicos hipotalámicos y su relativa seguridad, ha sido probada para su uso en insuficiencia láctea. El tratamiento con metoclopramida ha demostrado que aumenta la producción de la leche porque estimula la secreción de prolactina aumentando su nivel basal. En el estudio realizado por Ehrenkranz y Akerman (1986) (25), se administró metoclopramida a razón de 10mg orales cada 8 horas por 7 días a 23 mujeres en período de lactancia de 32.0-37.0 días post-parto y se observó un aumento significativo de 18.0-93.33 ml/día a 32.3-197.4 ml/día entre el primer y séptimo día de tratamiento (25).

#### 2. Naturales:

En Guatemala existen varias plantas a las cuales se les atribuyen propiedades galactogénicas y entre ellas esta el Ixbut (Euphorbia lancifolia), aunque el mecanismo de acción no ha sido demostrada.

G. PLANTA GALACTOGENICA USADA EN EL ESTUDIO, IXBUT (Euphorbia lancifolia)

1. Descripción de la planta:

Es una planta herbacea que puede alcanzar 2 metros o más de altura y que contiene savia con apariencia de látex (lechosa). Sus hojas aisladas, oblongas-lanceoladas, puntiagudas en sus extremos., Tiene doce centímetros de longitud y 1.5 a 2.0 cm. de ancho. Las flores son de color blanco pequeñas (26,27).

2. Clasificación taxonómica:

Sub-clase: Dialipetalas Superovaries Meristemona.

Orden: Euforbidas

Familia: Euforbiaceas

Género: Euphorbia

Especie: lancifolia (28).

3. Distribución:

Diversas especies de Euphorbia se encuentran en México, Guatemala, Belice y Honduras; se encuentran en áreas boscosas y húmedas. En Guatemala puede ser encontrada Euphorbia lancifolia en San Felipe Retalhuleu, en los parajes cercanos a Palín y Escuintla, en Cobán Alta Verapaz y en Petén de donde se cree es originario (26,27).

4. Propiedades:

Una de las más conocidas es su propiedad de estimulación

galactogénica. Se sabe que la infusión de la planta es usada por las mujeres para incrementar la producción de leche cuando están en el periodo de lactancia materna. Además en algunas regiones la usan como emenagogo (26-31).

Dina Nathusius, dirigente de la liga de la lactancia materna de Guatemala (1978), sugiere que el Ixbut puede ser beneficioso como tranquilizante dado su efecto relajante en las madres post-parto, que tienen confianza en su poder galactogénico (29). En 1950, el Dr. del Pozo encontró que inyecciones intravenosas de extracto de Ixbut producía una disminución en la presión sanguínea y una marcada desaceleración del corazón en mujeres lactantes (29).

Por otra parte en lo que respecta a sus propiedades en el área pecuaria se sabe que puede causar la muerte a caballos y ovejas cuando es consumida por estos, no encontrándose documentos más recientes que apoyen esta afirmación (27).

Sin embargo, se le han dado otros usos; en Colombia, por ejemplo, la planta mezclada con el forraje diario de vacas, con el fin de incrementar la cantidad de leche. En el Salvador la infusión de la planta también fue usada experimentalmente en vacas reportándose un incremento en la producción diaria de leche (27).

##### 5. Componentes:

En 1957, Squibb, y Scrimshaw, estudiarón el contenido de carotenos y la actividad de la vitamina A de cuatro forrajes,

entre ellos el Ixbut, el cual demostró tener el más alto contenido de vitamina A (29).

El único estudio realizado en Guatemala sobre el ixbut, ha sido el de la licenciada Ana Cristina López, el cual demostró un efecto galactogogo a nivel histológico en la glándula mamaria de ratas tipo Wistar en período de lactancia. Hasta el momento el principio activo del Ixbut no ha sido aislado y se necesita de mucha más investigación antes de obtener conclusiones sobre su poder galactogénico (30).

#### IV. JUSTIFICACIONES

En nuestro medio la lactancia materna desempeña un papel importante en la supervivencia, ya que proporciona un alimento limpio, completo y económico. Sin embargo debido al estado nutricional de muchas madres, la producción de leche es deficiente, por lo que privan a sus hijos de este alimento. Para corregir esta deficiencia es común entre la población guatemalteca el uso de plantas galactogénicas, entre las que se encuentra el Ixbut. Por tanto se hace necesario un estudio científico que investigue esta propiedad (32,33).

