

ACIDOS NUCLEICOS EN *FASCIOLA HEPATICA*  
Y *DICROCOELIUM DENDRITICUM* (TREMATODA)

QUILES, M. J.; LÓPEZ-LÓPEZ, M. C.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M.

Unidad de Fisiología y Bioquímica del Instituto «López-Neyra»  
de Parasitología. C.S.I.C. Granada  
(Recibido el 23 de Mayo de 1984)

SUMMARY

In the present study have been determined quantitatively DNA and RNA of *Fasciola hepatica* and *Dicrocoelium dendriticum*. The RNA/DNA ratio is 2.40 for *F. hepatica* and 1.55 for *D. dendriticum*. The variables that have been examined were: homogenation time, temperature and time of DNA extraction and samples stability by store at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 6 month.

Key Words: DNA, RNA, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*.

RESUMEN

Se determinan cuantitativamente DNA y RNA en *Fasciola hepatica* y *Dicrocoelium dendriticum*. La relación RNA/DNA es 2,40 para *F. hepatica* y 1,55 para *D. dendriticum*. Se estudia la influencia del tiempo de homogeneización, así como la temperatura y tiempo óptimo de extracción del DNA en medio ácido, comprobándose la estabilidad de las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses.

Palabras Clave: DNA, RNA, *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*.

INTRODUCCION

Hutchinson y Munro<sup>3</sup> hacen una revisión bibliográfica de los métodos de extracción y determinación cuantitativa de los ácidos

nucleicos en diversos sistemas biológicos, sugiriendo una modificación al procedimiento de Schmidt y Thannhauser<sup>7</sup>. Wannemacher y col.<sup>9</sup> introducen algunas variaciones para poder determinar conjuntamente proteínas y ácidos nucleicos, pero algunos autores han señalado pérdidas de estos componentes durante la extracción lipídica inicial. Con objeto de evitar estas pérdidas, nosotros hemos seguido en el presente trabajo la técnica propuesta por Shibko y col.<sup>8</sup>, modificada por Sánchez Rasero<sup>6</sup>, considerando necesario establecer previamente, para cada parásito, los tiempos óptimos de homogeneización y de extracción como indican Rafael y Vsiansky<sup>5</sup>.

## MATERIAL Y METODOS

### Preparación de la muestra

Ejemplares de *Fasciola hepatica* y *Dicrocoelium dendriticum* son recogidos del tejido hepático de los hospedadores *Ovis aries* y *Capra hircus*. Comprobada su vitalidad se lavan en solución salina al 0,9 % y agua destilada. A continuación se secan ligeramente sobre papel de filtro, se pesan y se procede a su homogeneización, en baño de hielo, con Potter-Elvehjem o almacenamiento en arcón Revco a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En este último caso los parásitos son introducidos en viales de cristal convenientemente cerrados.

### Extracción de DNA y RNA

Seguimos básicamente la técnica indicada<sup>6,8</sup>. Se ensayan diversos tiempos de homogeneización (5, 10, 15 y 20 minutos), así como diferentes tiempos de extracción del DNA (30, 60 y 90 minutos) en medio ácido (PCA 5 %, pH=2,5) y temperaturas (70 y 90° C). La lectura espectrofotométrica se realiza en un Beckman DBG a 260 y 280 nm. Como solución patrón de ácido nucleico se utiliza la sal sódica del ácido desoxirribonucleico de timo de ternera de la casa Sigma, preparado en medio ácido semejante al de extracción del DNA.

### Determinación proteica

El examen del contenido proteico ha sido realizado empleando el método de Lowry y col.<sup>4</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Condiciones óptimas de homogeneización

Previamente a la determinación cuantitativa ensayamos diversos tiempos de homogeneización, debiendo ser el mínimo necesario para facilitar la posterior extracción de los ácidos nucleicos sin favorecer posteriores alteraciones enzimáticas de los mismos o interferencias proteicas<sup>1</sup>.

La homogeneización es realizada en medio tamponado (pH 7) y temperatura de 0 °C con el fin de inhibir la acción de nucleasas durante el proceso. Observamos (Tabla I) que un tiempo de cinco minutos es suficiente para *D. dendriticum*, siendo necesarios quince minutos para *F. hepatica*, posiblemente debido a la mayor resistencia que ofrecen los tejidos de este último parásito.

