

EFFECTO DEL ÁCIDO γ -AMINO BUTÍRICO Y DE LA β -ALANINA EN LA ESTRUCTURA DEL ADN EN SOLUCION SALINA

J. A. Bertolotto, M. G. Campo, P. R. Gradilone*

*Departamento de Física - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de La Pampa
Uruguay 151 - (6300) - Santa Rosa (LP) - Argentina.
e-mail: paola@exactas.unlpam.edu.ar*

La presencia de efectores osmóticos tales como β -alanina y ácido γ -aminobutírico en una solución acuosa modifica ϵ , la permitividad de la solución. En este trabajo se estudia la modificación de la anisotropía de polarizabilidad eléctrica $\Delta\alpha^E$ del ADN sonificado y fraccionado en solución salina en función de ϵ , dado que $\Delta\alpha^E$ es altamente dependiente de la estructura iónica que rodea al polielectrolito. Se utilizan para ello mediciones de birrefringencia eléctrica, y se contrastan los resultados con las teorías de Mandel, Oosawa, Manning y Fixman. Se observa que el aumento de la constante dieléctrica produce un aumento de $\Delta\alpha^E$ que coincide cualitativamente con las teorías de Oosawa, Manning y Fixman. El aumento de ϵ produce un alejamiento de los contraiones de la superficie del ADN y el consecuente aumento de su polarizabilidad. La teoría de Mandel no describe fehacientemente el comportamiento de $\Delta\alpha^E$ con ϵ , dado que no considera la interacción entre contraiones ligados. Estas conclusiones son válidas para fuerzas iónicas bajas, donde la fracción de contraiones ligados γ depende sólo del parámetro de densidad de carga ξ .

The presence of osmotic effectors such as β -alanine and γ -aminobutyric acid on an aqueous solution modifies ϵ , the permittivity of the solution. Assuming that the electric polarizability anisotropy $\Delta\alpha^E$ is highly dependent on the ionic structure that surrounds a polyelectrolyte, we have studied the variation of $\Delta\alpha^E$ of fractionated sonicated DNA on aqueous solution as a function of ϵ , using measurements of electric birefringence. The results obtained are compared with the theoretical predictions of Mandel, Oosawa, Manning and Fixman. We have observed that an increase of the dielectric constant causes an increase of $\Delta\alpha^E$ that qualitatively coincides with the Oosawa, Manning and Fixman theories. The counterions separate from the DNA surface raising the values of polarizability, as a consequence of the increase of ϵ . As the Mandel theory does not consider the bounded counterions interaction, it does not faithfully describe the behaviour of $\Delta\alpha^E$ with ϵ . The present conclusions are valid only at low ionic strengths, where the fraction of bounded counterions γ depends just on the charge density parameter ξ .

1. INTRODUCCIÓN

Los efectores osmóticos son componentes orgánicos que previenen modificaciones estructurales en la cromatina intracelular inducidas por cambios en la concentración de iones orgánicos dentro de la célula. La importancia del estudio de la influencia de efectores osmóticos tales como la glicina, β -alanina y ácido 4-aminobutírico, sobre la condensación y precipitación del ADN tiene un alto interés biológico y físico, ya que permite obtener información acerca de los procesos de condensación y decondensación in vivo del mismo, y además explicar el mecanismo de resistencia de las células al estrés osmótico.

Buche, A., Colson, P. y Houssier, C.⁽¹⁾, estudian el efecto de osmolitos orgánicos sobre la solubilidad de la cromatina y su influencia sobre la estabilidad del ADN e interacciones ADN-histonas. Estos concluyen que la glicina se incluye dentro de los llamados componentes zwitteriónicos junto con la prolina y taurina, que son aquellos que producen un alejamiento de los iones sodio de la superficie del ADN.

Posteriormente, Flock S., Labarbe, R., y Houssier, C.⁽²⁾, investigan los efectos de los

componentes zwitteriónicos y de la fuerza iónica sobre la precipitación del ADN inducida por espermina. Como resultado general obtienen que la presencia de tales componentes disminuye la agregación observada en el ADN para concentraciones dadas de NaCl. En sus conclusiones indican que, dado que tales componentes incrementan la constante dieléctrica (y la permitividad) de la solución, de acuerdo con la teoría de condensación de contraiones de Manning⁽⁵⁾, esto corresponde a una disminución en la fracción de cargas fosfato neutralizadas, disminuyendo por esta causa la interacción de los polímeros cargados con los contraiones. A causa de esto, la carga neta del polielectrolito aumenta, haciendo de esta manera más difícil la agregación.