El estudio formal de la actividad galactogénica de esta planta de uso popular podría ser el punto de partida para otros estudios acerca del valor terapéutico de sus principios activos.

## V. OBJETIVOS

### A. GENERAL:

Encontrar evidencia científica de la actividad galactogénica del Ixbut (Euphorbia lancifolia) para validar parcialmente su uso popular.

### B. ESPECIFICO:

Medir los posibles cambios producidos por esta planta al tejido mamario de ratas hembras en período de lactancia, por medio de la determinación del contenido de ácidos nucleicos.

## VI. HIPOTESIS

La administración del Ixbut (Euphorbia lancifolia) a ratas lactantes aumenta la concentración de ácidos nucleicos en la glándula mamaria, indicando posibles efectos sobre la lactogénesis.

## VII. MATERIALES Y METODOS

### A. UNIVERSO DE TRABAJO

#### 1. Muestra:

- Ixbut (Euphorbia lancifolia), planta de uso popular.

#### 2. Unidades de Experimentación:

- Un total de 30 ratas blancas hembras adultas tipo Wistar en período de lactancia.

### B. RECURSOS

#### 1. Humanos

a) Investigador: Br. Denny María Guarán Mijangos

b) Asesores del trabajo: Dr. Miguel Angel Ortiz

Dr. Juan de Dios Calle.

#### 2. Institucionales:

a) Instituto de Nutrición de Centro América y Panama (INCAP)

i. Bioterio: proporcionar las 24 ratas y jaulas, comederos, instalaciones y alimentación de las mismas.

ii. Proporcionar las plantas del estudio y su procesamiento previa a su administración.

iii. Instalaciones y equipo de laboratorio.

iv. Asesoría técnica.

v. Reactivos.

vi. Biblioteca.

b) Biblioteca de Centro de Estudios Mesoamericanos (CEMAT).

c) Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

d) Biblioteca de la Universidad del Valle de Guatemala.

### 3. Fisicos:

#### a) Equipo:

- Jaulas metálicas.
- Dieta basal para animales de experimentación.
- Equipo quirúrgico estéril, tijeras, pinzas ratón, pinzas simples, bisturí.
- Campana para anestesia.
- Tabla de disección.
- Balanza analítica.
- Centrífuga refrigerada.
- Espectrofotómetro.
- Horno.
- Autoclave.

#### b) Cristalería:

- Frascos para suministro de agua.
- Tubos de ensayo.
- Vasos de precipitar de 100 y 50 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Columnas para cromatografía.
- Balones aforados.
- Pipetas de 10,5,2 y 1 ml.

#### c) Reactivos:

##### i. Aislamiento de ácidos nucleicos

- Mezcla de fenol: 500gr. de cristales de fenol, 70ml de

m-cresol. 0.5gr. de 8-hidroxiquinoleína. 150ml de agua destilada. Se guardó en frasco obscuro a 4°C. El m-cresol es un componente opcional.

- Solución detergente: 1g de tri-isopropilnaftaleno-Sulfonato de Sodio (SDS) 6g. de 4-aminosalicilato de sodio, 5ml de mezcla de fenol. Se guardó en frasco obscuro a 4°C.
- Solución desproteinizadora: mezcla de fenol y cloroformo, 1:1 volumen.
- Alcohol absoluto.
- Buffer de Acetato de Sodio 0.15M (pH 6 con ácido acético) conteniendo 5gr/lit de SDS. Se dejó a temperatura ambiente.

#### ii. Cuantificación de ADN:

- Reactivo de Difenilamina: Disolver 15gr. de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial. Agregar 1.5ml de ácido sulfúrico concentrado, guardándolo en la obscuridad. Justo antes de ser usada agregar 0.5ml de solución stock de acetaldehído.
- Solución stock de acetaldehído: 2ml de acetaldehído en 100ml de agua destilada. Guardar a 4°C.
- Stock de ADN: 1mg/ml de agua destilada. Dejar a -20°C.

#### iii. Cuantificación de ARNm:

- Buffer 1: Tris- HCl 20mM (pH 7.5), EDTA 1mM, NaCl a

0.5M, SDS 0.2% (w/v).

