



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

OPTIMIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN
GENÓMICO DE ESPERMATOZOIDES DE TORO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARTHA VÁZQUEZ AGUIRRE

TUTOR PRINCIPAL

DR. JAVIER DE JESÚS VALENCIA MÉNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM

COMITÉ TUTORAL

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA - UNAM

DR. SALVADOR URIBE CARBAJAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR – UNAM

MÉXICO, D.F. (MARZO 2014)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dicen que nada en la vida es fácil, y más aún cuando se trata de algo importante, y son todas esas dificultades que se presentan y la superación de las mismas lo que forjan el carácter. También dicen que para la superación de cualquier tipo de contratiempo es necesario tener convicción y una fuente de motivación lo suficientemente poderosa que nos haga vencer cualquier obstáculo... Creo que esas palabras dejaron de ser palabras y las entendí de forma muy especial en el desarrollo de este trabajo que siempre estuvo lleno de dificultades... Por todo lo vivido en este tiempo, dedico el esfuerzo, tiempo y empeño puesto en la realización de este proyecto a mi pequeño gran amigo de toda la vida, porque su recuerdo estuvo presente a cada momento y me fortaleció para seguir adelante, porque con tu dulce alegría, desinteresada e inocente compañía me enseñaste sin darte cuenta el sabor de la felicidad y después me enseñaste que no tengo más opción que siempre ser fuerte y mantenerme firme y leal a mis convicciones. De alguna u otra forma, siempre serás parte de mí, y estarás presente en cada logro, siempre serás la motivación más grande para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que me dieron su apoyo de diversas formas durante la realización de este trabajo: una sonrisa, una palabra de ánimo, críticas constructivas y hasta críticas vacías o destructivas también fueron importantes en todo el proceso.

*En primer lugar, porque sé que existen algo que va más allá de la comprensión humana, le doy gracias a **Dios** permitirme concluir ésta etapa llena de experiencias y enseñanzas.*

*Gracias a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** de la UNAM y por ser mi segundo hogar por 13 años y a todos los profesores que me formaron.*

Y las primeras personas a quienes debo agradecer son mi familia:

A mi madre y a mi padre, porque nada en la vida que yo haga sería posible sin todo el amor y la buena educación que me proporcionaron desde pequeña. Porque me educaron para ser fuerte y responsable y sobreponerme a cualquier contrariedad. Porque con su ejemplo y con el de las historias de mis abuelos me enseñaron a ser valiente y levantarme con la frente en alto para enfrentar las dificultades de la vida. Porque a pesar de todo siempre han creído en mí y han apoyado mis decisiones, porque siempre han estado ahí para animarme en días difíciles y para compartir alegrías. Gracias por quererme y soportarme y protegerme con amor y dedicación por tantos años.

A mi hermanita querida, mi “pequeño mono” que siempre ha tenido un brillo tan especial que ilumina hasta los días más oscuros y siempre me roba sonrisas y alegrías. Por todas las pequeñas pero increíbles aventuras que hemos pasado juntas, y que se quedarán por siempre en mi corazón. Por estar ahí y ser fuerte para cuidarme aunque eres tú la pequeñita de la casa. Tal vez no te das cuenta de lo valiosa y lo valiente que eres, siempre estaré muy orgullosa de ti y de decir que eres mi hermanita. Tienes un “sayayin” dentro, no lo olvides.

A mis abuelos, a mis 2 abuelitos (Don Victor y Don José) y a mis dos abuelitas (Doña Chila y Doña Gloria), porque todos ellos han sido unos guerreros de la vida, valientes y tenaces, son mi más grande ejemplo de lucha y empeño, que nunca se “rajaron” y desde su infancia fueron personas de valores, trabajadores incansables. Gracias por todo su amor y la ternura de su mirada.

Y no puedo olvidar a otros tantos que fueron importantes de alguna u otra forma para el desarrollo y conclusión de esta tesis:

A mis tutores (Dr. Javier Valencia, Dra. Lulú, Dr. Uribe), gracias por aceptarme como su alumna y por sus comentarios, pero sobre todo gracias por luchar para darme la oportunidad de titularme cuando yo ya me había rendido.

A la Dra. Clara Aguillón (Secretaría de Asuntos Escolares del Programa de Posgrado de la FMVZ UNAM) y a la Dra. Marcela Figueroa (Secretaria Académica del Programa de Posgrado de la FMVZ UNAM) y por todo el apoyo que me brindaron para sortear la serie de dificultades administrativas que se presentaron y lograr la conclusión de éste trabajo.

A todos los que me compartieron un poco de sus conocimientos, de su tiempo o hasta una palabra de ánimo para seguir adelante: al Dr. Oscar Gutiérrez pues todo lo que aprendí el cortísimo tiempo que trabajamos en el mismo laboratorio de alguna forma me dio las armas para el diseño de este trabajo; a la Dra. Anita del departamento de Reproducción por su apoyo y su sonrisa que de verdad me levantaba los ánimos; al Dr. Rogelio Alonso del departamento de Genética por abrirme las puertas de su laboratorio una vez más, siempre con la mejor disposición; a la Dra. Icela Palma por sus palabras de apoyo y por creer en mi trabajo.

A todas las personas maravillosas que conocí en mi estancia en Huatulco, porque de verdad me ayudaron a despejarme y retomar una vida más humana, y sin las oportunidades y experiencias vividas con y gracias a ustedes creo que no hubiera recuperado el valor para terminar con éste trabajo. Gracias Chikis por darme la oportunidad de conocer el ambiente profesional de la danza, gracias por darme un espacio para compartir mi arte, gracias por exigirme sin consideraciones, gracias por tus críticas y también por tus palabras de apoyo, gracias por tu amistad. Gracias Misael por tu amistad sincera y por tantos buenos ratos, de diversión y alegría, te traigo en el corazón "Mandrill". Gracias al Sr. Pepe Muller por dejarme ser parte de su equipo y conocer un trabajo tan maravilloso como el de la animación infantil. Gracias Beny por tu amistad y por ser la mejor compañera de trabajo que he tenido en toda mi vida.

A todas las personas que me brindaron una palabra cálida, me tendieron su mano o una sonrisa les doy las gracias.

Pero al igual que hace unos años cuando me titulaba de la licenciatura, no puedo dejar de agradecer a la cultura que yo adopte y que me ha dado los valores más fuertes y las enseñanzas más grandes de perseverancia, fortaleza y disciplina. Agradezco a la cultura Polinesia que hace años me abrigó a través de la danza y me mostró un camino para fortalecer mi cuerpo y mi espíritu. Agradezco las enseñanzas de personas maravillosas como Kumu Kunewa Mook, Kumu Keali'i Ceballos, Matani Kainuku y Wilfrid Iriti porque me formaron en el arte de la danza pero me dieron lecciones de vida y sus palabras resuenan en mi pensamiento y en mi corazón.

Por su apoyo, por su compañía, por sus enseñanzas a lo largo de ésta aventura, a todos y cada uno de ustedes les digo:

MUCHAS GRACIAS. MAURURU ROA. MAHALO NUI LOA. ARIGATO GOZAIMASU.

¡KIA KAHA! (¡Se fuerte!)

CONTENIDO

Contenido.....	III
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
I. Introducción.....	1
II. Revisión de literatura.....	3
III. Justificación.....	24
IV. Hipótesis.....	26
V. Objetivo general.....	26
VI. Objetivos específicos.....	26
VII. Material y métodos.....	27
VIII. Resultados.....	54
IX. Discusión.....	63
X. Conclusiones.....	67
XI. Literatura Citada.....	68

RESUMEN

VÁZQUEZ AGUIRRE MARTHA. Optimización de una técnica de extracción de ADN genómico de espermatozoides de toro (bajo la dirección de: Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez, Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Salvador Uribe Carbajal)

En el estudio de los espermatozoides de toro, las pruebas de ADN constituyen un elemento fundamental en investigaciones biológicas, médicas, de ingeniería genética y en todo estudio científico en el que sea necesario un análisis genético. Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación de los ácidos nucleicos, a la fecha no se ha encontrado un método automatizado universal que sea útil con cualquier tipo de muestra. Para la extracción de ADN espermático se requieren métodos de extracción especiales y al intentar adaptar métodos o kits estandarizados para células somáticas se requiere incrementar los periodos de incubación, lo cual resulta poco práctico para la obtención de resultados inmediatos. Por ello es necesario diseñar protocolos que permitan la extracción del ADN de forma óptima, lo cual significa seleccionar los mejores elementos o la mejor combinación de elementos de un conjunto de alternativas disponibles para obtener la máxima eficiencia. El objetivo de este estudio fue diseñar un método rápido, económico y aplicable a gran escala, utilizando la menor cantidad de muestra para la extracción de ADN de espermatozoides de toros. Se evaluó la efectividad de un método descrito en la literatura para células somáticas realizando 5 modificaciones de las cuales se originaron 5 métodos diferentes para la extracción de ADN en espermatozoides. La evaluación de los 6 métodos (original y los derivados de las modificaciones) se realizó tomando en consideración los parámetros de integridad, pureza, concentración y calidad del ADN, así como la relación costo – beneficio y el tiempo de procesamiento por muestra. La concentración y pureza se determinaron mediante espectrofotometría. La integridad y presencia de sustancias inhibitoras fueron evaluadas mediante electroforesis y reacciones de PCR. Para evaluar la repetibilidad del método se realizaron réplicas del protocolo considerado como el más eficiente por haber cumplido con los parámetros de concentración y calidad mínimos. Este protocolo fue el basado la utilización de CTAB como agente desmembranante, papaína como solución de lisis y DTT, heparina y SDS como solución descondensante. Con este método se obtuvieron promedios en las concentraciones de ADN de 63 y 154 ng/μl así como grados de pureza adecuados, tanto en el semen fresco como congelado ($260/280 = 1.62$ y 1.75 ; $260/230 = 1.62$ y 1.65). Con este protocolo es posible realizar hasta 20 extracciones simultáneas en un periodo de 1 hora con 55 minutos aproximadamente, con un costo de extracción de \$3.77 MN por muestra.

Palabras clave: extracción, ADN, genómico, espermatozoides, toro.

ABSTRACT

VÁZQUEZ AGUIRRE MARTHA. Optimization of a bull spermatozoa genomic DNA extraction technique (down direction by: Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez, Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda, Dr. Salvador Uribe Carbajal)

When studying bull spermatozoa, DNA testing is a fundamental for research on genetic engineering, biology and medicine aspects, and in general in a scientific study that requires genetic analysis. Even though in recent years researchers have made huge progress simplifying the extraction and purification of nucleic acids, there is not yet a universal automated method that can be used with any type of sample. Various methods have been reported for sperm DNA extraction. However, most of them require a long incubation period, which makes them impractical. This is one of the major reason to design working protocols for optimal DNA extraction, allowing for the selection of the best elements or combination of element from a set of available alternatives. The objective of this study was, using the smallest amount of bull sperm, to design a fast DNA extraction method that uses the smallest amount of bull spermatozoa while being cost-effective and applicable to large scale. Five different methods of DNA extraction from bull spermatozoa were developed by adapting a methodology that has been reported for somatic cells. A comprehensive cost-benefit analysis, including DNA integrity, purity, concentration and quality was conducted for each of the six methods (the original and the five modifications), and the processing times were compared. Spectrophotometry was used to measure DNA concentration and purity. PCR and electrophoresis were used to determine integrity and presence of inhibitory substances. The results showed that the best method for bull spermatozoa DNA extraction was the sixth one, based on the use of CTAB as a membrane removal agent; papain, DTT and DMSO as lysis buffer and DTT, heparin, and SDS as decondensating solution, achieving concentration averages of 63 and 154 ng/ μ l and optimal quality ($260/280 = 1.62$ y 1.65) when extracting from fresh and frozen semen respectively. This technique makes it possible to make up to 20 simultaneous DNA extractions within 1 h and 55min at a cost of \$3.75 mexican pesos per sample.

Key words: genomic, DNA, extraction, bull, spermatozoa.

I. INTRODUCCIÓN

La necesidad de generar conocimiento sobre procesos complejos que se llevan a cabo en diversos sistemas (bacterias, protozoarios, hongos, células somáticas y células germinales de organismos multicelulares), ha propiciado el desarrollo de técnicas de biología molecular específicas para cada sistema (Poljak *et al.*, 2000; Triant y Whitehead, 2009). Estas técnicas han tenido un gran crecimiento desde que comenzaron a utilizarse a mediados de la década de 1980 (Capo, 2009), siendo necesario para la mayoría de ellas la extracción de ADN, ARN y en su caso proteínas (Tan y Yiap, 2009). Por ello la extracción de estas macromoléculas es un paso crucial cuando se trabaja con técnicas de biología molecular (Rasda y Taboada, 1998; Möller, 1992; Turnes, 2000; Vinod, 2004; Luque y Hérreaez, 2008; Radpour *et al.*, 2009; Tan y Yiap, 2009; Triant y Whitehead, 2009).

Para el estudio de los espermatozoides, el análisis del ADN mediante técnicas moleculares como la PCR (del inglés *Polimerase Chain Reaction*) y PCR en tiempo real (PCRtr) ha permitido estudiar y comprender diferentes procesos bioquímicos así como el diagnóstico de enfermedades genéticas ligadas al sexo (Capo, 2009; Radpour *et al.*, 2009), de anomalías genéticas en los espermatozoides como translocaciones, inversiones, deleciones, duplicaciones e isocromosomas (Attia *et al.*, 2002; Dada *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012; Schillaci *et al.*, 2013), de anomalías de la fertilidad, e incluso el diagnóstico de algunas enfermedades de transmisión sexual como el papiloma (Flores – Sánchez *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, para realizar estudios de este tipo es imprescindible la recuperación de ácidos nucleicos en buen estado y libres de inhibidores (Capo, 2009; Demeke y Henkins, 2010; Selingson y Shrawder, 1986; Turnes, 2000).

En general, dada la complejidad molecular de las células, los ácidos nucleicos son difíciles de separar de los componentes celulares, así como de las sustancias empleadas en los protocolos para su extracción (detergentes, solventes, sales) (Tan y Yiap, 2009). Además, la aplicación de métodos drásticos para la extracción de este tipo de moléculas puede alterar su estructura y sus características, de ahí que las investigaciones se enfoquen al desarrollo de métodos menos agresivos para tratar de eliminar la impureza de las preparaciones, todos ellos basados en las propiedades físico-químicas del ácido nucleico (Luque, 2008). A pesar de ello, la mayoría de los métodos no suelen ser eficaces para la extracción del ADN a partir de células espermáticas debido

a que estas cuentan con estructuras y componentes que brindan mayor protección al material genético, lo que dificulta su extracción (Ward y Coffey, 1991; Oko y Maravei, 1994).

En este trabajo se pretende diseñar y optimizar un método específico, rápido, económico y aplicable a gran escala para la extracción de ADN a partir de la menor cantidad posible de espermatozoides de toros, probando para ello diversas combinaciones de detergentes (CTAB, SDS) y sustancias descondensantes (DTT, heparina).