La relación entre la permitividad ϵ , la fracción de contraiones ligados γ , y la anisotropía de polarizabilidad eléctrica $\Delta\alpha^E$ está descrita por varias teorías, entre ellas la de Mandel⁽³⁾, Oosawa⁽⁴⁾, Manning⁽⁵⁾ y Fixman⁽⁶⁾ que se encuentran resumidas en el trabajo de Elías, J. y Eden, D.⁽⁷⁾. Utilizando las técnicas de birrefringencia y dicroísmo eléctricos, Elías et al. estudian la modificación de $\Delta\alpha^E$ para diferentes longitudes de ADN y diferentes concentraciones de

contraiones, contrastando sus resultados con lo previsto por cada una de las teorías citadas.

En este trabajo se realiza el estudio de la polarizabilidad eléctrica del ADN en presencia de β -alanina y ácido γ -aminobutírico a diversas concentraciones, utilizando la técnica de birrefringencia eléctrica.

II. SECCIÓN TEÓRICA

Modelo para el ADN sonificado.

Las propiedades electro-ópticas del polielectrolito ADN provienen de la interacción de su momento dipolar eléctrico con el campo eléctrico, y de la anisotropía de polarizabilidad óptica.

Se utiliza un modelo de varilla cilíndrica rígida, con un diámetro de 24 Å. El modelo reproduce las características eléctricas del ADN por medio de la anisotropía de la polarizabilidad eléctrica:

$$\Delta\alpha^E = \alpha_{33}^E - \alpha_{11}^E \quad (1)$$

donde α_{33}^E es la polarizabilidad eléctrica del eje longitudinal y α_{11}^E la polarizabilidad eléctrica sobre el eje transversal de la varilla.

La varilla se caracteriza además mediante la anisotropía de la polarizabilidad óptica:

$$\Delta\alpha^O = \alpha_{33}^O - \alpha_{11}^O \quad (2)$$

Cálculo de la anisotropía de la polarizabilidad eléctrica.

A campos eléctricos débiles ($E^2 \rightarrow 0$), se cumple la llamada ley de Kerr:

$$\Delta n = K_{Kerr} E^2 \quad (3)$$

donde K_{Kerr} es la constante de Kerr, Δn la birrefringencia eléctrica y E el campo eléctrico aplicado.

$$\Delta n = \frac{2\pi c_1}{n} \Delta\alpha^O \Phi \quad (4)$$

con

$$\Phi = \int_0^\pi f(\theta) (3 \cos^2 \theta - 1) \sin \theta \cdot d\theta \quad (5)$$

donde θ es el ángulo entre el eje longitudinal de la partícula y el campo eléctrico, c_1 la concentración del polielectrolito por unidad de volumen, y $f(\theta)$ la función de distribución de orientación angular:

$$f(\theta) = \frac{e^{-\frac{U}{kT}}}{\int_0^\pi e^{-\frac{U}{kT}} 2\pi \sin \theta \cdot d\theta} \quad (6)$$

siendo U la energía electrostática:

$$U = -\frac{1}{2} (\alpha_{33}^E - \alpha_{11}^E) E^2 \cos^2 \theta \quad (7)$$

Para el cálculo de la anisotropía de la polarizabilidad eléctrica, de acuerdo con la teoría de O'Konski et al. ⁽⁸⁾, se utiliza la fórmula:

$$K_{Kerr} = \frac{\Delta n_s (\alpha_{33}^E - \alpha_{11}^E)}{15kT} \quad (8)$$

donde Δn_s es la birrefringencia de saturación a campos elevados (Δn para $E \rightarrow \infty$).

Determinación de la longitud de la molécula

El decaimiento de la birrefringencia eléctrica al suprimir el campo eléctrico de una solución monodispersa de moléculas rígidas está dada por:

$$\frac{\Delta n}{(\Delta n)_{t=0}} = e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (9)$$

donde $(\Delta n)_{t=0}$ es la birrefringencia a campo eléctrico nulo, y τ el tiempo de relajación y $\Theta = \frac{1}{6\tau}$, donde Θ es la constante de difusión rotacional.