- Buffer 2: Tris-HCl 20mM (pH 7.5), EDTA 1mM, NaCl 1M  
SDS 0.2% (w/v).
- Buffer 3: Tris- HCl 20mM (pH 7.5), EDTA 1mM, SDS 0.2%  
(w/v).
- Acetato de Sodio 2.0 M (pH 6 con ácido acético).
- NaOH 0.3M.
- Una pequeña columna (de vidrio o polietileno) empacada  
con 25mg a 1g. de Oligo (dt) celulosa (Columna de  
cromatografía de afinidad). Todas las soluciones son  
esterilizadas en autoclave a 115 °C por 20 minutos. Toda  
la cristalería debe ser esterilizada en un horno a 200°C  
por una hora. El mecanismo de la cromatografía de  
afinidad es el siguiente: Se utiliza un ligando  
inmovilizado que interactúa con el poli(A) este ligando  
es la Oligo (dT) celulosa. Este consiste en un polímero  
de 10-20 nucleótidos, unidos covalentemente a un soporte  
de carbohidratos. Cuando el ARN es expuesto a este  
ligando interactúa fuertemente con el poli(A) del ARNm  
uniéndose. Después son eliminados todos los componentes  
indeseables, eluyendo luego el ARNm unido al ligando  
con un buffer bajo en concentración de sal.

## C. PROCEDIMIENTO

1. Recolección del Material Vegetal:

La planta se recolectó de cultivos hechos en la finca del INCAP.

2. Proceso de producción de un extracto de la planta:

Los tallos y las hojas fueron lavados y en seguida finamente picados, prensados y filtrados a través de una gasa, obteniéndose el extracto; éste fue almacenado a - 10°C hasta el momento de ser utilizado.

3. Manejo de Animales y Administración de material Experimental:

Un total de 24 ratas hembras vírgenes de 100 días de edad fueron utilizadas. Las que después de ser apareadas y confirmada la preñez fueron separadas en forma aleatoria siendo alojadas individualmente en su respectiva jaula. Tres días después del parto fueron aleatorizadas de modo que cada madre tuviese 10 ratas lactantes. Todas éstas fueron alimentadas hasta los 14 días de edad. Las madres y sus camadas fueron divididas en 4 grupos de 6 ratas, cada uno de los cuales recibió diferente tratamiento. El tratamiento se inició desde el primer día después del parto. Las sustancias utilizadas para los tratamientos fueron repartidas y disueltas en el agua de bebida (100ml c/u), para minimizar el estrés producido por el manipuleo excesivo

de xlos animales. Los tratamientos se dieron de acuerdo al siguiente esquema:

Grupo	Substancia
A	Agua
B	Agua más sacarosa 1.4g por rata al día.
C	Metoclopramida, disuelta en agua 1.2mg por rata al día.
D	Ixbut disuelto en agua, 8.2g por rata al día.

Las camadas fueron pesadas al tercer día de nacidas al igual que las madres; ésto sirvió como un indicador de la producción de leche del grupo durante el período de lactancia.

#### 4. Sacrificio de los Animales:

El día 14 de lactancia todas las madres fueron sacrificadas. Se hizo disección de una glándula mamaria en la región inguinal lado derecho de cada rata y se guardó en una solución estéril de sacarosa 0.25M a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de hacer el respectivo análisis de ácidos nucleicos.

#### 5. Aislamiento de Acidos Nucleicos:(21)

a. Se homogenizó el tejido por medio de un homogenizador tipo Potter-Eveljehm en la solución detergente (rango ideal de tejido en volumen 1:10), manteniéndolo todo el tiempo a  $4^{\circ}\text{C}$  sobre hielo. La lisis de las células

- provoca un aumento en la viscosidad de la solución.
- b. Se transfirió este homogenizado a un tubo de centrifuga (de vidrio) agregando un volumen igual de solución desproteinizadora.
  - c. Se agitó la mezcla a la marca 3 en un agitador tipo vortex (modelo K 550-6) manteniendo la emulsión por 10 minutos a temperatura ambiente.
  - d. Se centrifugó durante 10 minutos a 4,000rpm a 4°C. La separación presentó 3 fases bien definidas.
  - e. Se retiró la fase acuosa cuidadosamente, por medio de una pipeta y se transfirió a un segundo tubo de centrifuga conteniendo un volumen igual de solución desproteinizadora.
  - f. Se re-extrajo el residuo del tratamietno con fenol y las fases de proteínas, agregando 1 ó 2 ml de solución detergente al tubo de centrifuga original, se mezcló y luego se centrifugó para remover la fase acuosa. Este paso es importante para recobrar cuantitativamente los ácido nucleicos o el total de cadenas de poliadenina de ARNm [poli(A)] ya que éste va ser medido posteriormente.
  - g. Se extrajeron las fases acuosas combinadas por medio de agitación con la mezcla desproteinizadora. Se centrifugaron a 5,000 rpm por 5-10 minutos a 4°C y cuidadosamente se retiró la fase acuosa a otro tubo.
  - h. Se agregó 2.5ml de alcohol absoluto a la solución

acuosa de ácidos nucleicos. se mezcló y se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche para precipitar los ácidos nucleicos.