II. Revisión de la literatura

La investigación biológica actual ha tenido grandes avances debido a la implementación de técnicas de biología molecular para el análisis de organismos y la obtención de nuevos conocimientos mediante el análisis de los ácidos ribonucleico (ARN) y desoxirribonucleico (ADN), obtenidos a partir de muestras de tejidos o células (Möller, 1992; Griffinths, 1996; Erenpreiss, 2003; Nicklas y Buel, 2008; Tan y Yiap, 2009; Triant y Whitehead, 2009; Demeke y Jenkin, 2010).

Entre las técnicas más utilizadas en la biología molecular se pueden mencionar: Southern Blot, Slot, Dot o Spot Blot, PCR, PCRtr y PCR de transcripción inversa, electroforesis en gel, hibridación *in situ*, secuenciación, Western Blot y análisis de proteína truncada (Wistuba, 2001; Costa, 2004; Capo AJ, 2009; Demeke y Jenkin, 2010). Este tipo de técnicas se ha utilizado para la detección de microorganismos y virus (Flores – Sánchez *et al.*, 2010;), el diagnóstico de enfermedades hereditarias (Fernández *et al.*, 2013). En los estudios de cáncer se han utilizado para el diagnóstico de neoplasias y han permitido investigar la predisposición genética, la población de riesgo, determinar el tipo de cáncer, la progresión tumoral y la ocurrencia de micrometástasis (Galofré *et al.*, 2003; Navarro - Partida *et al.*, 2008). Lo anterior ha facilitado la selección de terapias y la evaluación del pronóstico de la enfermedad (Witsuba, 2001). Las técnicas de biología molecular también son una alternativa en los estudios epidemiológicos (Santella, 2006).

El empleo de éstas técnicas también se ha extendido ampliamente al campo de las células espermáticas, en donde han permitido el estudio de aspectos bioquímicos, así como el diagnóstico de enfermedades genéticas ligadas al sexo (Capo, 2009; Radpour *et al.*, 2009), la detección de anomalías genéticas en los espermatozoides (Attia *et al.*, 2002), la identificación de alteraciones que afectan la fertilidad, y el diagnóstico de enfermedades que se transmiten a través del semen (Naumenko *et al.*, 2011), como es el caso del papiloma bovino (Silva *et al.*, 2011). También se han utilizado como técnica de validación en el sexaje de espermatozoides (Chandler *et al.*, 1998; Garner, 2001; Parati *et al.*, 2006).

Una práctica que ha cobrado gran importancia en la ganadería es la selección genómica, que consiste en utilizar la información disponible del ADN de las vacas o toros como un dato adicional

para predecir sus valores genéticos y basándose en esos valores genéticos “mejorados” tomar las decisiones de selección (Goddard y Hayes, 2007). Las evaluaciones genómicas se basan en los polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), es decir cambios en los SNPs en todo el genoma. Actualmente se han estudiado miles de estos marcadores moleculares, existiendo cerca de 50,000 SNPs que son empleados como una especie de “chip” para correlacionar las características productivas de los animales. Es decir, con base en esto, se han establecido “fórmulas” o “ecuaciones de predicción” mediante las cuales se obtiene la información sobre el mérito genético de un animal en cada uno de los caracteres. Las pruebas así obtenidas se denominan valor genómico “directo”, porque no se basan nada más que en los genotipos de los toros. Estos valores genómicos directos se incorporan posteriormente en las evaluaciones genéticas tradicionales, aumentando su confiabilidad (Hayes *et al.*, 2009). La gran ventaja es que el ADN a partir del cual se obtiene la información se puede tener desde el nacimiento del animal, a partir de una muestra de sangre o de cualquier tejido, como pelo o piel. Cabe señalar, que en algunos casos se cuenta con el semen congelado de toros que ya han muerto, por lo que la única fuente de ADN para realizar el análisis son los espermatozoides congelados (Goddard y Hayes, 2007; Luan *et al.*, 2009). Esto es de relevancia si tomamos en consideración que la inseminación artificial es una de las tecnologías reproductivas de mayor impacto en la ganadería lechera por las múltiples ventajas como la posibilidad de acelerar el progreso genético (Foote, 2002; Vishwanath, 2003).

Para la aplicación de éstos procedimientos, la extracción del ADN es el paso más crucial, ya que es el punto de inicio de todo proceso que involucre técnicas de biología molecular (Tan y Yiap, 2009). De la calidad del ADN que se haya extraído de la muestra dependen los resultados obtenidos (Vinod, 2004; Tan y Yiap, 2009; Triant y Whitehead, 2009).

Entre las técnicas de la biología molecular aplicadas al estudio de espermatozoides, la PCR ha sido una de las más atractivas debido a las ventajas que conlleva (Poljak *et al.*, 2000; Chandler *et al.*, 2007). Sin embargo, la eficiencia de los procedimientos de extracción de ADN a partir de los espermatozoides es un punto crítico para el éxito de la aplicación de la reacción en cadena de polimerasa (PCR), por ello la elección del método de extracción será crucial, ya que a menudo supone un compromiso entre cantidad y calidad del ADN extraído (Vinod, 2004; Capo, 2009). Debido a lo anterior, se han desarrollado múltiples y muy diversos protocolos de extracción de

ADN. Sin embargo, existen factores limitantes en la extracción del mismo a partir de muestras de espermatozoides. Dichos factores influyen en la calidad y cantidad del material genético obtenido. En algunos casos los métodos utilizados para extraer ADN a partir de espermatozoides han sido kits comerciales o métodos adaptados de protocolos previamente estandarizados para células somáticas. Sin embargo para los espermatozoides se requieren métodos de extracción especiales. En consecuencia muchos de los métodos desarrollados para células somáticas y adaptadas a espermatozoides requieren de largos periodos de incubación, lo cual resulta poco práctico o simplemente no son adecuados. Por ello se ve la necesidad de diseñar protocolos de trabajo que permitan la extracción del ADN de forma óptima a partir de espermatozoides (Boom *et al.*, 1997; McCarthy, 2011).

Por otra parte, la presencia de proteínas, lípidos, polisacáridos y algunos otros compuestos orgánicos o inorgánicos en la muestra del ADN extraído puede interferir con los métodos de análisis del mismo, sobre todo con la PCR. Además pueden reducir la calidad del ADN, reduciendo su vida de almacenamiento (Howeler *et al.*, 2002; Nicklas y Buel, 2003; Thakuria *et al.*, 2008; Viltrop *et al.*, 2010; Vinod, 2004). De ahí que sea necesario asegurar que el procedimiento de extracción de ADN a partir de espermatozoides sea el adecuado para garantizar los resultados de las pruebas a las que será sometido (Chandler JE *et al.*, 2007, Tan SC and Yiap BC, 2009; Vinod KK, 2004).

Consideraciones para la extracción del ADN espermático

Aunque en los últimos años se han hecho grandes progresos en la simplificación de la extracción y purificación del ADN, todavía no se ha encontrado un método automatizado universal que se pueda utilizar con cualquier tipo de muestra (Ulloa, 2007). Sin embargo, los métodos reportados para la extracción de ADN espermático resultan poco prácticos principalmente por los largos periodos de incubación requeridos, que prolongan el proceso de extracción de 1 a 2 días, por ello se ve la necesidad de diseñar protocolos de trabajo que permitan su extracción de forma más óptima (Boom *et al.*, 1997; McCarthy, 2011; Sun *et al.*, 2012).

Una vez validado un método, los objetivos se enfocan a optimizarlo para obtener alguna ventaja adicional o mejora en el proceso, sin alterar sus especificaciones fundamentales o buscando una mayor eficacia y rentabilidad. Optimizar entonces consiste en obtener una eficiencia máxima del proceso, manteniendo un estándar de calidad. Dicho de otra forma, optimizar se refiere a la elección del mejor elemento o la mejor combinación de elementos de un conjunto de alternativas disponibles (García - Montoya, 2001).

La extracción de ADN es un proceso complejo, ya que se encuentra dentro de las células, atrapado por todos los componentes celulares y empaquetado en una red de proteínas, por lo que debe ser liberado para ser utilizado en los análisis de biología molecular, de ahí que la elección de los elementos que garanticen la extracción óptima resulte de gran importancia (Vinod, 2004; Villalobos-Quesada, 2006).

Un aspecto de gran relevancia a considerar es que los espermatozoides difieren del resto de las células somáticas tanto en sus componentes como en arquitectura (Fawcett, 1975). Solo comprendiendo la estructura del espermatozoide y el empaquetamiento del ADN espermático, así como los componentes de cada estructura es posible diseñar protocolos específicos para la extracción del ADN a partir de éstas células. Para ello hay que tomar en consideración que el espermatozoide es una célula que durante su desarrollo sufre múltiples modificaciones morfológicas que le confieren mayor resistencia a los factores microambientales (De Vries *et al.*, 2012) a los que será sometido en el viaje desde el testículo hasta el sitio de la fertilización, por lo que posee estructuras y características bioquímicas únicas, diferentes a las de las células somáticas y aun a las del ovocito (Oko y Maravei, 1994, Sutovsky *et al.*, 1997; Moreno y Schatten, 2004).

Existen dos características específicas que dificultan la extracción del ADN espermático: 1) la presencia de una estructura protectora del núcleo denominada *teca perinuclear* y; 2) la presencia de proteínas compactadores del ADN (*protaminas*) que son proteínas que forman uniones fuertes con el ADN, formando una cromatina muy condensada que le otorga una gran estabilidad estructural y química y limita su liberación (Oko y Maravei, 1994; Sutovsky *et al.*, 1997; Tovich y Oko, 2003; Tovich *et al.*, 2004; Balhorn, 2007; Meikar *et al.*, 2012).

Por ello, para liberar el ADN de las cabezas de los espermatozoides se requieren métodos de extracción especiales debido por un lado a las características específicas de compactación del ADN, que lo hacen más resistente a la extracción que cualquier otra célula somática. Por otra parte, el semen no consiste únicamente en la fracción espermática, sino que también hay otras células, como las del epitelio de las glándulas anexas del tracto reproductor del macho, que se descaman y pueden contaminar la muestra. En consecuencia, las muestras de semen a partir de las cuales se extrae el ADN espermático se procesan de manera diferencial: la primera extracción proporciona principalmente el ADN de células epiteliales, mientras que la segunda extracción permite obtener el ADN de los espermatozoides (Vuichard *et al*, 2011)

Características morfológicas y bioquímicas del espermatozoide

Los espermatozoides son células exclusivas de los machos que se forman en los túbulos seminíferos de los testículos y tienen como función transportar el material genético paterno hasta el tracto reproductor femenino, en donde se combina con el material genético del gameto femenino para originar nuevos individuos con información genética diploide (Meikar *et al*, 2012). Por sus funciones específicas, la organización de la estructura de los espermatozoides tiene características definidas que lo diferencian de las células somáticas y de su contraparte el gameto femenino. Estas diferencias son tanto morfológicas como bioquímicas (Gilbert, 2000).

Los principales componentes químicos del gameto masculino son ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Cerca de un tercio del peso neto de un espermatozoide corresponde al núcleo y se ha calculado que cada célula contiene aproximadamente 1.3pg de ADN (Banks, 1996; Hafez, 1998).

Además de las proteínas estructurales de la membrana y el citoesqueleto, el acrosoma contiene una variedad de enzimas (Longo, *et al.*, 1987; Hafez, 1998; Hickey y Buhr, 2012). Los lípidos encontrados en el espermatozoide derivan de la membrana plasmática y de la membrana nuclear (Parks, 1987; Le Guillou, 2013).

Además de los componentes orgánicos, los espermatozoides son ricos en fósforo, nitrógeno y azufre. La mayor parte del fósforo está asociado al ADN, mientras que el azufre se deriva de proteínas nucleares básicas y de los componentes queratínicos de la cola (Hafez, 1998).

Los espermatozoides maduros se forman a partir de una serie de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos. Los espermatozoides maduros son células largas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola o flagelo que contiene el aparato necesario para la motilidad celular. De forma descriptiva, las estructuras y organelos del espermatozoide se muestran en el Cuadro 1 (Hafez, 1998; Gilbert, 2000).

Cuadro 1 Organización morfológica de los espermatozoides (Adaptado de Hafez, 1998; Gilbert, 2000; Toshimori e Ito, 2003).

Localización	Estructura
Cabeza	Membrana plasmática Acrosoma Teca perinuclear Envoltura nuclear Núcleo
Flagelo	Membrana plasmática Mitocondrias Axonema (citoesqueleto de microtúbulos)

Al igual que todas las células eucariontes, el espermatozoide entero está cubierto por una membrana plasmática compuesta principalmente por fosfolípidos, colesterol y proteínas (Gilbert, 2000). Los lípidos se encuentran distribuidos en una bicapa, con una región hidrofílica o polar expuesta y una región hidrofóbica localizada al interior de la bicapa. La proporción de colesterol y fosfolípidos, la naturaleza de los fosfolípidos y la temperatura determinan la fluidez de la

membrana, que a temperatura corporal se encuentra en un estado fluido (Parks *et al.*, 1987; Bearer y Friend, 1990). Las proteínas de la membrana se encuentran distribuidas entre los lípidos de manera integral o bien en forma periférica, algunas sirven como canales o bien como receptores. Las proteínas en la superficie externa de la bicapa se encuentran unidas a cadenas de carbohidratos (Bearer y Friend, 1990; Alberts, 2001).

En algunos sitios de la membrana los lípidos se organizan formando lo que se conoce como microdominios o balsas lipídicas, que son ricas en colesterol y esfingolípidos. Estos dominios se definen como sitios pequeños, heterogéneos y bien definidos de la membrana que sirven para compartimentalizar procesos celulares (Pike, 2006).

El núcleo del espermatozoide adquiere una forma característica que varía entre especies y que, en el caso del bovino, corresponde a un óvalo aplanado parecido a una raqueta de tenis (Hafez, 1998). Esta forma del núcleo se debe a la marcada condensación de la cromatina que la hace metabólicamente inerte y altamente resistente a la degradación y a los agentes dañinos como químicos, radiación, tóxicos (Sailer *et al.*, 1995). Esta condensación de la cromatina limita la extracción del material genético mediante métodos estandarizados para células somáticas (Fawcett, 1975; Balhorn, 1982).

La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico y una clase especial de proteínas básicas llamadas *protaminas*, que interactúan estrechamente con el ADN y ocupan el lugar de las *histonas* (Fawcett DW, 1975; Hafez, 1998, Sánchez – Vázquez *et al.*, 2008). Adicionalmente, la transformación morfológica de la cromatina está asociada a la progresiva estabilización de la misma por el establecimiento de puentes disulfuro entre las protaminas (Sailer *et al.*, 1995).