La constante de difusión rotacional se relaciona con la longitud de la partícula de acuerdo con la ecuación de Broesma ⁽⁹⁾:

$$\Theta = \frac{3kT}{8\pi\eta a_1^3} \left[\frac{\ln 2p - 1,57}{7 \left(\frac{1}{\ln 2p} - 0,28 \right)^2} \right] \quad (10)$$

donde η es la viscosidad del solvente, p el radio axial y a_1 la mitad de la longitud de la partícula.

Polarizabilidad eléctrica.

Existen varias teorías que intentan explicar la polarizabilidad eléctrica del ADN observada experimentalmente ⁽⁸⁾⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾. De acuerdo al modelo adoptado pueden clasificarse en dos grandes grupos: a) Las que modelan al ADN con un momento dipolar eléctrico permanente y otro inducido, b) aquellas que consideran que solo posee momento dipolar inducido debido al movimiento de contraiones que lo rodean. En este análisis consideraremos un conjunto de este último grupo.

Mandel ⁽³⁾ utiliza un modelo de distribución discreta de cargas en el polielectrolito, donde la polarizabilidad eléctrica tiene la siguiente expresión:

$$\Delta\alpha = \frac{\gamma z e_0^2 N L^2}{12kT} \quad (11)$$

donde L es la longitud de la varilla, N es la cantidad de grupos cargados, γ la fracción de contraiones ligados, e_0 la carga del electrón, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y z la valencia de los contraiones. Dado que este tratamiento desprecia la repulsión contraión-contraión, se observa que la polarizabilidad aumenta con la cantidad de contraiones ligados. Mediante la ec. (11) se obtiene que la polarizabilidad depende del cubo de la longitud del cilindro.

A partir de la teoría de polielectrolitos desarrollada por Oosawa ⁽⁵⁾, y utilizando un modelo de doble fase para describir la distribución de contraiones alrededor del macroión, la anisotropía de polarizabilidad eléctrica queda expresada por:

$$\Delta\alpha = \frac{\gamma z e_0^2 N L^2}{12kT} \left(\frac{1}{1 + A \ln \left(\frac{R}{a} \right)} \right) \quad (12)$$

donde $A = 2z^2 \gamma e_0^2 / (\epsilon k T (RPB))$, RPB es el espacio entre cargas, R es el radio del volumen libre cilíndrico y a es

* Las expresiones de $\Delta\alpha$ de las diferentes teorías están expresadas en CGS.

el radio de la fase cilíndrica de contraiones alrededor del macroión.

Manning⁽⁴⁾ trata el problema de polarización iónica en términos de los parámetros de densidad de carga y de apantallamiento de Deybe-Hückel. Su resultado es similar a la expresión de Mandel, con la misma dependencia en la longitud, pero difiere en el hecho que la fracción de contraiones ligados se determina teóricamente, y ésta tiene una dependencia explícita con la fuerza iónica.

$$\Delta\alpha = \frac{\gamma z e_0^2 N L^2}{12 k T} \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{2\gamma}{1-\gamma} \right) \ln \left(\frac{L}{N \kappa^{-1}} \right)} \right) \quad (13)$$

Donde $\kappa^{-1} = \left(4\pi e_0^2 I / \epsilon k T \right)^{1/2}$ es la longitud de Deybe, $\xi = e_0 / \epsilon k T b$ el parámetro de densidad de carga, b el espacio entre grupos cargados,

$$\gamma = \left(1 - |z|^{-1} \xi^{-1} \right) \quad (14)$$

la fracción de contraiones ligados, y $|z|^{-1} \xi^{-1}$ la fracción de carga neutralizada.

Finalmente, la polarizabilidad según la teoría desarrollada por Fixman⁽⁶⁾, se expresa en la siguiente ecuación:

$$\Delta\alpha = \frac{q_1 K d}{(q_1 - q_2) \rho^2} \left[1 - \left(\frac{\tan \left(\frac{\rho L}{2} \right)}{\rho L / 2} \right) \right] \quad (15)$$

donde q_1 y q_2 son las cargas de los contraiones y los

coiones, $K = \left[2 \ln \left(\frac{4L}{d} \right) - \frac{14}{3} \right]^{-1}$, $\rho = \sqrt{\frac{4\pi c_2 K}{\epsilon_n}}$, siendo c_2

la concentración de contraiones y ϵ_n el número de contraiones en equilibrio por unidad de longitud. La ec. (15) predice una dependencia cuadrática de la polarizabilidad con la longitud de la molécula.