- i. Se recolectaron los ácidos nucleicos precipitados, por centrifugación (5,000rpm) por 10 minutos, descartando el sobrenadante.
  - j. Se eliminó el remanente de alcohol (por medio de nitrógeno gaseoso) del precipitado que contiene los ácidos nucleicos, se disolvió en 3ml de buffer de acetato de sodio. Se le agregó 2.5 ml de alcohol absoluto y se mezcló el precipitado de los ácidos nucleicos con un agitador tipo vortex. Este paso sirvió para remover el fenol o los contaminantes de bajo peso molecular presentes en la preparación. Se recuperaron los ácidos nucleicos por centrifugación y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
6. Cuantificación de ADN: (22)
- a. A 0.5ml de la muestra y/o patrón se les agregó 0.5ml de ácido perclórico 1N. Se hidrolizó por 70 minutos a  $70^{\circ}\text{C}$  en baño de María.
  - b. El hidrolizado fue enfriado sobre hielo, se centrifugó a 1,500rpm por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y fue decantado el sobrenadante dentro de tubos rotulados.
  - c. A todo el precipitado se le agregó 1ml de ácido perclórico 0.5N se agitó para repetir el paso b.
  - d. A 1ml del hidrolizado del paso c se le agregó 2ml de

reactivo de difenilamina. se mezcló e incubó a 30°C por 18 horas.

e. Se leyó la absorbancia a 595 y 650nm, usando el patrón de 0 ug/ml como blanco.

f. Se graficó la curva patrón colocando, en un eje (Y) los datos de absorbancia a 595nm menos la absorbancia a 650nm como una función inicial de la concentración de ADN y en el otro eje (X) la concentración de los patrones. Se emplea esta curva para determinar las concentraciones desconocidas de ADN.

g. Curva Patrón: dilución de solución concentrada de ADN con agua destilada. (ver Gráfica No. 1)

ADN conc. (ul)	0	10	20	50	100	200
Agua (ml)	1.0	0.990	0.980	0.950	0.900	0.800
Concentración de ADN (ug/ml)	0	10	20	50	100	200

Nota: para evitar interferencias con lípidos y otros contaminantes del extracto de ácidos nucleicos se usa una extracción preliminar así: al precipitado se le agregó 1ml de ácido perclórico 0.2N en etanol al 50%. Se enfrió en hielo por 15 minutos a 4°C; se descartó el sobrenadante. Se agregó al precipitado 1ml de una mezcla de etanol-éter (3:1), se incubó por 10 minutos a 70°C se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.

## 7. Cuantificación de ARNm:(21)

Se realizó todo el procedimiento a temperatura ambiente.

- a. Se evaporó el etanol con una corriente de nitrógeno gaseoso del precipitado de ácidos nucleicos y se disolvió en el buffer No.3.
- b. Se calentó la solución por 5 minutos a 65°C en baño de María, se enfrió y se le agregó un volumen igual de buffer No. 2.
- c. Se equilibró la columna (descrita en reactivos, página 25) con buffer No.1 y se empleó un flujo de 10ml/hora de la muestra. El eluyente de la columna puede ser agregado otra vez a la columna para que se una la mayor cantidad de poliadenina [poli(A)] contenida en el ARNm.
- d. Se lavó la columna con buffer No.3 hasta que presentó un mínimo de absorbancia a 260nm.
- e. Se eluyó la columna con buffer No. 3 para recobrar el poli (A) contenido en el ARNm y se leyeron las fracciones a 260nm de absorbancia.
- f. Después de usar la columna se lavó por elución con NaOH 0.3M y buffer No.3, conteniendo 0.02% peso/volumen de azida de sodio para que el pH regrese a 7.5 e impedir el crecimiento de microorganismos. La columna se dejó a temperatura ambiente pudiendo ser reusada indefinidamente si se le somete al procedimiento anterior.