En la mayor parte de las especies el núcleo espermático contiene sólo protaminas, pero en algunas especies puede contener cantidades variables de histonas más grandes y ricas en arginina. Por ejemplo, el núcleo del espermatozoide humano contiene considerablemente menos protaminas (aproximadamente del 67-85%) que otras especies, como el toro (Balhorn, 1982). El hámster y el ratón también conservan histonas en un 57 y 66% respectivamente. A pesar de la

proporción variable en la que se encuentran en los núcleos de los espermatozoides de las diferentes especies, las protaminas son las proteínas nucleares que le confieren la alta condensación y estabilización del ADN, al ser mantenidas juntas por enlaces disulfuro, que se forman durante el paso del espermatozoide a través del epidídimo (Wykes y Krawetz, 2003; Erenpreiss *et al.*, 2006). Las protaminas de los mamíferos contienen numerosos residuos de cisteína, a través de los cuales se generan puentes disulfuro con las protaminas adyacentes durante los últimos estadios de maduración de los espermatozoides (Balhorn, 1982).

Las protaminas tipo PI se encuentran asociadas al ADN de espermatozoides de toro y de otros mamíferos placentados. Típicamente poseen de 49 a 50 aminoácidos y contienen tres dominios: un dominio central rico en arginina (Balhorn R, 2007) para su unión al ADN, que es flanqueado a ambos lados por un péptido corto que contiene residuos de cisteína. En muchas especies, el dominio central de unión al ADN consiste en secuencias que contienen entre 3 y 11 residuos de arginina para unirse al ADN (Balhorn, 2007).

Algunos estudios sobre descondensación de la cromatina espermática indican que el tratamiento con ditioneitol (DTT) y heparina liberan al ADN de su estructura condensada (Juárez y Mujica 1999; Juárez, 2000; Delgado *et al.*, 2001; Gutiérrez, 2006). La heparina se une a las protaminas, formando complejos que neutralizan su efecto. Por otro lado, el DTT es un agente reductor de enlaces disulfuro que actúa en sinergia con el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), permitiendo la descompactación del ADN. La combinación de DTT y heparina ha permitido obtener mejores resultados (Juárez y Mujica 1999; Juárez, 2000; Gutiérrez, 2006).

Por otro lado, una estructura de gran importancia en la resistencia estructural del espermatozoide es la teca perinuclear (TP), que es una estructura del citoesqueleto de la cabeza espermática, con densidad variable (Felipe Y, 2006). Su organización arquitectónica recubre el núcleo de los espermatozoides de mamíferos a manera de casco protector, excluyendo la zona alrededor del segmento de inserción de la cola. La teca perinuclear muestra dos distintas regiones, una región subacrosomal situada por debajo de la membrana acrosomal interna, que se continúa caudalmente con la región postacrosomal, que forma un cáliz que rodea la porción entre la

envoltura nuclear y la membrana plasmática (Okó y Maravei, 1994; Sutovsky *et al.*, 1997; Tovich y Okó, 2003; Tovich y Okó, 2004; Felipe Y, 2006; Balhorn, 2007; Meikar *et al.*, 2012).

Las proteínas que componen a la teca perinuclear se caracterizan por su resistencia a la extracción con detergentes neutros y soluciones amortiguadoras altas en sal. Algunas de estas proteínas son comparables al citoesqueleto de las células somáticas (Felipe, 2006).

En las células somáticas se han estudiado ampliamente las proteínas del citoesqueleto. Las proteínas del citoesqueleto espermático también se han estudiado y se ha reportado la existencia de las siguientes: actina, ciclinas, calmodulina, CP β 3 y CP α 3 (por sus siglas en inglés “capping proteins”), proteínas relacionadas a la actina Arp T1 y Arp T2 (por sus siglas en inglés “actin related proteins”) (Leclerc y Goupil, 2000; Felipe, 2006).

La TP tiene diferentes funciones, como son el participar en el modelamiento morfogénico de la cabeza espermática, en la unión, extensión y anclaje del acrosoma a la envoltura nuclear durante la espermiogénesis y en la regulación del volumen celular espermático. Por otro lado, algunos autores afirman que la TP es la principal barrera que impide la descondesación de la cromatina espermática porque una de sus funciones importantes es la protección del material genético, representando un elemento que disminuye la eficiencia de los métodos de extracción de ADN empleado con otros tipos celulares (Okó y Maravei, 1994; Sutovsky *et al.*, 1997; Tovich y Okó, 2003; Tovich *et al.*, 2004; Felipe, 2006; Balhorn, 2007; Meikar *et al.*, 2012).

En general la estructura de las mitocondrias espermáticas es la misma que la de las células somáticas. Se componen de una doble membrana que contiene muchos complejos enzimáticos y sistemas de transporte transmembranal que están implicados en la translocación de moléculas (Ramalho-Santos *et al.*, 2009). Además, la matriz mitocondrial contiene moléculas como iones, metabolitos por oxidar y ADN (Alberts *et al.*, 2002). Un aspecto importante a considerar en la extracción de ADN nuclear del espermatozoide es la eliminación del ADN mitocondrial, que pudiera interferir en las lecturas de cuantificación real del ADN extraído (Meredith *et al.*, 2011).

Etapas de la extracción de ADN

El ADN de los espermatozoides de toro se encuentra dentro del núcleo, atrapado en una red de proteínas y en conjunto contiene 30 cromosomas (Wykes y Krawetz, 2003), por lo que debe ser liberado para ser utilizado en los análisis de biología molecular. Usualmente esto se logra mediante una secuencia de pasos de lisis celular, degradación de proteínas utilizando proteinasas, y remoción de péptidos del lisado mediante extracción orgánica. Como último paso, se recuperan los ácidos nucleicos mediante precipitación con etanol o cloruro de sodio (Wykes y Krawetz, 2003; Vuichard, 2011).

El proceso anterior, usualmente utilizado con células somáticas, ha sido adaptado a las muestras espermáticas con resultados variables (Capo, 2009). En la actualidad existen diversos métodos de extracción del ADN espermático, entre los cuales se dispone de kits comerciales, que tienen como desventajas su costo elevado y la necesidad de depender de una casa comercial. También se han hecho modificaciones de los métodos originales para las extracciones a partir de muestras de espermatozoides de toro. Los métodos tienen que ser adecuadamente seleccionados para optimizar el rendimiento y la calidad del ADN extraído (Viltrop *et al.*, 2009; Demeke y Henkins, 2010).

Por ejemplo, en las patentes con número de publicación WO2011026194 A1 y EP0389063 B1, se describen métodos para extracción de ADN aplicables a varios tipos de células somáticas, así como a células espermáticas. Sin embargo, dichas metodologías están estandarizadas para espermatozoides de humano, que presentan un menor grado de protección del material genético que los espermatozoides de toro, por lo que la calidad y cantidad de ADN obtenido muy probablemente no serían las mismas (Boom *et al.*, 1997; McCarthy, 2011).

En la patente con número de publicación CN102296062 B se describe un método para obtener el ADN de espermatozoides de toro congelados, con el cuál se obtienen excelentes concentraciones (105.6 - 1568.5 ng/μl) y calidad del material extraído (260/280= 1.79-1.86; 260/230= 1.58-2.19) , sin embargo es un procedimiento que requiere una noche de incubación, lo que representa una pérdida de tiempo en la obtención del ADN para su posterior análisis, por lo que la obtención de

resultados se retrasa. En la investigación científica, el “factor tiempo” resulta crucial para la toma de decisiones y el eficiente desarrollo de los estudios (Sun *et al.*, 2012).

Independientemente de la diversidad de métodos descritos para la extracción de ADN, en la mayoría de los métodos descritos los detergentes empleados han sido:

- Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB): es un detergente catiónico que tiene la propiedad de precipitar ácidos nucleicos y polisacáridos cuando es empleado en soluciones de baja concentración iónica. Bajo estas condiciones las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. En soluciones de alta concentración el CTAB forma complejos con las proteínas y polisacáridos pero no precipita ácidos nucleicos. Por esta razón es especialmente útil para precipitar ADN genómico de organismos que producen grandes cantidades de polisacáridos, como las plantas y algunas bacterias Gram negativas. También se ha empleado en la extracción de ADN de células sanguíneas, tejido muscular, folículo piloso y semen (Sollero *et al.*, 2004; Vinod, 2004; Carpi *et al.*, 2011).
- Dodecil sulfato de sodio (SDS): Es un detergente que actúa rompiendo enlaces no covalentes en las proteínas, desnaturalizándolas, lo que provoca que estas moléculas proteicas pierdan su conformación nativa. Esto ocurre porque el SDS se une a las zonas apolares del polipéptido. La cantidad de SDS unido es similar para muchas proteínas: una molécula de SDS por cada dos residuos aminoácidos, correspondiendo a unos 1.4 g SDS/g proteína. Ello proporciona al polipéptido una carga negativa que resulta proporcional a la longitud de la cadena (el número de aminoácidos) y, por tanto, a la masa molecular de la proteína. Este aporte de carga negativa es sustancialmente mayor que la carga original de la proteína. La repulsión electrostática creada por la unión del SDS a la proteína es una de las causas de que la proteína pierda su conformación nativa. Cuando el detergente entra en contacto con la célula, captura los lípidos y las proteínas, liberando el ADN. Este detergente se ha utilizado para la extracción de ADN a partir de células sanguíneas, hongos filamentosos, frutas, muestras de suelo y bacterias, entre otros (Möller *et al.* 1992; Vinod, 2004; Carpi *et al.*, 2011).

Además, en algunos de los métodos descritos se realiza el rompimiento mecánico de las membranas plasmáticas para liberar los núcleos, mientras que otros describen la lisis celular con detergentes y extracción con amortiguadores, seguidas de extracciones con fenol - cloroformo y sucesivas centrifugaciones y precipitación con alcoholes. Con la finalidad de obtener el ADN más puro se pueden usar adicionalmente enzimas como ARNasas y proteínasa K, así como lavados con fenol equilibrado (Maldonado- Astudillo, 2007; Tan y Yiap, 2009). Aunque se han hecho grandes progresos en la simplificación de los procesos de extracción y purificación de los ácidos nucleicos todavía no se ha encontrado un método general que se pueda aplicar a cualquier tipo de muestra, sin embargo se pueden considerar 5 pasos generales en la extracción del ADN (Thakuria *et al*, 2008; Tan y Yiap, 2009; Carpi, *et al.*, 2011):

1. Obtención y preparación de la muestra
2. Lisis celular
3. Purificación del ADN
4. Precipitación del ADN
5. Reconstitución y almacenaje

1. Obtención y preparación preliminar de las muestras

La muestra celular se obtiene y prepara a partir de órganos, tejidos o fluidos biológicos, en función del objetivo perseguido (clínico, de identificación de individuos, de caracterización del genoma, analítico), tipo de célula (somática o germinal), tipo del genoma (nuclear o mitocondrial), tipo de estudio a realizar (secuenciación del genoma, clonación). En cualquier caso, la obtención de las muestras debe garantizar la calidad de la misma frente a las diversas variables que puedan alterar los resultados finales del análisis (Luque, 2008)

2. Lisis celular

Durante la lisis celular se procede a la destrucción de las estructuras formadas por lípidos y proteínas, permitiendo la liberación de los ácidos nucleicos del núcleo celular. La lisis se lleva a cabo mediante una solución salina que suele contener detergentes que desnaturalizan las proteínas y/o proteasas. Una vez separados los ácidos nucleicos de las proteínas y lípidos se lleva a cabo su purificación (Luque, 2008; Carpi, *et al.*, 2011).

En general, la lisis celular se realiza con un medio hipotónico; en algunos casos esta etapa es simultánea con la preparación de la muestra (p. ej. Homogeneización).

El método más comúnmente usado para la lisis celular cuando se pretende purificar ADN es la llamada lisis alcalina (Tan y Yiap, 2009). Las células son resuspendidas en una solución amortiguadora, la cual en el caso de bacterias puede opcionalmente contener lisosima para digerir la pared celular. La solución de lisis celular, que contiene el detergente dodecil sulfato de sodio en solución salina hidroxilada es añadida a la suspensión celular. El SDS rompe la membrana celular y desnaturaliza las proteínas, las condiciones alcalinas desnaturalizan el ADN y comienzan la hidrólisis de RNA. La preparación es posteriormente neutralizada con una solución concentrada de acetato de potasio (KOAc) a pH 5. Ésta solución tiene el efecto de precipitar las proteínas desnaturalizadas, junto con el ADN cromosómico y gran parte del detergente. La muestra es centrifugada de nuevo, y el sobrenadante (el lisado) que contiene ADN es recuperado después del tratamiento alcalino, junto con pequeñas moléculas de RNA y algunas proteínas (Möller, 1992; Vinod, 2004; Demeke y Henkins, 2010; Carpi, *et al.*, 2011; Kalyanasundaram *et al.*, 2013;).

En algunos protocolos el SDS es reemplazado con CTAB, siendo uno de los métodos más utilizados en la extracción de ADN debido a su capacidad de precipitar los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos (Tan y Yiap, 2009). Este método fue introducido por Murray y Thompson en 1980, pero fue publicado posteriormente, en 1987, por Wagner y sus colaboradores. El método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales y de alimentos derivados de vegetales y células somáticas, y está especialmente indicado para eliminar los polisacáridos y los compuestos polifenólicos que de otro modo alterarían la pureza del ADN y por tanto, su calidad. Se han elaborado algunas variantes adicionales para adaptar el método a la extracción de ADN de alimentos transformados y sin transformar, así como a la extracción de ADN de células de diferentes órganos, bacterias y otros microorganismos. En este caso el protocolo básico requiere el tratamiento con una solución de CTAB al 2% en solución Tris 100mM, añadida con EDTA 20 mM y NaCl 1.4mM. (Vinod, 2004; Demeke y Henkins, 2010; Carpi, *et al.*, 2011; Kalyanasundaram *et al.*, 2013).

Algunas modificaciones de ambos protocolos (SDS y CTAB) involucran la adición de proteinasa K y mercaptoetanol (Demeke y Henkins, 2010; Carpi *et al.*, 2011).

3. Purificación del ADN

Posterior a la lisis es necesario purificar el ADN para eliminar los componentes contaminantes, como carbohidratos, lípidos, proteínas, RNA, ADNasas, residuos celulares, así como residuos de los reactivos empleados en la lisis celular (Howeler *et al.*, 2002; Tan y Yiap, 2009; Carpi *et al.*, 2011). Algunas técnicas de extracción de ADN involucran la unión selectiva del ADN a membranas de resina y el lavado de proteínas y el RNA. El método clásico, el cuál es lento pero perfectamente efectivo, involucra la extracción del lisado con fenol o una combinación de fenol- cloroformo (Luque, 2008; Viltrop *et al.*, 2009). El fenol es insoluble en soluciones acuosas, en las que forma una capa, pero cuando se mezcla vigorosamente se separa y desnaturaliza las proteínas restantes, lo cual forma un precipitado (Luque, 2008). Sin embargo el fenol y el cloroformo son reactivos inflamables, corrosivos y tóxicos, por lo que su uso resulta peligroso (Vinod, 2004; Tan y Yiap, 2009; Demeke y Henkins, 2010; Carpi *et al.*, 2011).

4. Precipitación

El ADN se concentra por precipitación con etanol. Este es un procedimiento general para la obtención final de los ácidos nucleicos. Sí en el procedimiento de extracción se agrega acetato de sodio a la solución y si la concentración de Na⁺ es superior a 0.3M, el ADN debe ser precipitado con la adición de 2-3 volúmenes de etanol (en caso contrario se usa volumen 1:1). La solución debe ser centrifugada para obtener el ADN y después de eliminar el sobrenadante debe ser resuspendido en una solución amortiguadora (Tan y Yiap, 2009).