III. SECCION EXPERIMENTAL

a. Materiales y métodos

Muestra de ADN

Se utilizó ADN de timo de ternera altamente polimerizado de laboratorios SIGMA, tipo I, cat. D1501, de peso molecular 1.10^6 Dalton. Se realizó la sonicación de la solución utilizando un procedimiento similar al descrito por Fukudome et al.⁽¹⁰⁾. Para las experiencias de birrefringencia eléctrica se utilizó una concentración de ADN de 10 mg/dl, en solución de 1 mM de NaCl.

Se dividió la muestra de ADN obtenida en quince muestras a las que se les agregó β -alanina y ácido γ -aminobutírico marca Sigma en estado sólido en diferentes concentraciones: ADN sin β -alanina (β -Ala00); con 0,4 M (β -Ala04); con 0,8 M (β -Ala08); con 1,2 M (β -Ala12); con 1,6 M (β -Ala16); ADN sin ácido γ -aminobutírico (γ -But 00); con 0,1 M (γ -But 01); con 0,2 M (γ -But 02); con 0,3 M (γ -But 03); con

0,4 M (γ -But 04). La adición de β -alanina y ácido γ -aminobutírico produjo aumentos de la permitividad de la solución, a razón de 35 y 51 respectivamente⁽¹⁾⁽²⁾.

Equipo experimental

Las mediciones de birrefringencia eléctrica se realizaron utilizando el equipo diseñado en nuestro laboratorio⁽¹¹⁾, que consta de una fuente de luz monocromática y plano-polarizada, un generador de pulsos Velonex con el cual se aplican campos de hasta 21 kV/cm, celda de Kerr de 0,15 cm de distancia entre placas y 1 cm de camino óptico, lámina cuarto de onda, analizador, fotomultiplicador y osciloscopio.

Determinación de la birrefringencia eléctrica en función del campo eléctrico.

Se denomina I_δ a la intensidad luminosa que llega al fotomultiplicador:

$$I_\delta = \frac{I_0}{4} [1 - \cos(2\alpha + \delta)] \quad (11)$$

La expresión para la birrefringencia eléctrica de la muestra que se encuentra dentro de la celda de Kerr, se relaciona con δ mediante la expresión:

$$\Delta n = \frac{\delta \lambda}{2\pi l} \quad (12)$$

donde l es el espesor de la celda de Kerr, δ es el retardo óptico de la solución y λ es la longitud de onda de la luz empleada.

La expresión completa para determinar Δn a partir de las señales de fotocorriente registradas ΔI_δ e I_α , teniendo en cuenta la luz dispersada en los componentes ópticos del sistema es:

$$\left(\frac{\Delta I_\delta}{I_\alpha} \right) \left(1 + \frac{K_{SL}}{\sin^2 \alpha} \right) = \frac{[\cos(2\alpha + \delta_0) - \cos(2\alpha + \delta + \delta_0)]}{[1 - \cos(2\alpha + \delta_0)]} \quad (13)$$

donde ΔI_δ es el cambio de intensidad luminosa que se produce por la aplicación del campo eléctrico, α es el ángulo de inclinación del eje del analizador respecto del polarizador, I_α la intensidad emergente en ausencia del campo eléctrico, δ_0 la birrefringencia residual de la celda de Kerr, y K_{SL} un parámetro que depende de la luz dispersada por los componentes ópticos del sistema. Una descripción detallada es desarrollada por Fredericq et al.⁽¹²⁾.

b. Resultados

Determinación de la longitud del ADN

Los tiempos de relajación de cada muestra se obtuvieron mediante el ajuste de las curvas de decaimiento con la ec. (9) de la birrefringencia, utilizando el software ORIGIN. El campo eléctrico aplicado fue del orden de 2,5 kV/cm y la duración de los pulsos de alrededor de 0,2 ms.