#### D. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se hizo por medio de un agrupamiento simple, totalmente al azar; el cual estaba constituido por 4 grupos de tratamiento de 6 ratas cada uno los cuales fueron: 1) agua, 2) agua más azúcar, 3) metoclopramida y 4) Ixbut más azúcar. Se midió la concentración de ADN del tejido mamario de las ratas en ug/ml. Además se comparó el peso de las ratas al inicio y al final de los tratamientos.

#### E. ANALISIS DE DATOS

El análisis estadístico de los datos se hizo por medio de un Análisis de varianza de una vía con un nivel de confianza del 95%.

## VIII. RESULTADOS

La presente investigación incluyó un total de 24 ratas en período de lactación sin embargo al final solo se utilizaron 21 debido a que 3 ratas no quedaron preñadas y tuvieron que ser eliminadas, a éstas les fueron administrados 4 tratamientos diferentes siendo estos agua, azúcar, metoclopramida, Ixbut mas azúcar; luego se midió la concentración de ADN en ug/ml en 0.5g de glándula mamaria.

Los promedios de las concentraciones de ADN fueron los siguientes: Grupo A (Agua) 141.2 ug/ml  $\pm$  16.7 ug/ml, Grupo B (Azúcar) 136.5 ug/ml  $\pm$  46.7ug/ml, Grupo C (Metoclopramida) 167.2 ug/ml  $\pm$  41.6 ug/ml , Grupo D (Ixbut) 184.0 ug/ml  $\pm$  65.2 ug/ml. (tabla A)

Se pesaron las ratas y sus camadas al hacer el análisis estadístico (Análisis de varianza de una via) con un nivel de significancia del 95%, no mostrarón diferencias significativas (tablas B y C).

El peso promedio de las glándulas mamarias fue el siguiente: Grupo A 4.43g  $\pm$  0.35g, Grupo B 5.6g  $\pm$  0.77g, Grupo C 5.8g  $\pm$  0.78g, Grupo D 6.0g  $\pm$  1.3g.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Este fue un ensayo muy preliminar ya que no se contó con todos los elementos y materiales para un trabajo más completo, pero en vista de que no existen otros trabajos sobre la dilucidación del mecanismo de acción del Ixbut, se decidió hacer este primer ensayo exploratorio.

Los resultados obtenidos no mostrarán ninguna evidencia del poder galactogénico del Ixbut, medido a través del aumento de los ácidos nucleicos, sin embargo, no se puede concluir que no tenga actividad galactogénica ya que hubo muchos factores que pudieron haber influido en la medición de los ácidos nucleicos.

Es de vital importancia notar que los ácidos nucleicos son muy lábiles a la hidrólisis enzimática y a la acción de las bacterias, debido a esto el método y las condiciones de extracción influyen grandemente al momento de cuantificar el ADN. El ambiente en el que se trabajó no fue el ideal para el estudio, debido a lo difícil de mantener la temperatura adecuada para la extracción de los ácidos nucleicos, así como también un ambiente totalmente aséptico y libre de enzimas hidrolíticas.

Otro factor que influye en la cuantificación del ADN es la porción de glándula que se tome para la extracción

ya que a veces no se logra tomar exclusivamente tejido de la glándula sino que tejido conectivo y adiposo. Además en la reacción colorimétrica con difenilamina interfieren las proteínas, lípidos, sucrosa, otros azúcares y aldehídos orgánicos ; en este aspecto si la extracción no fue adecuada puede haber contaminación con proteínas y lípidos, además se debe recordar que las glándulas son almacenadas en solución de sucrosa estéril.

Las glándulas antes de su procesamiento y respectivo análisis, tenían que haberse almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ , sin embargo no fue posible encontrar un congelador a esta temperatura por lo que fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; ésto pudo haber influido así como la excesiva manipulación de las mismas.

La cuantificación de ARNm no se efectuó debido a que el ARN es mucho más lábil y puede ser destruido por ribonucleasas y no se contó con un inhibidor de estas enzimas.

Para la extracción, no se utilizó completamente la glándula mamaria, ya que la metodología de extracción proponía una relación de 1g de tejido por 9ml de solución; en este caso se utilizó la mitad de esta relación; ésto lograría una uniformidad en la cantidad de tejido que se tomara de cada glándula, ya que el peso de cada glándula difería y de esta forma no sería influida la cantidad de ADN encontrada.