5. Reconstitución y almacenaje

Una vez extraído el ADN debe ser conservado adecuadamente. El precipitado seco o el "ovillo" de fibras de ADN obtenido debe disolverse en solución amortiguadora alcalina y conservarse a - 4°C, o disolverse en agua estéril y mantenerse congelado para posteriores manipulaciones. Algunos autores mencionan que el ADN genómico en solución no debe ser congelado para evitar la rotura

de las moléculas por las fuerzas provocadas al solidificarse el hielo y al descongelarse (Luque, 2008).

Particularmente cuando se va a realizar un análisis genómico, el almacenamiento a largo plazo es un asunto crítico ya que la preservación en soluciones acuosas es detrimental para las moléculas del ADN susceptibles a cambios químicos. Por lo tanto el almacenamiento a largo plazo requiere de congelación o del uso de conservadores especiales (Kalyanasudaram D. *et al*, 2013).

Los principales factores que causan modificaciones o daños moleculares en el ADN son los agentes oxidantes, las radiaciones (en especial las ultravioleta), la temperatura, la humedad, el pH, los procesos mecánicos y las enzimas, entre las que destacan las nucleasas (Capo AJ, 2009).

Los principales cambios o modificaciones que se producen en la estructura del ADN afectan a los enlaces químicos, provocando la rotura de los enlaces, los cuales conducen a la fragmentación de la cadena de nucleótidos y por tanto a la degradación del ADN. Estos daños son debidos fundamentalmente a fenómenos de hidrólisis y fenómenos oxidativos. Estos últimos afectan en especial a las bases derivadas de la pirimidina (timina y citosina). Las modificaciones de las bases nitrogenadas son un hecho común en el ADN, como mínimo 1 de cada 10 pirimidinas se encuentran modificadas, lo cual es causado principalmente por las principales enzimas de degradación, nucleasas que provienen del propio organismo en análisis, así como de microorganismos. Todos estos daños en el ADN provocan la ruptura en fragmentos de tamaño variable, pero la mayoría de los fragmentos miden de 100-200 pares de bases (pb), aunque algunas moléculas pueden alcanzar tamaños de hasta 1000-2000 pb (Capo, 2009).

Procedimientos alternativos de extracción

Se han descrito protocolos basados en centrifugación en gradientes de densidad, cromatografía, magnetismo, dendrímeros y electromagnetismo (Tan y Yiap, 2009; Carpi *et al.*, 2011).

La obtención de ADN mediante centrifugación en gradientes de densidad es complicada, costosa y requiere de largos periodos de procesamiento en comparación con otros protocolos de

purificación, además requiere de grandes cantidades de muestra. Este método se basa en la centrifugación en gradientes de bromuro de etidio (EtBr) y cloruro de cesio (CsCl), con la posterior precipitación con alcohol (Tomanee *et al.*, 2006; Tan y Yiap, 2009).

La purificación del ADN empleando columnas de separación cromatográfica es el procedimiento que comúnmente se comercializa mediante kits (Tan y Yiap, 2009). Este procedimiento se basa en la elusión de las muestras a través de columnas que contienen materiales específicos y la retención del ADN por diferentes factores:

- Retención por tamaño. Se basa en el tamaño de las partículas contenidas en la muestra, donde el ADN es la molécula de mayor tamaño y el resto de los componentes celulares son eliminados de la columna (Carpi, *et al.*, 2011)
- Retención por carga eléctrica. En la cual el ADN se une por diferencias de carga mediante el empleo de esferas o partículas de sílice o vidrio como *material de adsorción* que se une el ADN. En este procedimiento los lisados celulares pasan a través de las esferas de sílice y el ADN se une por su carga electrostática. Después de lavados con alcohol, el ADN es eluido en una solución de baja salinidad. El rendimiento de la extracción es alto pero se requieren múltiples pasos de centrifugación junto con el uso de reactivos tóxicos. Además durante el proceso el ADN puede ser degradado por soluciones alcalinas y puede ocurrir su fragmentación debido al flujo a través de las partículas de sílice durante la centrifugación. (Tan y Yiap B, 2009; Carpi *et al.*, 2011; Kalyanasudaram *et al.*, 2013).

La extracción por magnetismo se basa en el empleo de microesferas magnéticas, sobre cuya superficie el ADN se une de forma covalente al aplicar un campo magnético. Esta tecnología requiere del empleo de ligandos bioafines (anticuerpos o proteínas con alta afinidad por el ADN). Las esferas biomagnéticas están hechas principalmente con magnetita (Fe_3O_4) o maguemita (gamma Fe_2O_3) en una matriz contenedora de polímeros, sílice o hidroxiapatita (Tan y Yiap, 2009; Carpi, *et al.*, 2011;).

Los dendrímeros son una nueva clase de polímero que presenta una estructura en forma de estrella densa, caracterizada por un núcleo central del que surgen numerosas ramificaciones. Cuando el ADN se mezcla con el polímero se forma un complejo basado exclusivamente en una interacción entre los grupos fosfato negativos del ADN y los grupos amino primarios que se encuentran en su superficie (Navarro y Tros, 2008). Aunque han creado un gran interés a nivel comercial debido a sus aplicaciones y a sus propiedades estructurales, los protocolos para la aplicación de dendrímeros en la extracción de ADN aún se encuentran en proceso de estandarización, aunque permiten la extracción rápida y eficiente en comparación con los métodos convencionales previamente descritos. También tienen un costo elevado (Tan y Yiap, 2009; Carpi *et al.*, 2011).

Problemas comunes en la extracción de ADN

- Contaminación con ADN inespecífico.
- Contaminación con componentes orgánicos: proteínas, lípidos, carbohidratos.
- Contaminación con componentes inorgánicos: fenoles, alcoholes.
- Protocolos largos.
- Empleo de reactivos peligrosos.
- Kits comerciales de alto costo.

Evaluación del ADN extraído

El objetivo de una técnica de extracción de ADN es obtener altos rendimientos del material genético, empleando el mínimo de muestra posible para obtener ADN de calidad óptima para ser empleado en técnicas de biología molecular como PCR o PCRtr, entre otras (Tan y Yiap, 2009; Triani y Whitehead, 2009). Así mismo, la técnica debería requerir la inversión de poco tiempo y no necesitar de mano de obra especializada, ya que esto incrementa los costos (Carpi, *et al.*, 2011).

Determinación de la concentración de ADN extraído

Las técnicas de PCR y PCRtr son altamente influenciadas por la cantidad de ADN que se emplea en las reacciones, por lo cual una meta en el diseño de protocolos de extracción de ADN es obtener altos rendimientos que permitan obtener altas concentraciones de la menor cantidad de muestra

posible, ya que en muchos casos la cantidad de muestra disponible es una limitante (Demeke y Henkins, 2010).

Existen diversos métodos para la cuantificación de ADN, incluyendo la espectrofotometría, la fluorometría, la quimioluminiscencia y la electroforesis en gel de agarosa. De ellas la espectrofotometría con UV es la más común (Nicklas y Buel, 2003; Vinod, 2004; Demeke y Henkins, 2010).

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de ADN. La absorción de UV por el ADN es una característica de la molécula, lo que es usado eficientemente para determinar su concentración. Cada una de las bases tiene su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente al total de absorción de UV de una molécula de ADN. Para muchas aplicaciones se debe considerar el porcentaje con el que contribuye cada una de las bases al espectro de absorción UV de una molécula de ADN de doble cadena de alto peso molecular (dcADN). Sin embargo, esas contribuciones son más significativas cuando se trata de oligonucleótidos y deben ser tomadas en cuenta si se requiere determinar correctamente la concentración (Nicklas y Buel, 2003; Demeke y Henkins, 2010).

La absorción de luz ultravioleta ocurre debido a las bases púricas y pirimídicas. Las pentosas no contribuyen significativamente a la absorción, de ahí que en el ADN de doble cadena la absorción de luz UV a 260 nm se da en menor cantidad que el número de bases totales, ya que se encuentran sobrepuestas, es por eso que cuando el ADN está desnaturalizado la absorción UV incrementa en un 20-30% al convertirse en ADN de cadena sencilla (Nicklas y Buel, 2003).

Control de la calidad del ADN

La pureza de la muestra está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm. La pureza del ADN es determinada por la ausencia de sustancias que interfieren con las técnicas de biología molecular. En el caso de las técnicas de PCR y PCTtr, la presencia de sustancias contaminantes que interfieren con las

reacciones e inhiben la amplificación son el mayor obstáculo para mejorar la eficiencia de estas técnicas de biología molecular (Demeke y Henkins, 2010).

Los principales factores que influyen en la calidad del ADN obtenido son, entre otros: el método de obtención de las muestras así como su procesamiento previo a la extracción de ADN, el tamaño de la muestra, el tipo de muestra, y el método de extracción de ADN (Demeke y Henkins, 2010).

La técnica de rutina para determinar la calidad del ADN extraído es la medición de la absorbancia del ADN a una longitud de onda de 260 nm y por otro lado en la misma muestra se mide la absorbancia de las proteínas (consideradas contaminantes) con una longitud de onda 280 nm mediante espectrofotometría con luz UV (Nicklas y Buel, 2003). La relación 260/280 nm de absorbancia indica la pureza de la muestra, ésta determina el promedio de absorción aproximado de las bases nucleotídicas (260) y de las proteínas (280) (Vinod, 2004; Thakuria *et al.*, 2008; Viltrop *et al.*, 2010).

Las relaciones de alrededor de 1.7-1.8 indican buena calidad del ADN. Los valores inferiores indican contaminación con proteínas ya que las proteínas tienen un pico de absorción a 280 nm debido a los aminoácidos aromáticos, además de contaminación con polisacáridos, cationes (Na^+ , K^+ , Al^+), residuos de detergentes, residuos de fenol o cloroformo o cualquier sustancia con la capacidad de absorber luz UV. Por el contrario una relación $A_{260}/280 > 2.1$ es indicativa de una presencia considerable de ARN en la muestra (Howeler *et al.*, 2003; Nicklas y Buel, 2003; Vinod, 2004; Thakuria *et al.*, 2008; Viltrop *et al.*, 2009;).

La relación de absorbancia $A_{260}/230$ se utiliza como medida adicional para determinar la pureza del ADN, puesto que a 230 nm se detecta la máxima absorbancia de sales, carbohidratos u otros posibles contaminantes presentes en la solución. En general se considera que el ADN es puro cuando la relación $A_{260}/230$ se sitúa en torno 1.5-2.2. Una relación menor de 1.5 podría ser indicativa de presencia de contaminantes en la muestra. No obstante, hay que tener en cuenta que esta medida no aporta una información tan exacta como la relación $A_{260}/280$ y que puede verse distorsionada por una baja concentración de ADN en la muestra, puesto que se estaría

sobrevalorando la concentración de sales presentes en el tampón de resuspensión (Howeler *et al.*, 2003; Nicklas y Buel, 2003; Thakuria *et al.*, 2008; Viltrop *et al.*, 2009; Vinod, 2004).

Determinación de la Integridad del ADN

La integridad del ADN extraído es otro factor crucial en la obtención de este ácido nucléico. En la práctica se han reportado resultados que sugieren que la variabilidad entre réplicas de PCRtr se incrementa cuando el ADN tiene altos grados de degradación (Demeke y Jenkins, 2010).

La integridad del ADN extraído se puede evaluar al realizar electroforesis en geles de agarosa al 0.8-1%. Los geles son teñidos con fluorocromos (bromuro de etidio, SYBR Green, Gel Red) e iluminados con luz UV (Caballero *et al.*, 2003). Los fluorocromos se intercalan entre las bases del ADN, lo cual permite visualizar el ADN en los geles. La presencia de una banda única de alto peso molecular indica la presencia de ADN genómico intacto. La presencia de un “barrido” indica la fragmentación en el material, el cuál puede ser evaluado dependiendo del número de bandas de menor peso molecular que el ADN íntegro presentado. También indica posible contaminación con RNA. Algunos factores que influyen en la integridad y la degradación del ADN son los relacionados con el procesamiento de las muestras celulares (obtención, almacenamiento, reactivos, centrifugación) y los relacionados con el almacenamiento del ADN extraído (buffer, pH, tiempo) (Vinod, 2004; Demeke y Jenkins, 2010).

Tipos de Inhibidores de PCR

Las amplificaciones ineficientes o la falta de repetibilidad de las reacciones de PCR pueden darse por trabajar con ADN de baja calidad o en concentraciones insuficientes, pero también debido a la presencia de sustancias inhibitoras, además de contribuir al registro de datos inexactos en PCRtr. El modo de acción de los inhibidores es a través de su unión al ADN, bloqueando los genes blanco, provocando la desnaturalización o fragmentación del ADN. También pueden actuar por la unión a iones de magnesio, el cual es un cofactor esencial para la actividad de la Taq polimerasa, o por unión directa a la enzima polimerasa (Tan y Yiap, 2009; Demeke y Jenkins, 2010).

Los inhibidores más comunes son los residuos de la lisis celular (proteínas, polisacáridos, iones, ADN ajeno proveniente de otros tipos celulares o de ADN mitocondrial, ADNsas), así como los residuos de los reactivos empleados en la conservación o procesamiento de las muestras para la extracción del ADN (SDS, CTAB, etanol, fenol, isopropanol, acetato de sodio, cloruro de sodio, EDTA), los más comunes se enumeran en el Cuadro 2 (Demeke y Jenkins, 2010).

Cuadro 2 Principales inhibidores de las reacciones de PCR

Inhibidor	Concentración en la reacción a la que producen inhibición
Dodecilsulfato de sodio (SDS)	> 0.005 %
Fenol	> 0.2 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de sodio	> 5 mM
Etanol	> 1 %
EDTA	> 0,5 mM
Hemoglobina	> 1 GM/ml
Heparina	> 0.15 UI/ml
Cloruro de sodio	> 25 mM
Urea	> 20 mM
Mezcla de reacción	> 15 %

III. JUSTIFICACIÓN

La extracción de ADN a partir de espermatozoides implica la utilización de metodologías complejas debido a problemas como las estructuras protectoras del núcleo, la compactación del ADN nuclear, la contaminación con células epiteliales del tracto reproductor masculino y la presencia de sustancias inhibitoras que pueden ser co-extraídas con el ADN espermático. Por estas circunstancias se dificulta la estandarización de un protocolo útil para la extracción y análisis de ADN de alta calidad y cantidad. Se han publicado diversos procedimientos para la extracción de ADN de muestras biológicas, sin embargo son escasas las publicaciones referentes a la extracción a partir de espermatozoides y aún menos a partir de espermatozoides de toro. En algunos casos, los procedimientos reportados requieren de largos periodos de procesamiento para ser llevados a cabo, o el empleo de solventes tóxicos como el fenol o el cloroformo, lo cual resulta poco práctico y peligroso, de ahí que se vea la necesidad de diseñar un método que sea práctico, rápido y eficiente. Por otro lado, los kits que solventan estos problemas suelen ser de costo elevado, lo cual constituye un inconveniente para su empleo a gran escala (Carpi *et al.*, 2011). La extracción de ADN es un paso fundamental en las pruebas de biología molecular, como la PCR, pues el éxito del estudio puede verse afectado en gran medida si no se realiza un buen aislamiento de la molécula (Poljak *et al.*, 2000; Howeler *et al.*, 2002; Capo, 2009; Thakuria *et al.*, 2008; Triant y Whitehead, 2009).