Debe tenerse en cuenta que las cadenas de ADN mayores a su longitud de persistencia (entre 1420 y 1480 Å) son flexibles. Sin embargo de acuerdo con los resultados de Houssier⁽¹³⁾ y Stellwagen⁽¹⁴⁾, el modelo de varilla rígida a partir del cual se deduce la ec. (10) de Broesma es válido para longitudes de cadena de hasta 1700 Å, si se utiliza el mayor tiempo de relajación

Tabla 1

Muestra de ADN	τ (μ s)	L (Å)
β -Ala00	36.67	1474.32
β -Ala04	38.26	1497.83
β -Ala08	40.86	1534.97
β -Ala12	43.91	1576.65
β -Ala16	44.12	1579.46
γ -But 00	36.67	1474.32
γ -But 01	39.20	1511.44
γ -But 02	37.61	1488.30
γ -But 03	37.29	1483.56
γ -But 04	33.66	1427.94

obtenido en el ajuste del decaimiento. La Tabla 1 muestra los tiempos de relajación τ , obtenidos de esa manera y el valor de L a partir de la ec. (10).

Puede observarse que los valores de L obtenidos se encuentran dentro del rango para el cual la aproximación realizada es válida.

Utilizando los gráficos de $\Delta n(E^2)$, para $E < 200$ kV/cm, se obtienen las constantes de Kerr para las diferentes muestras utilizadas. A fin de obtener Δn_s , se trazan las curvas de Δn ($1/E^2$) para $1/E^2 \rightarrow 0$.

Con el procedimiento descrito se hallan los valores de anisotropía de polarizabilidad eléctrica $\Delta\alpha^E$ para cada una de las muestras, utilizando la ec. (8). En la Tabla 2 se indican los valores de Δn_s , K_{Kerr} y $\Delta\alpha^E$ para las diferentes muestras.

Tabla 2

Muestra de ADN	$\Delta n_s \cdot 10^6$	$K_{Kerr} \cdot 10^7$ (cm/statvolt) ⁻²	$\Delta\alpha^E$ $\cdot 10^{16}$ cm ³
β -Ala00	7.79894	7.455326	5.20966
β -Ala04	7.59694	7.69092	5.1872
β -Ala08	7.44065	8.53528	6.25325
β -Ala12	7.10980	9.07216	6.95588
β -Ala16	6.81471	9.35679	7.48477
γ -But 00	8.50015	7.47830	4.79596
γ -But 01	7.48235	6.56057	4.77972
γ -But 02	6.59323	6.24116	5.16019
γ -But 03	5.70890	5.45063	5.20467
γ -But 04	5.59488	5.64379	5.49894

La anisotropía de polarizabilidad eléctrica en función de la permitividad de la solución se muestra en las Figuras 1 y 2 para la β -alanina, y las Figuras 3 y 4 para el ácido γ -aminobutírico. Se las compara con las predicciones teóricas de Mandel (ec. (11)), Manning (ec. (12)), Oosawa (ec. (13)) y Fixman (ec. (15)), las que fueron multiplicadas por un factor de corrección χ para igualar la polarizabilidad obtenida teóricamente a $\epsilon = 80$ de los valores experimentales.

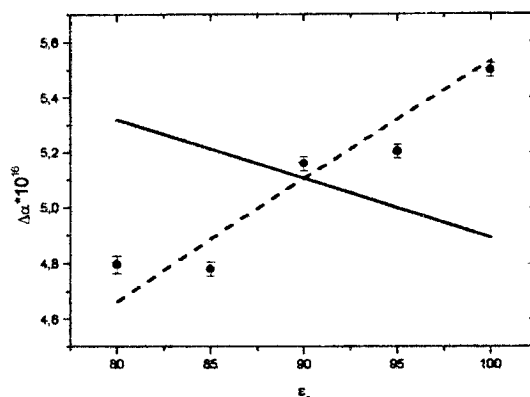


Figura 1: Comparación de los valores experimentales de $\Delta\alpha^E$ de las muestras de ADN más ácido γ -aminobutírico, con $\Delta\alpha$ teórica obtenida mediante las teorías de Manning (—) y de Mandel (---).

Para los cálculos teóricos se utiliza la longitud de cadena $L=1533$ Å, igual al valor medio de las longitudes de la tercera columna de la Tabla 1.