Se consideró además, el peso de las ratas, camadas y glándula mamaria para observar alguna diferencia a nivel de estos parámetros, sin embargo no se encontró ninguna diferencia significativa con un nivel de significancia al 95%.

## X. CONCLUSIONES

- A. La administración del Ixbut (Euphorbia lancifolia) a ratas lactantes no aumentó la concentración de ácido desoxirribonucleico en la glándula mamaria.
- B. La concentración del ácido desoxirribonucleico en la glándula mamaria de ratas hembras tipo Wistar del grupo control positivo (metoclopramida) no demostró ningún cambio.

## XI. RECOMENDACIONES

- A. Es necesario hacer varios estudios relacionados con el Ixbut. bajo otras condiciones para validar que no existe ningún cambio a nivel de los ácidos nucleicos. en la glándula mamaria de la rata.
  
- B. Evaluar otros métodos de extracción y de cuantificación de ácidos nucleicos.
  
- C. Establecer condiciones apropiadas para extraer las glándulas mamarias de las unidades experimentales.
  
- D. Procesar el tejido mamario lo más rápido posible y evitar la manipulación excesiva del mismo.
  
- E. Evaluar concentraciones diferentes de Ixbut y la forma de administración del extracto.
  
- F. Aumentar las unidades experimentales para reducir la varianza.

## XII. REFERENCIAS

1. Larson B. Lactation. A Comprehensive Treatise. E.U.A.: Academic Press, 1978. Vols. I-IV. 715p.
2. Grossman E. Helping mothers to nurse their babies. Gen. Pract. 1965; 31(4):78-86.
3. Neville MC, et al. Lactation Physiology, Nutrition and Breast-Feeding. New York: Plenum Press, 1983. 466p.
4. Voherr H. The Breast. E.U.A.: Academic Press. 1974. 282p.
5. Sinah YN, et al. Mamary Gland Growth of Rats Between 10 to 100 Days of Age. Am. Jour. Phisyol. 1966;210(3):601-605.
6. Lacerva V. Lactancia Materna. México: El Manual Moderno: 1983. 177p.
7. Clapp C, et al. Regulación Integrativa de la Lactancia. Bol. Estud. Med. Biol. Mex. 1987;35:63-107.
8. William Y, Corner G. Sex and Internal Secretions. 3a.ed. E.U.A.: Baltimore, 1961. 704p.
9. Fuji T, Vिलlee D. Comparison of Ribonucleic Acid Metabolism in Tissues of Immature and Adult Rats. Biol. Chem. 1967;82:453-463.
10. Desjardins KL, Mcmillnad C, Hafs H. Reproductive Organ DNA and RNA of Male and Female Rats From Birth to 100 Days of Age. Anat. Rec. 1968;161:17-22.

11. Yakivenko NV. Content of Nucleic Acid in the Mamary Tissues and the Plasma og Goats During Lactation. Bio. Khim. Zn. 1976;48:45-47.
12. Sodeman W, Sodeman T. Bioquímica. 6a.ed. México: Interamericana, 1984. 1214p. (p23-25).
13. Rawn DJ. Bioquímica. España: Interamericana. McGraw-Hill, Vols.2, Vol 2, 1989. 375p.
14. Lehninger A. Bioquímica, Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. 2a.ed. Barcelona: Omega, 1985. 1117p.
15. Martin D, et al. Bioquímica de Harper. 9a.ed. México: El Manual Moderno, 1984. 660p.
16. Robyt J, White B. Biochemical Techniques Tehory and Practice. California: Broks Cole, 1987. 568p. (213-243p).
17. Bjerrum D, et al. Handbook of Immunoblotting of Proteins. E.U.A.: CRC Press, 1990.265p.
18. Scheleif R, Wensik F. Practical Methods in Molecular Biology. E.U.A.: Springer-Verlag, 1981. 220p.
19. Rendina G. Técnicas Bioquímica Aplicada. México: Interamericana, 1974. 280p.
20. Colowick S, Kaplan N. Methods in Enzymology. 2a.ed. New York: Academic Press. Vols 12, Vol 3, 1957. 1154p.
21. Walker J, Methods in Molecular Biology. E.U.A.: Human Press. Vols 3, Vol 3, 1984. 375p.