Por otro lado, aunque se han reportado diversos métodos de extracción o el uso de kits comerciales, existen diversas necesidades que cubrir y un área importante en la investigación es el estandarizar procedimientos que sean aplicables a gran escala, además de que sean simples, rápidos y que permitan obtener muestras de ADN con la suficiente calidad y rendimiento para ser empleadas en pruebas de biología molecular como la PCR y que permitan obtener resultados reproducibles. Idealmente las metodologías deberían permitir reducir los tiempos de trabajo, disminuir los costos por mano de obra e incrementar la seguridad de los investigadores que implementen la técnica (Poljak, *et al.*, 2000; Howeler *et al.*, 2002; Carpi *et al.* 2011; Kalyanasudaram *et al.*, 2013).

Con el fin de encontrar un método eficiente y de mínimo costo que proporcione las mejores condiciones de extracción, purificación y amplificación de ADN, el propósito de este trabajo fue

optimizar la técnica de extracción de ADN de espermatozoides de toro, realizando todas las pruebas de control de calidad que permitan verificar que las muestras de ADN obtenidas tengan características adecuadas para ser empleadas en reacciones de PCR.

IV. HIPOTESIS

La combinación adecuada de detergentes y soluciones descondensantes, específicas para tratar a los espermatozoides del toro, permitirá obtener ADN de calidad y concentración óptimas para su empleo en pruebas de PCR.

V. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar una combinación de reactivos que permita la obtención de ADN íntegro y de calidad a partir de espermatozoides de toro, para ser empleado en pruebas de PCR.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la efectividad de un protocolo de extracción del ADN estandarizado en células somáticas, en la extracción del ADN de espermatozoides de toro.
- Estandarizar un método de extracción de ADN de los espermatozoides de toro realizando las modificaciones pertinentes al método empleado en células somáticas.
- Optimizar el método de extracción estandarizado para espermatozoides obteniendo la combinación de reactivos que permita obtener altas concentraciones de ADN espermático en poco tiempo.
- Evaluar la concentración y la calidad del ADN extraído con los protocolos ensayados.
- Evaluar la integridad del ADN extraído con el protocolo con el que se obtenga la mejor concentración y calidad.
- Optimizar el protocolo de extracción seleccionado, determinando la cantidad mínima de espermatozoides necesarios para obtener al menos 25 ng/ μ l de ADN espermático.
- Verificar que el ADN extraído con el protocolo seleccionado, sea apto para su uso en PCR, amplificando con iniciadores específicos para el gen de la β -actina.
- Evaluar la resistencia a la degradación del ADN extraído y almacenado hasta por 6 meses mediante electroforesis y PCR.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental

En este trabajo se optimizó una técnica de extracción de ADN realizando modificaciones a partir de una técnica estandarizada para células somáticas. Como material biológico se emplearon muestras de espermatozoides de toro almacenado en congelación a -20°C , diluidas en PBS, así como muestras de semen fresco de toro. Para evaluar si las muestras de ADN son aptas para ser empleadas en reacciones de PCR, se corrieron reacciones de PCR en punto final utilizando los oligonucleótidos iniciadores específicos para el gen β -actina como control interno de la amplificación. Cada una de las amplificaciones se corroboró por electroforesis en geles de agarosa, analizando si los productos de la amplificación corresponden al peso molecular de cada gen analizado.

Obtención y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron cinco eyaculados de dos toros pertenecientes al Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM ubicado en el kilómetro 28.5 de la Carretera Federal México – Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° longitud Oeste a una altura de 2760 metros sobre el nivel del mar.

Para la identificación de los eyaculados cada uno se enumeró progresivamente del 1 al 5 de acuerdo al orden de su obtención. Las muestras se obtuvieron mediante el empleo de una vagina artificial de forro rugoso, a una temperatura que oscilaba entre $40-42^{\circ}\text{C}$. Cada eyaculado fue diluido en amortiguador de fosfato salino (PBS-phosphate buffered saline, pH 7.4) a temperatura ambiente, en proporción de 3:1. Las muestras se transportaron al laboratorio de Morfología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Preparación de las muestras

Cada una de las muestras obtenidas fue utilizada al azar para evaluar los métodos de extracción de ADN ensayados en este estudio.

Las muestras diluidas en PBS fueron lavadas en el mismo amortiguador por centrifugación a 3500 rpm por 5 min y resuspendidas en el mismo en proporción 3:1. Una vez lavadas las muestras se determinó la concentración espermática mediante conteo doble en el hemocitómetro. Todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de 30×10^6 células/ ml en PBS y almacenadas a -20°C o empleadas de inmediato en las pruebas de extracción de ADN.

Técnicas de extracción de ADN

En total se realizaron 5 modificaciones al método inicial probando diferentes combinaciones de detergentes y soluciones descondensantes para optimizar la técnica en cuanto al tiempo invertido, la cantidad mínima de muestra utilizada y las concentraciones y pureza del ADN obtenido.

En cada ensayo se emplearon 2.5 millones de espermatozoides en PBS. El método de extracción original que emplea proteinasa K y fenol-cloroformo se consideró como el método de extracción 1 y de las 5 modificaciones realizadas se originaron otros cinco métodos que se enumeraron progresivamente como método 2, método 3, método 4, método 5 y método 6.

- **Método de extracción 1:**

Con el objetivo de tener una referencia inicial de la extracción del ADN espermático se probó un método originalmente desarrollado para la extracción de ADN a partir de células somáticas (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, metodología no reportada con anterioridad) que se basa en el tratamiento con la proteinasa K como solución de lisis y la purificación del ADN con fenol cloroformo. El método se describe de forma general en el diagrama 1 y a continuación de forma detallada:

1. Preparación de la muestra

- 1.1. Colocar en viales las muestras de 2.5×10^6 espermatozoides de toro.

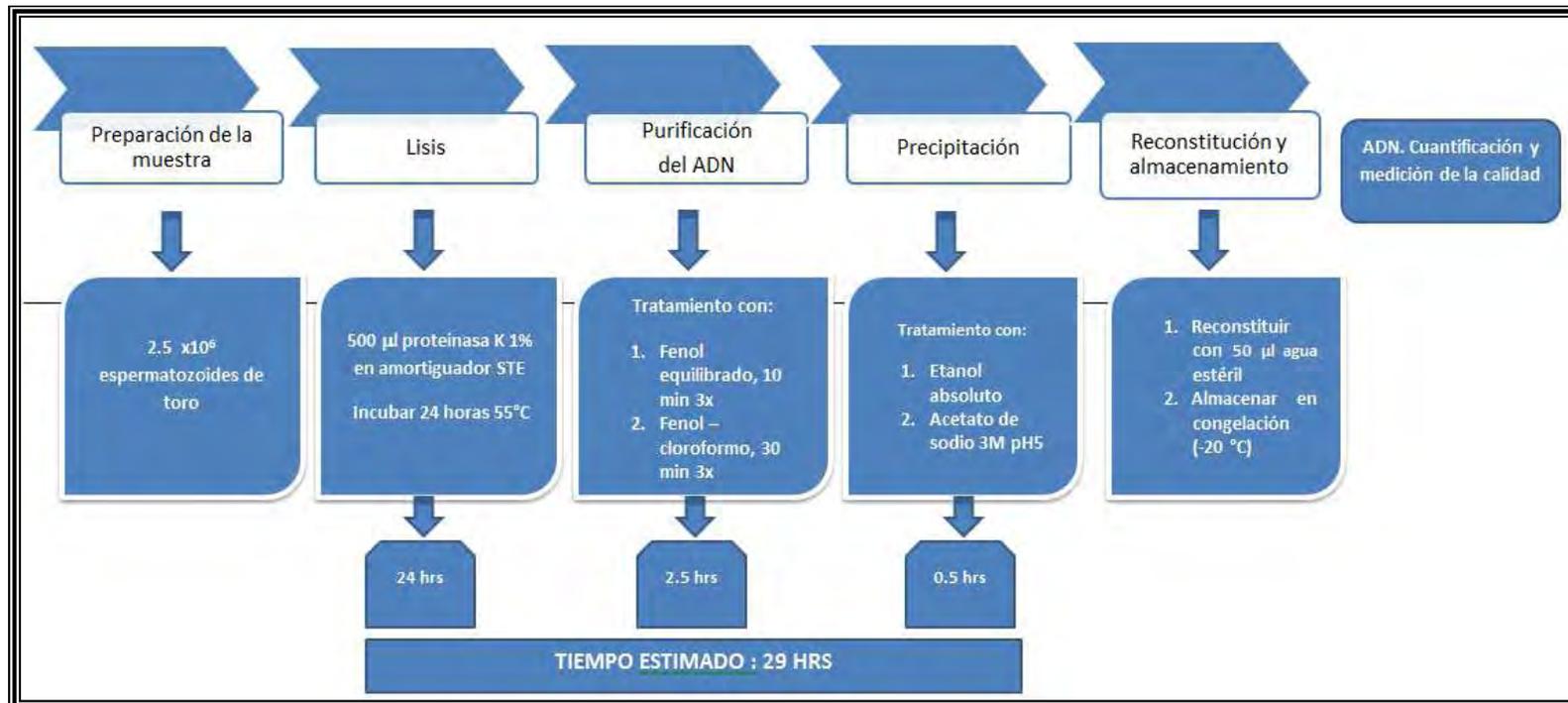
- 1.2. Realizar 3 lavados con 500 μl de solución PBS centrifugando a 3500 rpm por 3 minutos

- 1.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado y reconstituir con 500 μ l de PBS
2. Lisis
 - 2.1. Agregar 500 μ l de solución de lisis preparada con proteinasa K 1% (Sigma Aldrich. Cat. P4850) en amortiguador STE 1x pH 8.0 (NaCl (100mM); Tris-HCl, pH 8.0 (10mM); EDTA (1mM)).
 - 2.2. Incubar 24 horas a 55°C
 - 2.3. Realizar 2 lavados con 500 μ l de tris 50 mM, centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
 - 2.4. Retirar el sobrenadante y reconstituir con 500 μ l de Tris – HCl (SIGMA, cat. T1503-500G) 50 mM pH 8.9
3. Purificación del ADN
 - 3.1. Adicionar 500 μ l de fenol equilibrado (USB Corporation, cat. 75829), y mezclar vigorosamente
 - 3.2. Centrifugar a 13000 rpm, por 10 min
 - 3.3. Descartar la fase del fondo por aspiración
 - 3.4. Repetir el paso 3.1 y 3.2 por duplicado
 - 3.5. Adicionar 500 μ l de fenol – cloroformo (USB Corporation, cat. 75831)
 - 3.6. Agitar durante 30 minutos
 - 3.7. Centrifugar a 13000 rpm, por 10 min
 - 3.8. Descartar la fase del fondo por aspiración
 - 3.9. Repetir el paso 3.5 al 3.7 por duplicado
 - 3.10. Descartar la fase del fondo por aspiración
 - 3.11. Reconstituir con 500 μ l de Tris – HCl (SIGMA, cat. T1503-500G) 50 mM pH 8.9

4. Precipitación del ADN
 - 4.1. Agregar 1 ml de etanol al 70%
 - 4.2. Agitar gentilmente evitando que se desprenda el ovillo de ADN del fondo
 - 4.3. Agregar 50 μ l de acetato de sodio 3M pH5
 - 4.4. Incubar a -20°C durante 20 minutos
 - 4.5. centrifugar a 10,000 rpm, por 10 min, a -4°C
 - 4.6. Descartar el sobrenadante
 - 4.7. Agregar 1 ml de etanol al 70%, agitando
 - 4.8. Agitar gentilmente evitando que se desprenda el ovillo de ADN del fondo
 - 4.9. Eliminar el alcohol por aspiración

5. Reconstitución
 - 5.1. Reconstituir con 50 μ l de agua estéril
 - 5.2. Almacenar en congelación (-20°C)

Diagrama 1. Proceso del Método de extracción 1



- Método de extracción 2

Considerando que las estructuras espermáticas difieren del resto de las células se probó un método diseñado específicamente para el espermatozoide bovino con base en los reactivos que se utilizan de manera convencional. Se reemplazó el empleo de proteinasa K por una solución de lisis compuesta de papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9 y se eliminó el empleo de fenol-cloroformo al reemplazarlo por los detergentes CTAB y SDS. Las consideraciones para el empleo de éstos reactivos fueron:

1. La solución de lisis que permitiría la degradación de los elementos proteicos contenía:
 - a. Una proteinasa que actuaría sobre los componentes de naturaleza proteica
 - b. DTT para la liberación del ADN de las células somáticas presentes en el semen, logrando una extracción diferencial
 - c. DMSO, el cual actúa como protector del ADN nuclear
2. Un detergente con acción desnaturalizante de proteínas que actuaría sobre la teca perinuclear, la principal estructura protectora del ADN espermático

El método dos se describe de forma general en el Diagrama 2 y a detalle a continuación:

1. Preparación de la muestra
 - 1.1. Colocar en viales las muestras de 2.5×10^6 espermatozoides de toro.
 - 1.2. Realizar 3 lavados con solución PBS centrifugando a 3500rpm, 5 minutos
 - 1.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado
2. Lisis
 - 2.1. Agregar 50 μ l de solución de lisis (papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9)
 - 2.2. Incubar 30 min a 37°C

- 2.3. Realizar 2 lavados con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 2.4. Retirar el sobrenadante después del último lavado
- 2.5. Agregar 50 μ l de CTAB 10% (Sigma Aldrich, cat. 52365)
- 2.6. Incubar a temperatura ambiente 5 minutos
- 2.7. Realizar dos lavados con agua destilada estéril centrifugando a 11 000 rpm, 5 min y retirar el sobrenadante
- 2.8. Retirar el sobrenadante y reconstituir con μ l de Tris – HCl 50 mM pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)
- 2.9. Agregar 50 μ l de SDS 20% (Bio-rad, cat. 161-0302)
- 2.10. incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente
- 2.11. Realizar dos lavados con agua destilada estéril centrifugando a 11 000 rpm, 5 min y retirar el sobrenadante
- 2.12. Reconstituir con 50 μ l de Tris – HCl 50 mM pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)