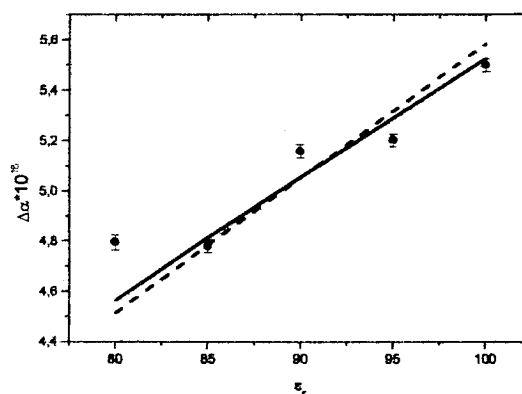


Figura 2: Comparación de los valores experimentales de $\Delta\alpha^E$ de las muestras de ADN más ácido γ -aminobutírico, con $\Delta\alpha$ teórica obtenida mediante las teorías de Oosawa (---) y de Fixman (—).

El valor de γ que se obtiene utilizando la teoría de Manning (ec. (14)), donde γ sólo depende de ξ para fuerzas iónicas bajas (como es nuestro caso), se utilizó como parámetro para las expresiones de $\Delta\alpha$ de Mandel (ec. (11)) y Oosawa (ec. (13)).

$\Delta\alpha(\epsilon)$ para la teoría de Mandel se calcula además utilizando los siguientes parámetros: $T=300$ K; $z = 1$ (carga del Na^+) y $b = 1.7$ Å (distancia entre grupos fosfato en el ADN completamente ionizado). Como se muestra en las Figuras 1 y 3 esta teoría predice una disminución de la polarizabilidad que no se condice con los resultados experimentales obtenidos. De acuerdo con la ec. (11) la polarizabilidad es proporcional a γ y por lo tanto disminuye con ϵ .

Utilizando el modelo de dos fases propuesto por Oosawa, también se obtiene una descripción correcta del comportamiento cualitativo de la anisotropía de polarizabilidad eléctrica con ϵ . A fin de contrastar la teoría con los datos experimentales, se calculo R (radio del volumen libre cilíndrico) a partir

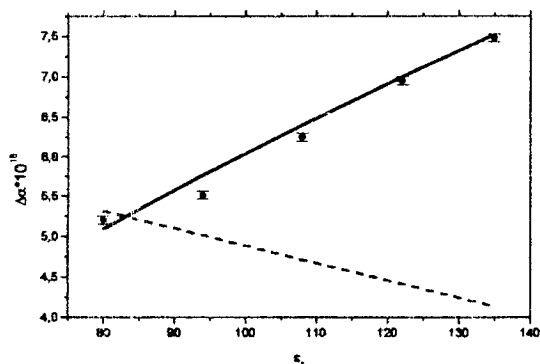


Figura 3: Comparación de los valores experimentales de $\Delta\alpha^E$ de las muestras de ADN más β -alanina, con $\Delta\alpha$ teórica obtenida mediante las teorías de Manning (—) y de Mandel (---).

de la concentración de ADN utilizada de 10 mg/dl con lo cual $R \approx 975 \text{ \AA}$. La distancia entre cargas RPB se calculó en función de γ ($RPB = \gamma L / b$). La teoría no indica la dependencia explícita de a con la concentración de contraiones, por lo cual hemos adoptado a como parámetro (7 \AA).

Se observa que $\Delta\alpha(\epsilon)$ obtenida a partir de la teoría de Fixman posee también concordancia con los resultados experimentales obtenidos. Se utilizó $d = 24 \text{ \AA}$ (diámetro del polielectrolito cilíndrico) $q_1 = -q_2 = +e_0$ que representan la carga de los grupos fosfato y de los contraiones Na^+ respectivamente.

IV. CONCLUSIÓN

Se considera que la diferencia cuantitativa entre los valores de $\Delta\alpha$ teóricos y los experimentales se deben a una contribución de la interacción entre contraiones que no ha sido considerada en el planteo teórico⁽⁷⁾. A fin de realizar una comparación cualitativa, ésto se corrige introduciendo el factor de corrección χ .

Se halla entonces, una concordancia cualitativa entre las predicciones de las teorías de Manning, Oosawa y Fixman respecto a $\Delta\alpha$, la anisotropía de polarizabilidad eléctrica, y los resultados experimentales obtenidos.