22. Burton KA. Study of the Condition and Mechanism of the Diphenilamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. *Biochem. J.* 1956;62:315-323.
23. Craig HR, Stitzel RE. *Farmacologia Médica*. México: Interamericana, 1985. 2082p.
24. Goodman A, Goodman L. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 7a. ed. México: Panamericana, 1986. 1725p.
25. Ehrenkranz RA, Ackerman BA. Metoclopramide Effect on Faltering Milk Production by Mothers of Premature Infants. *Pediatrics*. 1986;78:614-620.
26. Nash D. *Flora de Guatemala*. E.U.A.: Vols. 30, Vol 24 Parte 7, 1976. 391p.
27. *Atlas of Medicinal Plants of Middle America*. Miami: Thomas Morton. 1981. Vols. 2, Vol 1, 1981. 720p.
28. Rojas U. *Elementos de Botánica General*. Tomo I-III Guatemala: Tipografía Nacional, 1936. 2350p.
29. Rosergarten FA. Neglected Mayan Galactagogue. *Ixbut Euphorbia lancifolia*. Botanical Museum Leaflets Harvard University Cambridge. Ma E.U.A. Vols. 28, Vol 26, 1978. 80p. (p9-10).
30. López AC. Determinación de la Acción de Euphorbia lancifolia como una Planta Medicinal Galactogoga. Guatemala: Universidad del Valle de Guatemala, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias y Humanidades) 1991. 92p.

31. Standley P. Steodermark J. Flora de Guatemala. Chicago:  
Chicago Natural History Museum. Vols 25. Vol 24 part  
4. 1949. 440p.
32. Riordan J. A Practical Guide to Breastfeeding. E.U.A.:  
Sales. 1991. 383p.
33. Simopoulos AP. Selected Vitamins, Minerals and Functional  
Consequences of Maternal Malnutrition. Switzerland:  
Karger, 1991.182p.

XIII. ANEXOS

Tabla A

Concentración de ADN en ug/ml

#/tratamiento	agua	azúcar	metoclopramida	ixbut
1	160.5	78.0	154.0	298.9
2	131.2	192.3	169.1	107.1
3	132.0	113.0	196.0	159.0
4	-----	193.0	134.0	143.2
5	-----	176.0	113.3	176.0
<u>6</u>	<u>-----</u>	<u>144.0</u>	<u>227.6</u>	<u>170.0</u>
X	141.2	139.5	167.2	184.0
S ±	16.7	46.7	41.6	65.2

**Tabla B**  
**Peso en gramos de las Ratas**

#	T R A T A M I E N T O S							
	agua		azúcar		metoclopramida		ixbut	
	wi*	wf*	wi	wf	wi	wf	wi	wf
1	320.0	323.0	328.1	331.0	311.5	321.4	336.1	324.5
2	286.0	306.6	314.6	338.3	297.8	295.0	297.6	308.4
3	261.0	269.9	385.1	299.4	287.9	296.9	261.1	272.7
4	----	----	331.6	338.2	263.5	265.1	283.2	297.2
5	----	----	273.5	282.9	330.4	315.3	305.4	312.2
6	----	----	321.6	309.7	322.7	331.6	283.2	286.4
X	289.0	299.8	380.0	369.3	302.3	304.2	294.4	300.0
St	29.6	27.2	38.6	28.9	24.5	23.8	25.4	18.7

\*wi= peso al inicio del tratamiento

\*wf= peso al final del tratamiento

**Tabla C**  
Peso de Camada en Gramos

---

T R A T A M I E N T O S

---

#	agua	azucar	metoclopramida	ixbut
1	302.5	305.8	317.8	308.9
2	265.3	316.9	285.7	308.7
3	267.2	272.3	317.7	266.4
4	-----	311.7	299.4	305.2
5	-----	302.7	353.6	291.1
6	-----	318.5	306.0	299.1
X	278.3	305.1	313.4	296.6
S ±	20.9	16.9	23.1	16.2