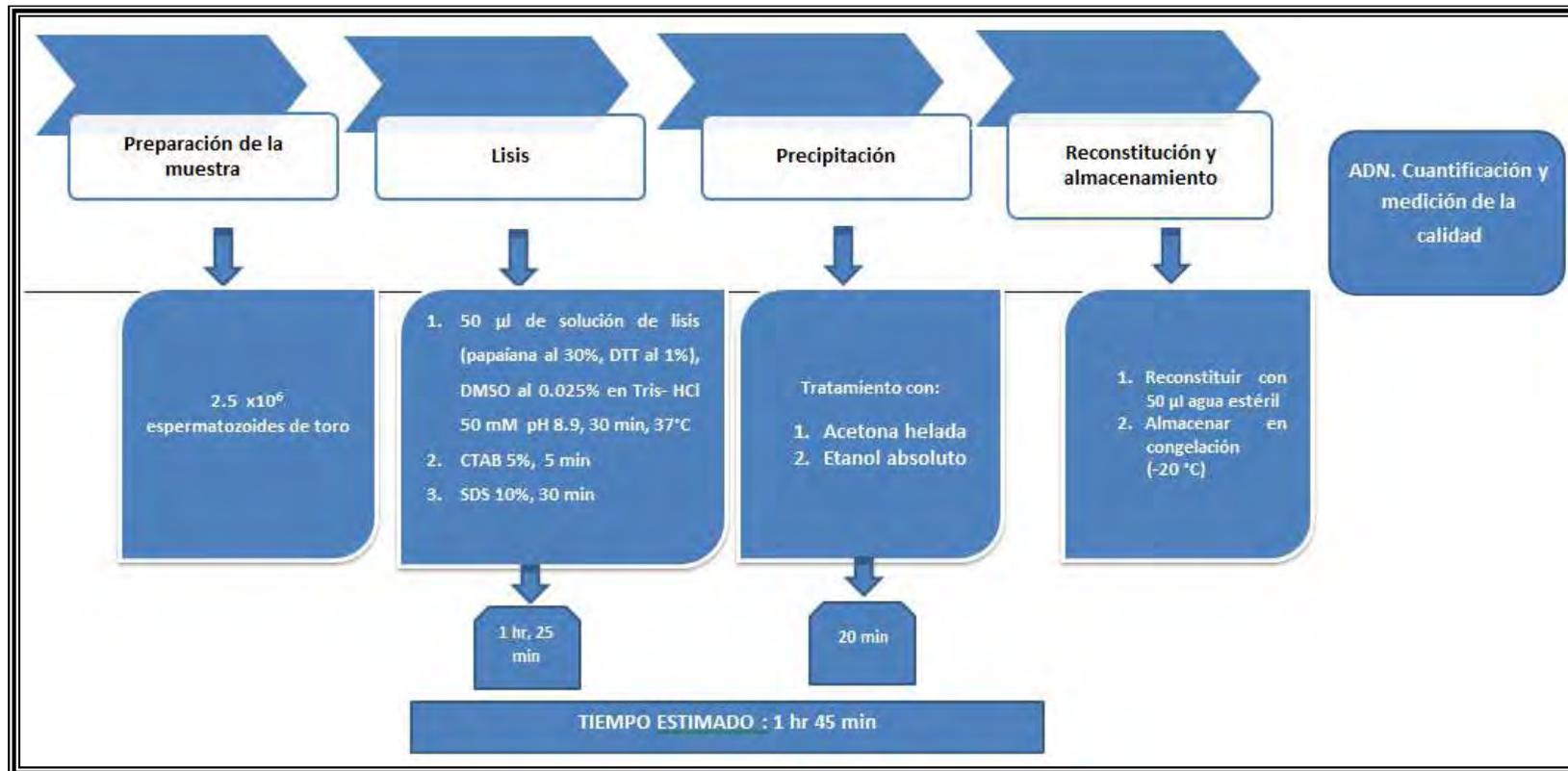
3. Precipitación del ADN

- 3.1. Agregar 300 μ l de acetona helada y agitar ligeramente
- 3.2. Centrifugar a 5000 rpm, 5
- 3.3. Descartar el sobrenadante
- 3.4. Agregar 3 00 μ l de etanol absoluto y agitar ligeramente
- 3.5. Centrifugar a 5000 rpm, 5min
- 3.6. Descartar el sobrenadante por aspiración y decantar con cuidado el exceso que no se puede aspirar
- 3.7. Dejar 5 min con la tapa abierta colocando los viales bocabajo sobre gasa estéril para que volatilice el remanente

4. Reconstitución

- 4.1. Reconstituir con 50 μ l Tris 10mM pH 9 a 37°C (SIGMA, cat. T1503-500G)
- 4.2. Almacenar en congelación (-20 °C)

Diagrama 2. Proceso del Método de extracción 2



- Método de extracción 3

Se integró el empleo de un detergente previamente a la adición de la solución de lisis con el objetivo de solubilizar la membrana, lo cual dejaría al núcleo espermático protegido únicamente por la teca perinuclear y permitiría la acción directa de la solución de lisis. El método tres se describe de forma general en el Diagrama 3 y a continuación se describe en detalle:

1. Preparación de la muestra

- 1.1. Colocar en viales las muestras de espermatozoides de toro 2.5×10^6 .
- 1.2. Realizar 3 lavados con solución PBS centrifugando a 3500, 3 minutos
- 1.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado

2. Tratamiento desmembranante

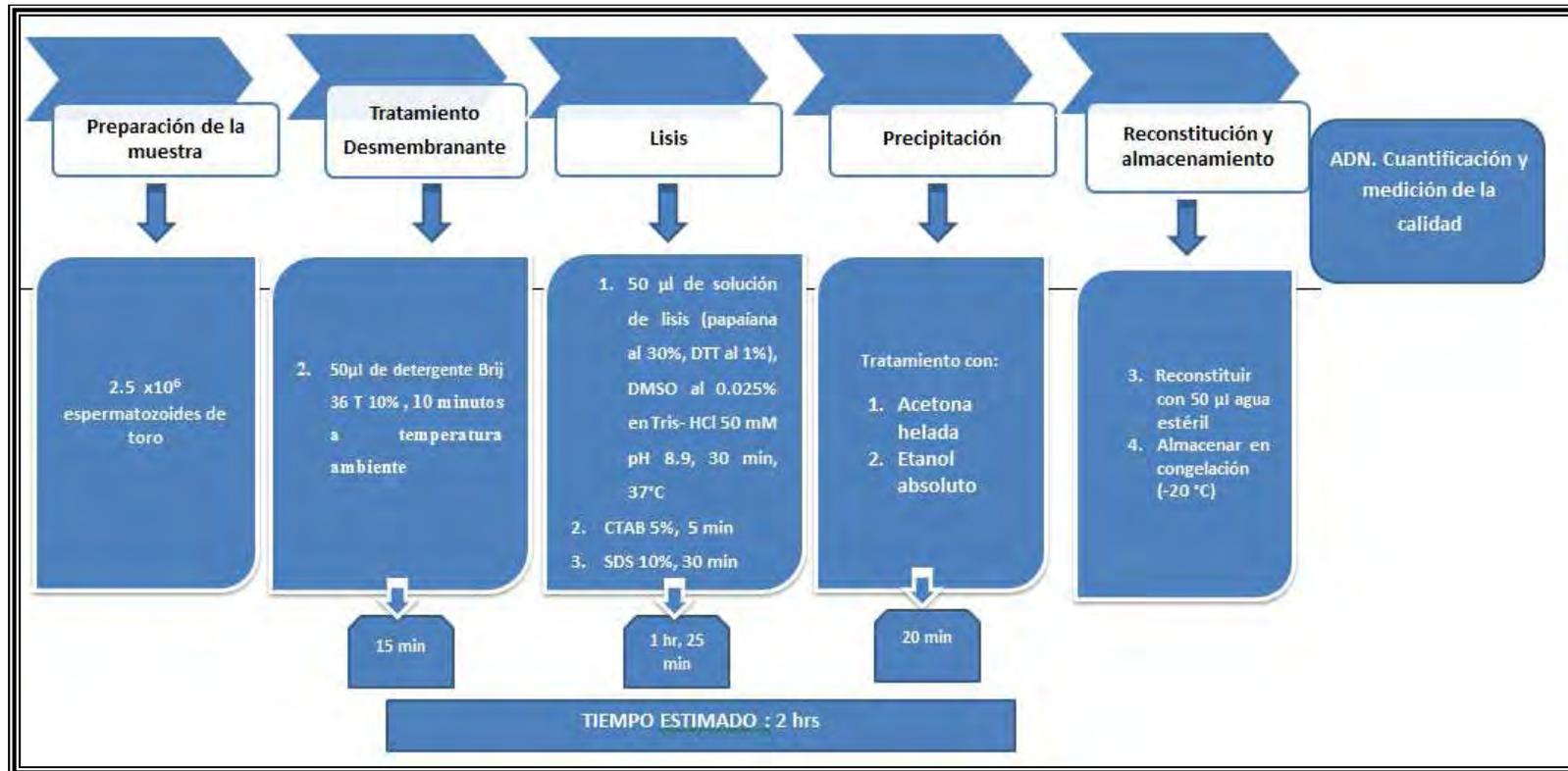
- 2.1. Agregar 50µl de detergente Brij 36 T 10%
- 2.2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- 2.3. Centrifugar a 3500 rpm, 5 min
- 2.4. Retirar el sobrenadante y reconstituir con 50µl de PBS

3. Lisis

- 4.3. Agregar 50 µl de solución de lisis (papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9)
- 3.1. Incubar 30 min a 37°C
- 3.2. Realizar 2 lavados con 500 µl de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 3.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado
- 3.4. Agregar 50 µl de CTAB 10% (Sigma Aldrich, cat. 52365)
- 3.5. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- 3.6. Realizar dos lavados con agua destilada estéril centrifugando a 11 000 rpm, 5 min
- 3.7. Retirar el sobrenadante y reconstituir con µl de Tris – HCl 50 mM pH 8.9

- 3.8. Agregar 50 μ l de SDS 20% e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente
 - 3.9. Realizar 2 lavados con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
 - 3.10. Retirar el sobrenadante después del último lavado
 - 3.11. Reconstituir el ADN sedimentado con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)
4. Precipitación del ADN
- 4.1. Agregar 300 μ l de acetona helada y agitar ligeramente
 - 4.2. Centrifugar a 5000 rpm, 5
 - 4.3. Descartar el sobrenadante
 - 4.4. Agregar 3 00 μ l de etanol absoluto y agitar ligeramente
 - 4.5. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 4.6. Descartar el sobrenadante por aspiración y decantar con cuidado el exceso que no se puede aspirar
 - 4.7. Dejar 5 min con la tapa abierta colocando los viales bocabajo sobre gasa estéril para que volatilice el remanente
5. Reconstitución
- 5.1. Reconstituir con 50 μ l Tris 10mM pH 9 a 37°C (SIGMA, cat. T1503-500G)
 - 5.2. Almacenar en congelación (-20 °C)

Diagrama 3. Proceso del Método de extracción 3



- Método de extracción 4

Se incorporó el empleo de una solución descondensante compuesta por DTT y heparina debido a su acción directa sobre los elementos que compactan el ADN espermático, con el objetivo de liberarlo de su estructura ultracompacta. El método se describe a continuación, mientras que en el Diagrama 4 se describe el proceso de forma general.

1. Preparación de la muestra

- 1.1. Colocar en viales las muestras de espermatozoides de toro 2.5×10^6 .
- 1.2. Realizar 3 lavados con solución PBS centrifugando a 5000 rpm, 3-5 minutos
- 1.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado

2. Tratamiento desmembranante

- 2.1. Agregar 50µl de detergente Brij 36 T 10%
- 2.2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente
- 2.3. Centrifugar a 3500 rpm, 5 min
- 2.4. Retirar el sobrenadante y reconstituir con 50µl de PBS

3. Lisis

- 4.4. Agregar 50 µl de solución de lisis (papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9)
- 3.1. Incubar 30 min a 37°C
- 4.5. Realizar 2 lavados con 500 µl de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 4.6. Retirar el sobrenadante después del último lavado
- 3.2. Agregar 50 µl de CTAB 20% (Sigma Aldrich, cat. 52365)
- 3.3. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente
- 3.4. Centrifugar 11 000 rpm, 5 minutos
- 3.5. Retirar el sobrenadante, reconstituir con 100 µl
- 3.6. Centrifugar 11 000 rpm, 5 min

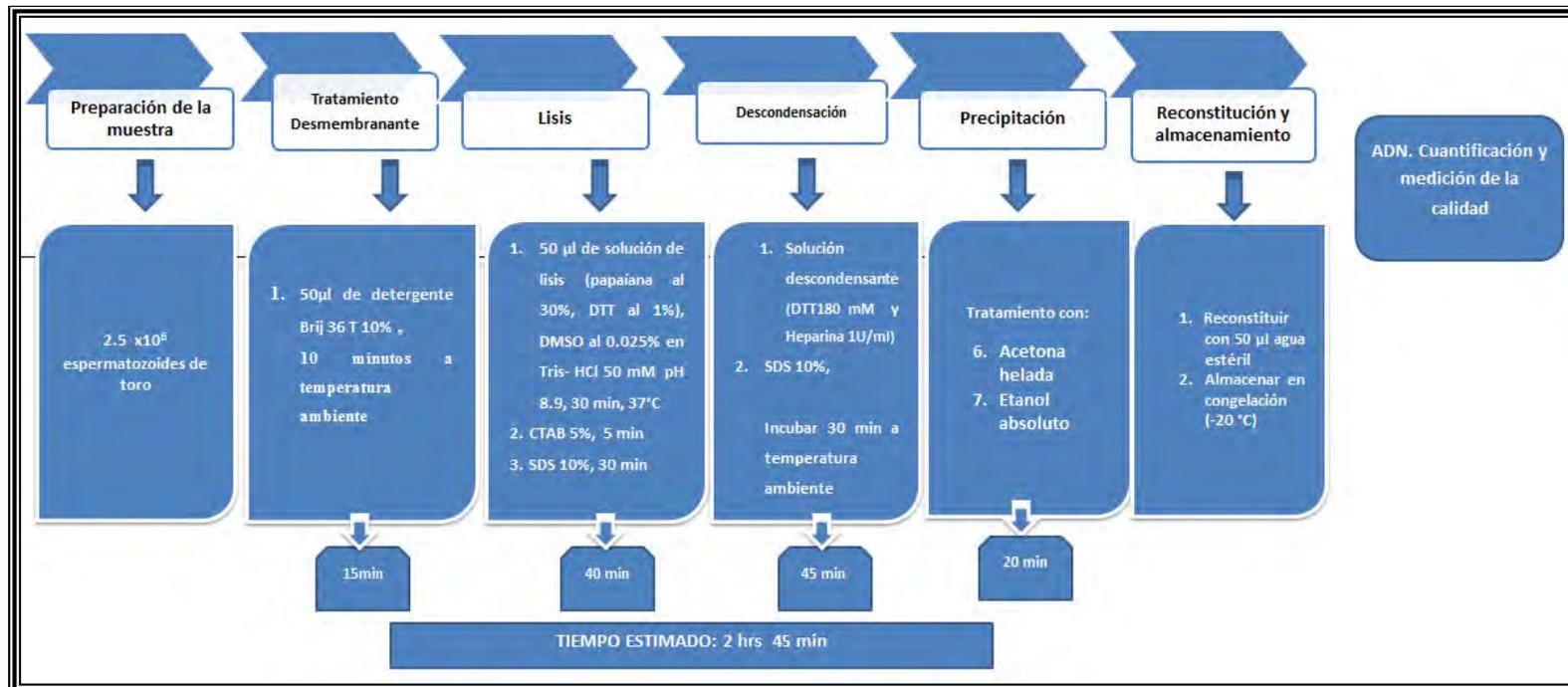
- 3.7. Retirar el sobrenadante y reconstituir con μl de Tris – HCl 50 mM pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)

4. Descondensación
 - 4.1. Agregar 50 μl de SDS 20% (Bio-rad, cat. 161-0302) y 50 μl de solución descondensante (DTT180 mM y Heparina 1U/ml) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente
 - 4.2. Realizar 2 lavados con 500 μl de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
 - 4.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado
 - 4.4. Reconstituir el ADN sedimentado con 500 μl de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)

5. Precipitación del ADN
 - 5.1. Agregar 300 – 500 μl de acetona helada y agitar ligeramente
 - 5.2. Centrifugar a 5000 rpm, 5
 - 5.3. Descartar el sobrenadante
 - 5.4. Agregar 3 00 μl de etanol absoluto y agitar ligeramente
 - 5.5. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 5.6. Descartar el sobrenadante por aspiración y decantar con cuidado el exceso que no se puede aspirar
 - 5.7. Dejar 5 min con la tapa abierta colocando los viales bocabajo sobre gasa estéril para que volatilice el remanente

6. Reconstitución
 - 6.1. Reconstituir con 50 μl Tris 10mM pH 9 a 37°C (SIGMA, cat. T1503-500G)
 - 6.2. Almacenar en congelación (-20 °C)

Diagrama 4. Proceso del Método de extracción 4



- Método de extracción 5:

Con el objetivo de reducir el empleo de detergentes y en consecuencia reducir el costo y tiempo del proceso se eliminó el empleo de Brij y del CTAB empleando al SDS como único detergente en dos momentos del proceso: 1) al inicio como detergente desmembrante y 2) después de la solución de lisis por su actividad desnaturante de proteínas. La metodología seguida se describe a continuación y el proceso de forma general se muestra en el Diagrama 5.