Como puede observarse en la ec. (14) la teoría de Manning predice una disminución de γ con ϵ . Este comportamiento de $\gamma(\epsilon)$ puede explicarse a partir de la consideración de que el aumento de la concentración de glicina en la solución, y el consiguiente aumento de la permitividad de la misma, produce un alejamiento de los contraiones de la superficie del ADN. A partir de esto, el comportamiento de la polarizabilidad eléctrica en función de la permitividad del medio puede describirse cualitativamente como sigue:

La polarizabilidad eléctrica del polielectrolito indica la facilidad relativa con que las cargas de signos opuestos pueden separarse inducidas por un campo eléctrico, y producir un dipolo eléctrico. En un análisis simple se puede considerar que bajo condiciones de equilibrio, los contraiones se encuentran quietos

ubicados en los sitios cargados del ADN. Cuando se introduce un campo eléctrico los contraiones migran desde la posición

donde se encuentran formando una nueva configuración de equilibrio, la cual está determinada por el campo electrostático local. Este campo electrostático local se debe en parte a la repulsión entre contraiones adyacentes. Así, cuando la concentración de contraiones ligados disminuye, también disminuyen las fuerzas de repulsión contraión-contraión produciéndose un mayor desplazamiento de cargas, y un consecuente momento dipolar eléctrico inducido mayor.

Este conjunto de resultados coincide cualitativamente con resultados previamente obtenidos por este grupo para otro efector osmótico: la glicina¹⁹.

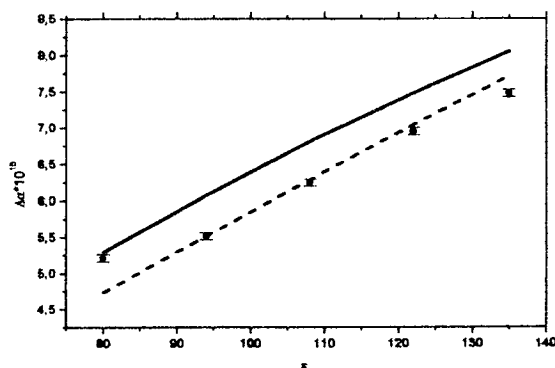


Figura 4: Comparación de los valores experimentales de $\Delta\alpha^E$ de las muestras de ADN más β -alanina, con $\Delta\alpha$ teórica obtenida mediante las teorías de Fixman (—) y de Oosawa (---).

V. REFERENCIAS

1. Buche, A., Colson, P., Houssier, C., J. of Biomolecular Structure & Dynamics, 1990, 13, 601.
2. Flock, S., Labarbe, R., Houssier, C., Biophysical J., 1996, 70, 1456.
3. Mandel, M., Mol. Phys., 1961, 4, 489.
4. Oosawa, F., "Polyelectrolytes", 1971, Marcel Dekker Inc., New York.
5. Manning, G., Biophys. Chem., 1978, 9, 65.
6. Fixman, M., J. Chem. Phys., 1980, 72, 5177.
7. Elias, J., Eden, D., Macromolecules, 1981, 14, 410.
8. O'Konski, C., Yoshioka, K., Orttung, H., J. Phys. Chem., 1959, 63, 1558.
9. Broesma, S., J. Chem. Phys., 1963, 32, 1626.
10. Fukudome, K., Yamaoka, K., Nishikori, K., Takahashi, T., Yamamoto, O., Polymer J., 1986, 18, 81.
11. Bertolotto, J., Willging, P., Pugnali, L., Bustos, H., Anales AFA, 1993, 5, 486.
12. Fredericq, E., Houssier, C., "Electric Dichroism and electric Birefringence", Clarendon Press, Oxford, 1973.

13. Houssier, C., "Molecular Electro-Optics", 1981, Plenum Press, New York, 363.
14. Stellwagen, N., Biopolymers, 1981, 20, 399.
15. Yoshioka, K., J. Chem. Phys., 1983, 79, 3482.
16. Yamaoka, K., Fukudome, K., J.Chem.Phys. 1988, 92, 4994.
17. Yoshioka, K., J.Chem.Phys., 1987, 86, 491.
18. Porschke, D., Biophys. Chem., 1944, 49, 127.
19. Campo, M.G., Bertolotto, J.A., Gradilone, P.R., Anales AFA, 1999, 11, 297.