TABLA I

TIEMPO OPTIMO DE HOMOGENEIZACION (mg RNA/g DE PARASITO FRESCO)

Muestra problema	Tiempo de homogeneización			
	5 min	10 min	15 min	20 min
<i>F. hepatica</i>	1,19	2,49	2,65	2,65
<i>D. dendriticum</i>	1,80	1,77	1,79	1,77

### Temperatura y tiempo de extracción del DNA. Determinación cuantitativa

Al utilizar homogeneizados totales e hidrólisis ácida, catalizada por temperaturas no inferiores a 70° C, debemos ajustar las condiciones de trabajo con sumo cuidado, pues un exceso en el aporte externo de energía nos elevaría de forma errónea las cifras de absorción a 260 nm y, consecuentemente, las de ácido desoxirribonucleico. Los valores de la Tabla II indican que una temperatura de 90° C, durante 60 minutos, es suficiente para ambos parásitos. En estas condiciones se obtiene un alto porcentaje de extracción del DNA sin apenas detectarse trazas proteicas y el co-

TABLA II  
TEMPERATURA Y TIEMPO OPTIMO DE EXTRACCION  
(VALORES EXPRESADOS EN % DE ABSORCION  
A 260 RESPECTO A LA MAXIMA)

	N.º ensayos	70° C			90° C			$A_{260}/_{280}$ a 90° C		
		30'	60'	90'	30'	60'	90'	30'	60'	90'
<i>F. hepatica</i>	5	50	70	90	76	90	100	1,61	1,68	1,18
<i>D. dendriticum</i>	5	54	72	81	84	94	100	1,67	1,68	1,22

ciente  $A_{260}/A_{280}$  es 1,68 y entra dentro del rango de los citados por la bibliografía como adecuados 1,65-1,85<sup>1</sup>. Un aumento en el tiempo de incubación (90 minutos a 90° C) produce un considerable incremento de los niveles proteicos, disminuyendo el cociente de absorción 260/280. Condiciones semejantes de extracción han sido empleadas por Erwin y col.<sup>2</sup> en estudios con otros tejidos.

Los niveles totales de RNA son considerablemente superiores a los de DNA para ambos trematodos (Tabla III), siendo la relación RNA/DNA menor en *D. dendriticum* que en *F. hepatica*. No se detectan diferencias en las cifras de ácido nucleico de los parásitos estudiados procedentes de diferente hospedador.

El contenido en proteínas de los sobrenadantes problema tras la extracción alcalina del RNA es prácticamente nulo y despreciable, aunque algo mayor, en los de DNA.

En ambos parásitos no se han detectado pérdidas en la cantidad total de ácidos nucleicos por conservación de los mismos, durante 6 meses, a -80° C (tiempo ensayado por nosotros).

TABLA III  
NIVELES DE DNA Y RNA (EXPRESADOS EN mg/g ± S)  
N.º

	ensayos	DNA	RNA	RNA/DNA
<i>F. hepatica</i> ( <i>Capra hircus</i> )	10	1,06 ± 0,14	2,54 ± 0,36	2,40
<i>F. hepatica</i> ( <i>Ovis aries</i> )	10	1,08 ± 0,13	2,66 ± 0,36	2,46
<i>D. dendriticum</i> ( <i>Capra hircus</i> )	10	1,12 ± 0,16	1,78 ± 0,29	1,59
<i>D. dendriticum</i> ( <i>Ovis aries</i> )	10	1,16 ± 0,19	1,79 ± 0,31	1,54

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo se ha realizado con una subvención de la C.A.I.C.Y.T.

## REFERENCIAS

- Davidson, J.N.—Isolation and characterization of nucleic acids. *The Biochemistry of the nucleic acids*. 8th ed., Chapman and Hall, The Chaucer Press, Great Britain, 1976, 50-82.
- Erwin, B. G.; Stoscheck, Ch. M., and Florini, J. R.—A rapid fluorometric method for the estimation of DNA in cultured cells. *Anal. Biochem.*, 110, 1981, 291-294.
- Hutchinson, W. C., and Munro, H. N.—The determination of nucleic acids in biological material. *Analyst*, 86, 1961, 768-813.
- Lowry, O. H.; Rosbrough, N. J.; Farr, A. L., and Randall, R. J.—Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1951, 265-275.
- Rafael, J., and Vsiansky, P.—Quantitative determination of nucleic acids in brown and white adipose tissues. *Anal. Biochem.*, 115, 1981, 158-162.
- Sánchez Raseró, F.—Ácidos nucleicos en *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 33, 1973, 65-79.
- Schmidt, G., and Thannhauser, S. J.—A method for determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 161, 1945, 83-90.
- Shibko, S.; Koivistoinen, P.; Tratneyek, C. A.; Newhall, A. R., and Friedman, L.—A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Anal. Biochem.*, 19, 1967, 514-528.
- Wannemacher, R. W.; Banks, W. L., and Wunner, W. H.—Use of a single tissue extract to determine cellular protein and nucleic acid concentrations and rate of amino acid incorporation. *Anal. Biochem.*, 11, 1965, 320-326.