1. Preparación de la muestra

- 1.1. Colocar en viales las muestras de espermatozoides de toro 2.5 x10⁶.
- 1.2. b. Realizar 3 lavados con solución PBS centrifugando a 3500-5000 rpm, 3-5 minutos
- 1.3. c. Retirar el sobrenadante después del último lavado

2. Tratamiento desmembrante

- 2.1. Agregar 50µl de detergente SDS 20%
- 2.2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

3. Lisis

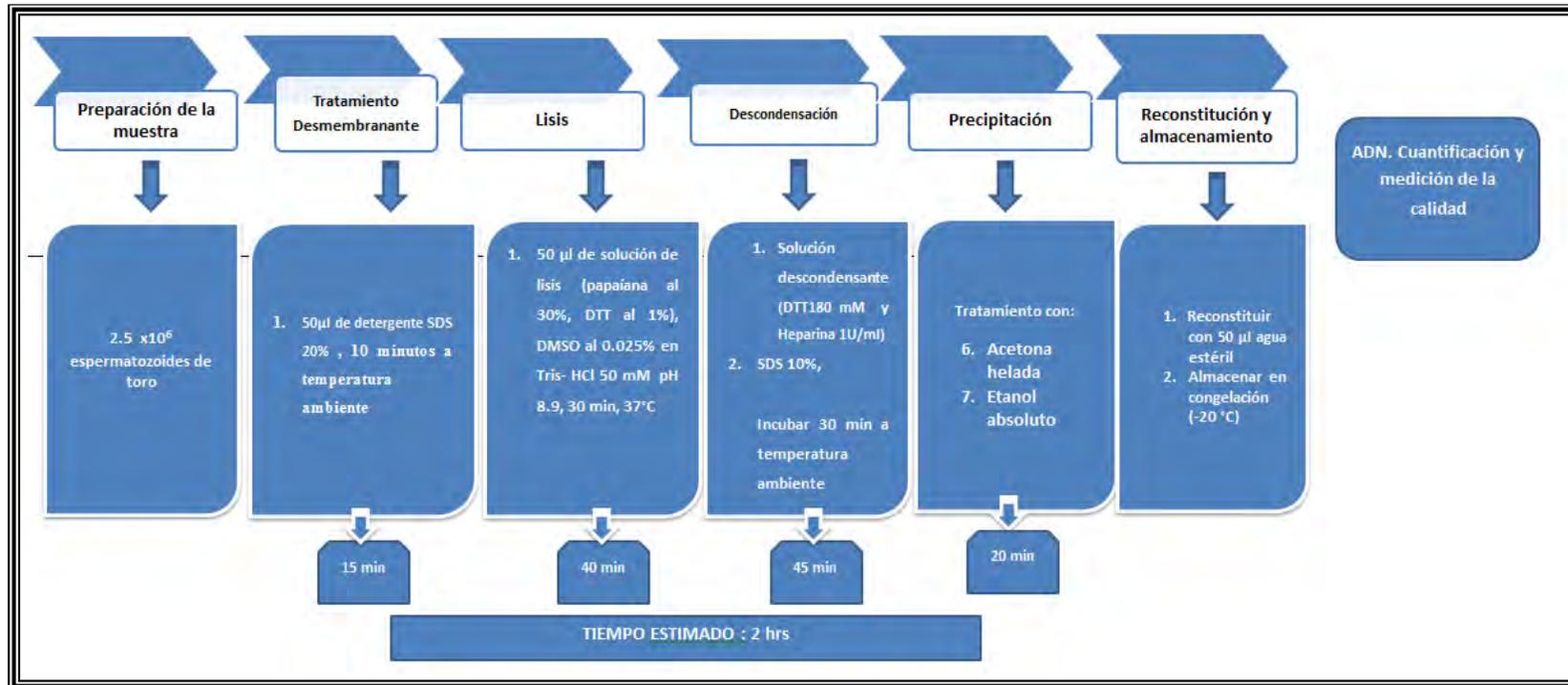
- 4.7. Agregar 50 µl de solución de lisis (papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9)
- 3.1. Incubar 30 min a 37°C
- 4.8. Realizar 2 lavados con 500 µl de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 4.9. Retirar el sobrenadante después del último lavado

4. Descondensación

- 4.1. Agregar 20 µl de SDS 20% (Bio-rad, cat. 161-0302) y 50 µl de solución descondensante (DTT180 mM y Heparina 1U/ml) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente

- 4.2. Realizar 2 lavados con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
 - 4.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado
 - 4.4. Reconstituir el ADN sedimentado con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)
5. Precipitación del ADN
- 5.1. Agregar 300 μ l de acetona helada y agitar ligeramente
 - 5.2. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 5.3. Descartar el sobrenadante
 - 5.4. Agregar 3 00 μ l de etanol absoluto y agitar ligeramente
 - 5.5. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 5.6. Descartar el sobrenadante por aspiración y decantar con cuidado el exceso que no se puede aspirar
 - 5.7. Dejar 5 min con la tapa abierta colocando los viales bocabajo sobre gasa estéril para que volatilice el remanente
6. Reconstitución
- 6.1. Reconstituir con 50 μ l Tris 10mM pH 9 a 37°C (SIGMA, cat. T1503-500G)
 - 6.2. Almacenar en congelación (-20 °C)

Diagrama 5. Proceso del Método de extracción 5



- Método de extracción 6

Se integró el CTAB como detergente desmembranante y se conservó al SDS después de la solución de lisis. El método se describe a continuación y de forma general en el Diagrama 6.

1. Preparación de la muestra

- 1.1. Colocar en viales las muestras de espermatozoides de toro 2.5×10^6 .
- 1.2. Realizar 3 lavados con solución PBS centrifugando a 3500 rpm, 3-5 minutos
- 1.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado

2. Tratamiento desmembranante

- 2.1. Agregar 50 μ l de CTAB 10% (Sigma Aldrich, cat. 52365)
- 2.2. Incubar 10 min a 30°C

3. Lisis

- 4.10. Agregar 50 μ l de solución de lisis (papaína al 30% (SIGMA, cat. P3375-25G), DTT al 1% (SIGMA, cat. D-0632), DMSO al 0.025% (SIGMA, cat. D5879-100ML) en Tris- HCl 50 mM (SIGMA, cat. T1503-500G) pH 8.9)
- 3.1. Incubar 30 min a 37 °C
- 3.2. Realizar 2 lavados con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 3.3. Retirar el sobrenadante después del último lavado

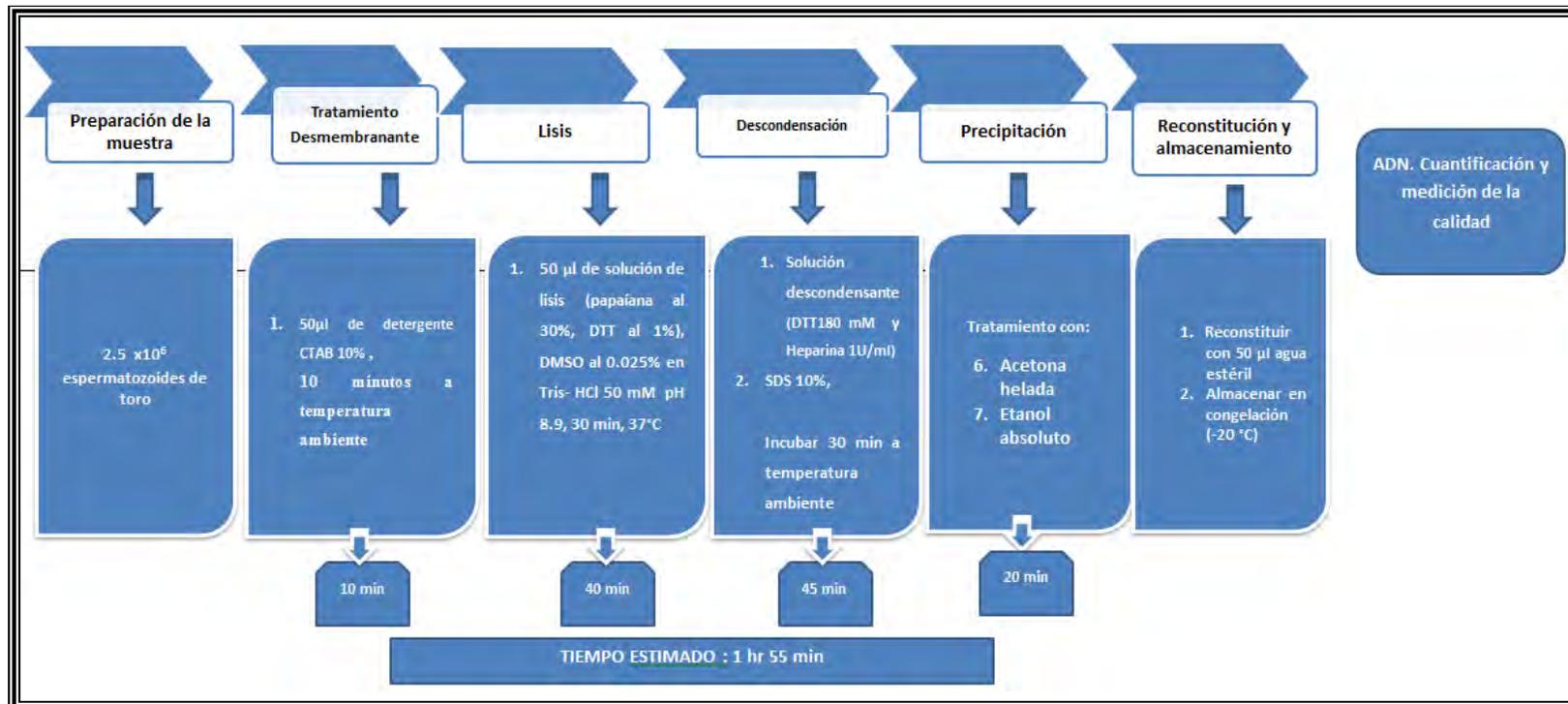
4. Descondensación

- 4.1. Agregar 50 μ l de solución descondensante (DTT180 mM y Heparina 1U/ml) y 50 - 100 μ l de SDS 20% (Bio-rad, cat. 161-0302)
- 4.2. Incubar 30min a temperatura ambiente
- 4.3. Realizar 2 lavados con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G), centrifugando a 11,000 rpm, 5 min
- 4.4. Retirar el sobrenadante después del último lavado
- 4.5. Reconstituir el ADN sedimentado con 500 μ l de Tris- HCl pH 8.9 (SIGMA, cat. T1503-500G)

5. Precipitación del ADN
 - 5.1. Agregar 300 μ l de acetona helada y agitar ligeramente
 - 5.2. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 5.3. Descartar el sobrenadante
 - 5.4. Agregar 300 μ l de etanol absoluto y agitar ligeramente
 - 5.5. Centrifugar a 5000 rpm, 5 min
 - 5.6. Descartar el sobrenadante por aspiración y decantar con cuidado el exceso que no se puede aspirar
 - 5.7. Dejar con la tapa abierta boca abajo sobre gasa estéril para que volatilice el remanente

6. Reconstitución
 - 6.1. Reconstituir con 50 μ l Tris 10mM pH 9 a 37°C (SIGMA, cat. T1503-500G)
 - 6.2. Almacenar en congelación (-20 °C)

Diagrama 6. Proceso del Método de extracción 6



En todos los métodos, después de la extracción, se cuantificó la concentración del ADN extraído a una absorbancia de 260 nm y simultáneamente se determinó la relación 260/280 nm mediante espectrofotometría (NanoDrop, ND-1000).

Las diferencias entre los 6 métodos se describen en el Cuadro 3:

Cuadro 3 Resumen de las modificaciones realizadas entre los métodos

Método	Tratamiento desmembranante	Lisis	Descondensación	Precipitación y eliminación de sales
1		Proteinasa K 1% , 24 hrs		Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)
2		Solución de lisis (Papaína 30%, DTT 1%, DMSO 0.025% en Tris – HCl 50 mM), 30 min. CTAB 5%, 5 min SDS10%, 30 min		Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)
3	Brij 36 T 10%, 10 min	Solución de lisis (Papaína 30%, DTT 1%, DMSO 0.025% en Tris – HCl 50 mM), 30 min CTAB 5%, 5 min	Solución descondensante (DTT y Heparina) SDS10% 30 min	Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)
4	Brij 36 T 10%, 10 min	Solución de lisis (Papaína 30%, DTT 1%, DMSO 0.025% en Tris – HCl 50 mM), 30 min	Solución descondensante (DTT y Heparina) SDS10% 30 min	Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)
5	SDS 20%, 10 min	Solución de lisis (Papaína 30%, DTT 1%, DMSO 0.025% en Tris – HCl 50 mM), 30 min	Solución descondensante (DTT y Heparina) SDS 20% 30 min	Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)
6	CTAB 10%, 10 min	Solución de lisis (Papaína 30%, DTT 1%, DMSO 0.025% en Tris – HCl 50 mM), 30 min	Solución descondensante (DTT y Heparina) SDS 20% 30 min	Acetona helada (300 µl) Lavados con Etanol (300 µl)

Evaluación de la calidad y rendimiento del ADN extraído

La calidad y la concentración del ADN extraído por los 5 métodos de extracción se determinó mediante espectrofotometría con luz UV, midiéndose la absorbancia a 260 nm y simultáneamente se determinó la relación 260/280 nm y 260/230 nm (NanoDrop, ND-1000).