---

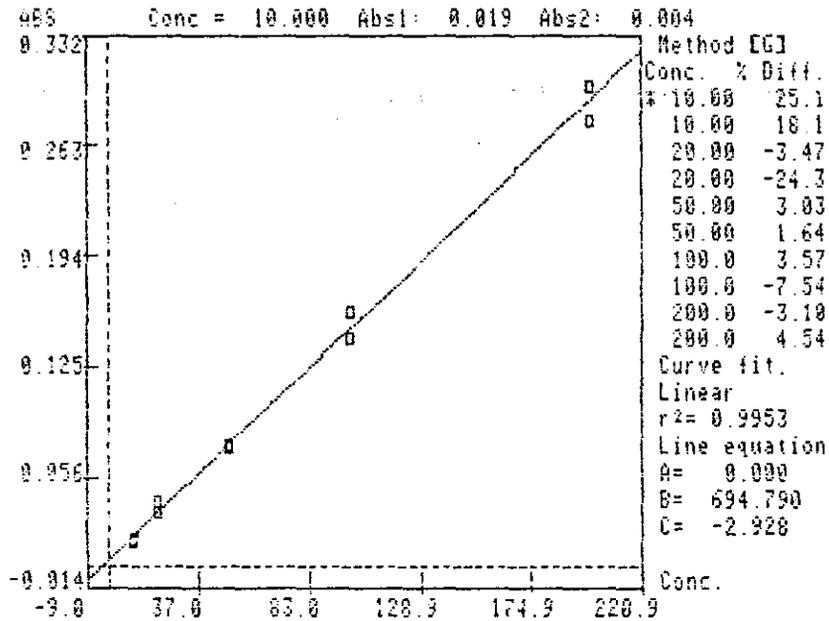
Tabla D

Peso de Glándula mamaria en gramos

T R A T A M I E N T O S				
#	agua	azúcar	metoclopramida	ixbut
1	4.4	5.9	6.2	5.9
2	4.8	4.0	4.9	4.7
3	4.1	5.9	7.2	8.2
4	---	6.0	5.5	6.4
5	---	5.8	5.7	6.1
6	---	5.8	5.6	4.7
X	4.4	5.6	5.8	6.0
S ±	0.35	0.77	0.78	1.30

Gráfica No. 1

CURVA ESTÁNDAR DE ADN



LABORATORIO DE ANALISIS UNIFICADO  
RESULTADOS DE ANALISIS

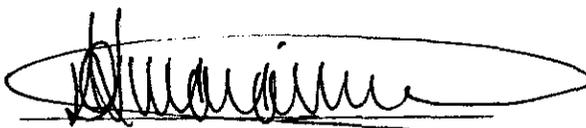
SINGLE COMPONENT ANALYSIS:

Method : DETER. ADN  
Data file : TEJIDO DE GLANDULA MAMARIA  
Units : ug/ML  
W/length 1: 595.0 nm W/length 2: 650.0 nm

STANDARDS DATA

Type of line fit : linear fit.  
Equation of calibration curve :  
Conc. = ( 694.7969000)X + (-2.9281000)  
r<sup>2</sup>= 1.0

No.	Conc.	ABS 1	ABS 2
1	10.0000	0.019	0.004
2	10.0000	0.033	0.017
3	20.0000	0.045	0.011
4	20.0000	0.059	0.019
5	50.0000	0.103	0.029
6	50.0000	0.106	0.031
7	100.000	0.207	0.064
8	100.000	0.227	0.068
9	200.000	0.428	0.127
10	200.000	0.395	0.116



DENNYA MARIA GUARAN MIJANGOS

*por* Juan de Dios Calle

Dr. MIGUEL ANGEL ORTIZ

Asesor

Juan de Dios Calle

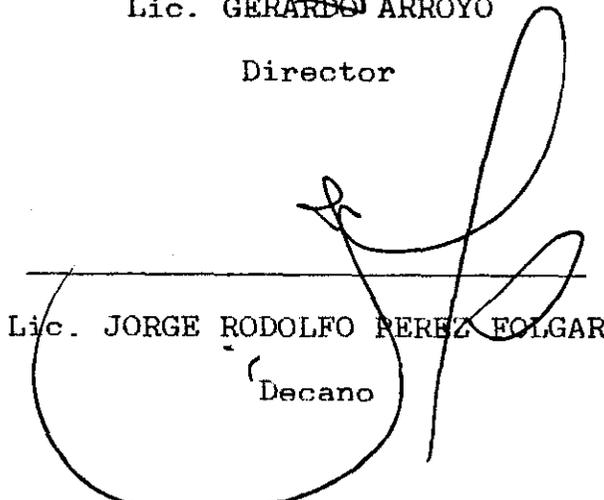
Dr. JUAN DE DIOS CALLE

Asesor



Lic. GERARDO ARROYO

Director



Lic. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR

Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central