Los valores obtenidos fueron comparados con los parámetros óptimos:

- Concentración mínima= 50ng/μl
- Calidad
 - 260/280 mínima=1.7
 - 260/230 mínima= 1.5

El ADN obtenido por el método que cumplió con los parámetros fue evaluado en integridad y presencia de inhibidores de las reacciones de PCR.

Evaluación de la integridad del ADN

Las muestras de ADN extraídas por el sexto método fueron corridas en geles de agarosa al 0.8%, diluida en TAE 1x (tris, acetato y EDTA, Bio-Rad, 50X TAE cat. 151-0773) y 5% de bromuro de etidio (a una concentración 10mg/ml) (SIGMA, cat. E8751), empleando como amortiguador de cámara TAE 1x. Se cargaron 3μl de las soluciones de ADN más 3μl de buffer de carga en los pozos del gel. En el primer pozo se cargaron 5μl de marcadores de peso molecular (1Kb Plus ladder, Invitrogen, cat. 10787-026).

Las muestras se corrieron durante 60 minutos a 80 V empleando una cámara de electroforesis horizontal (CLP, Apollo), conectada a una fuente de poder (Bio-Rad, Power pac 200). Posteriormente los geles fueron visualizados en un fotodocumentador y las fotografías capturadas con una cámara Nikon Coolpix. Las muestras que corrieron de forma uniforme como banda única sin presentar un barrido se consideraron como íntegras mientras que aquellas que presentaban un barrido se consideraron como fragmentadas y, por lo tanto, inadecuadas para ser utilizadas en reacciones de PCR.

Evaluación de la presencia de inhibidores de PCR

Se determinó la ausencia de inhibidores de las reacciones de PCR del ADN extraído con el método número 6 por proporcionar las mejores concentraciones y calidad de ADN extraído, para este fin se utilizaron los iniciadores del gen ACTB diseñados previamente (Vázquez- Aguirre M, 2008) mediante el empleo del software Oligo® v. 6.8 (Molecular Biology Insight, Inc), correspondiente al gen de β -actina ubicado en un cromosoma autosómico, cuyo producto es de 157 pb aproximadamente. Las secuencias se indican a continuación:

Forward 5'- CCC ATT GAG CAC GGC ATC GTC 3'

Reverse 5'- TCT GGG TCA TCT TCT CAC GGT TGG C 3'

Como control positivo para todas las reacciones se utilizó el primer control incluido con el kit de la Taq polimerasa Titanium (Clontech, cat. 75831) cuya secuencia es:

Forward 5'-CTTGTCTTAATCTTCCTCCTCACGGCA-3'

Reverse 5'-TGGCACGGCCATAAGAGGTAGATGTCA-3'

La amplificación del iniciador para ACTB y del control de la Taq fueron utilizados para monitorear el estado de la muestra de ADN y la amplificación en PCR. Los productos de cada reacción se corrieron por electroforesis en geles de agarosa y las bandas resultantes de la amplificación de cada gen fueron visualizadas en un fotodocumentador.

Estandarización de las condiciones de amplificación óptimas para los genes SRY y β -actina

Temperatura de alineación óptima

Para estandarizar las condiciones óptimas de amplificación para las secuencias de los genes ACTB se realizó un PCR en punto final modificando las temperaturas de alineación en un gradiente de temperatura.

Cada mezcla de reacción contenía un volumen final de 25 µl y se componía de 1 U de Titanium Taq polimerasas, 1x PCR buffer, 0.1 nM de la mezcla de nucleótidos, 10 µM de la mezcla de cebadores (forward y reverse). Las condiciones de amplificación usadas fueron 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 55, 58, 61, 65 y 68°C; 30 s a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Para éstos ensayos se utilizaron muestras de ADN extraído de los espermatozoides por el método 5 y la muestra de ADN y primer control proporcionada en el kit de la Taq Titanium como control interno de la amplificación.

Los productos de esta reacción fueron corridos en geles de agarosa al 0.8% y visualizados en un trasiluminador para identificar la temperatura de alineación que generaran bandas de la misma intensidad, considerando a esta la temperatura más eficiente para ambos genes.

Proporción óptima de cebadores

Para determinar la concentración óptima de los cebadores se realizaron reacciones de PCR en punto final empleando las proporciones mostradas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Proporción de cebadores evaluadas

Proporción cebadores (%)	
Forward	Reverse
0	100
25	75
50	50
50	75
75	25

Las mezclas de reacción fueron preparadas por separado en viales de 0.2 ml para el gen ACTB y para un gen y ADN control incluido en el kit de amplificación, conteniendo en un volumen final de 25 µl: 9.3 µl de agua, 1.5 µl de SYBR mix (SIGMA); 200, 100, 50, 25 o 12.5 ng del ADN genómico y

1 U de taq titanium. Las condiciones de ciclaje utilizadas fueron 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C; 30 s a 68°C; 30 s a 72°C y una extensión final de 5 min a 72°C.

Para éstos ensayos se utilizaron muestras de ADN extraídas de los espermatozoides por el método 5 y la muestra de ADN y primer control proporcionada en el kit de la Taq Titanium como control interno de la amplificación.

Los productos de amplificación fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% diluida en TAE 1x (tris, acetato y EDTA) y 5% de bromuro de etidio (a una concentración de 10mg/ml). A cada muestra se le añadieron 5µl de amortiguador de carga por cada 25µl de reacción y se cargó en cada pozo 12µl de muestra. Las condiciones de corrida fueron 100V por 30 minutos. Finalmente el gel fue visualizado en un transiluminador para visualizar las bandas únicas correspondientes al tamaño de los amplicones del fragmento del gen ACTB para identificar la banda de mayor grosor y fluorescencia que indicaría las mejores condiciones de amplificación.

Una vez que se estandarizaron las condiciones de amplificación para el gen ACTB se realizaron reacciones de PCR utilizando cada una de las muestras obtenidas mediante el método de extracción 6. Cada reacción de PCR de 25µl se preparó en microtubos de 0.25 ml. Cada mezcla de reacción de 25 µl contenía 1x PCR buffer (Clontech, cat. S1793), 0.33 mM del mix de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP) (Clontech, cat. 639125), 0.33 µM de la mezcla de cebadores (forward y reverse), 0.33x Titanium™ Taq polimerasa (Clontech, cat. 75831). Las condiciones de amplificación fueron: 94° C, 5 min; 35 ciclos a 94°C, 30 s; 68°C por 30s, extensión final a 72°C, 3 min (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler).

Los productos de amplificación se verificaron en geles de agarosa al 1.2% en TAE 1x (tris, acetato y EDTA, Bio-Rad, 50X TAE cat. 151-0773) y 5%de bromuro de etidio (a una concentración 10mg/ml) (SIGMA, cat. E8751), empleando como amortiguador de cámara TAE 1x. Cada mezcla de reacción se adicionó con 3µl de buffer de carga (Orange G, SIGMA, cat. O3756) y se cargaron 15 µl de muestra en los pozos del gel. En el primer pozo se cargaron 5µl de marcadores de peso molecular (1Kb Plus ladder, Invitrogen, cat. 10787-026).

Las muestras se corrieron durante 30 minutos a 120 V empleando una cámara de electroforesis horizontal (CLP, Apollo) conectada a una fuente de poder (Bio-Rad, Power pac 200).

Los geles fueron observados en un transiluminador (Bio-Rad, UV transiluminator 2000) para visualizar los productos de PCR teñidos con EtBr. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Nikon. La presencia de una banda única equivalente al peso molecular de los cebadores se consideró como una reacción positiva de PCR, lo cual indica la ausencia de sustancias inhibidoras de las reacciones en el ADN extraído.

Evaluación de la eficiencia de la extracción del ADN

Debido a que se obtuvo la mejor concentración y calidad en las muestras de ADN extraídas con el método de extracción 6 se evaluó su eficiencia determinando la cantidad mínima de espermatozoides requerida para obtener cantidades adecuadas de ADN (mínimo 50ng/μl).

Se seleccionó al azar una de las muestras control de espermatozoides almacenados en congelación. Los ensayos de extracción se realizaron utilizando diferentes concentraciones de células totales por extracción de ADN (0.5, 1, 2.5 y 5×10^6 espermatozoides totales). El ADN fue extraído como se describe en el método modificación 5 (método 6). El ADN obtenido fue almacenado a -20°C para su posterior cuantificación y evaluación de la calidad mediante espectrofotometría.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de las mediciones de concentraciones y calidad del ADN fueron evaluados mediante la prueba de Kruskal Wallis y posteriormente con el Test de Dunn para determinar la diferencia estadística entre los valores de las 4 técnicas de extracción evaluadas.

VIII. RESULTADOS

Métodos de extracción de ADN

En este trabajo fue posible estandarizar un método de extracción de ADN genómico de espermatozoides de toro, para ello fue necesario realizar 5 modificaciones a partir de un método estandarizado en células, de éstas modificaciones se originaron 5 métodos de extracción diferentes.

La concentración y pureza (relación 260/280 y 260/230) se determinaron mediante espectrofotometría (Cuadro 5). Los valores obtenidos se compararon con los parámetros óptimos. Se evaluó la integridad y la presencia de sustancias inhibidoras del ADN obtenido por método que obtuvo los valores de concentración y pureza más altos. Una vez que se determinó que el método permitía obtener ADN íntegro y sin sustancias inhibidoras de las reacciones de PCR, se probó el método en espermatozoides frescos de toro.

De las cinco modificaciones surgieron cinco métodos para la extracción de ADN a partir de espermatozoides de toro previamente almacenados en congelación (-20°C).

El método inicial (método 1), el cual ha sido reportado para células somáticas, en el cual se emplea fenol-cloroformo, al ser aplicado en espermatozoides de toro permitió extraer ADN en concentraciones adecuadas así como valores óptimos en la relación 260/230, lo cual es indicativo de una escasa contaminación con carbohidratos y otros componentes celulares, sin embargo la calidad 260/280 es inferior al límite mínimo de 1.7, lo cual indica contaminación del ADN extraído con proteínas y fenoles.

Debido a lo anterior, la primera modificación al método original que se decidió realizar fue el reemplazó de la proteinasa K por una solución de lisis adicionada con papaína y el reemplazo del fenol-cloroformo por los detergentes SDS y CTAB. Este método permitió extraer mayores concentraciones de ADN y de mejor calidad, sin embargo la calidad fue insuficiente como para considerar al ADN extraído adecuado para su empleo en pruebas de biología molecular como PCR entre otras.

En el método 3, en el cuál se trató a los espermatozoides con un agente desmembranante (Brij 36-T) antes del tratamiento con la solución de lisis, permitió obtener concentraciones adecuadas de ADN. Aunque la calidad reflejada en la relación 260/280 incrementó con respecto a los otros dos métodos, no cumple con el mínimo estándar requerido para emplearse en pruebas de PCR, lo mismo ocurrió con la relación 260/230 (1.7 y 1.5 respectivamente).

En el método 4 de extracción adicionando una solución descondensante, constituida de DTT y heparina la cual tiene como objetivo disolver los enlaces disulfuro por acción del DTT y secuestrar las protaminas por acción de heparina dejando en estado libre al DNA espermático. Esta modificación permitió obtener mejores rendimientos de ADN que el método 1, 2 y 3. la calidad en los parámetros 260/280 y 260/230 cumplieron con el límite considerado adecuado para su empleo en pruebas de PCR, lo cual indica que el tratamiento con la solución descondensante eliminó la contaminación por proteínas.

El método 5, en el cual se trata a los espermatozoides directamente con SDS como agente desmembranante fue el que permitió extraer las más altas concentraciones de ADN, sin embargo la calidad no fue suficiente para ninguno de los indicadores, por lo que el ADN extraído no se consideró apto para emplearse en pruebas de PCR.

El método 6 en el cual se utilizan el detergente CTAB como agente desmembranante, papaína como solución de lisis y SDS, DTT y Heparina como agentes descondensantes del material genético del núcleo espermático fue el único con el cual se obtuvieron rendimientos y calidad del ADN adecuadas para su empleo en pruebas de PCR.

Cuadro 5. Comparación de la concentración y la calidad del ADN extraído de espermatozoides de bovino en los seis métodos de extracción

Protocolo	No. extracciones	Concentración ADN (ng/ μ l)	Pureza del ADN (260/280)	Pureza del ADN (260/230)	Tiempo
1	25	62.08 \pm 34.96 ^a	1.32 \pm 0.18 ^a	1.71 \pm 0.19 ^a	29 hrs
2	55	104.65 \pm 46.65 ^{ab}	1.39 \pm 0.26 ^a	1.32 \pm 0.07 ^b	1 hr, 45 min
3	55	118.9 \pm 42.6 ^b	1.45 \pm 0.18 ^a	1.35 \pm 0.07 ^b	2 hrs
4	55	135.62 \pm 72.37 ^b	1.59 \pm 0.26 ^b	1.28 \pm 0.42 ^b	2 hrs, 45 min
5	55	305.30 \pm 190.21 ^c	1.33 \pm 0.31 ^a	0.68 \pm 0.31 ^c	2 hrs
6	100	152.36 \pm 67.58 ^b	1.75 \pm 0.07 ^c	1.65 \pm 0.13 ^a	1 hrs, 55 min

^{a,b,c} Filas de la misma columna con literal diferente presentan diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$)

El método 6 fue probado con muestras de espermatozoides de eyaculados frescos para verificar su eficacia con este tipo de células. La calidad (260/280 y 260/230) se mantuvo constante, sin embargo el rendimiento fue menor que en la extracción a partir de los espermatozoides descongelados (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación de la concentración y la calidad del ADN extraído de espermatozoides de bovino proveniente de un eyaculado fresco y descongelado

Tipo de muestra	No. extracciones	Concentración ADN (ng/μl)	Pureza del ADN (260/280)	Pureza del ADN (260/230)
Semen descongelado	100	152.36 ±67.58 ^a	1.75 ±0.07 ^a	1.65±0.13 ^a
Semen fresco	55	62.34±35.68 ^b	1.73±0.05 ^a	1.62±0.17 ^a

^{a,b} Filas de la misma columna con literal diferente presentan diferencia estadísticamente significativa (P< 0.05)

Evaluación de la integridad del ADN

En las electroforesis las muestras de ADN extraído corrieron como bandas únicas sin mostrar degradación significativa, lo cual indica que el método de extracción 6 permite obtener ADN íntegro. La presencia de una banda única después de 60 minutos de corrida a 80 V indica que el ADN no está fragmentado y por lo tanto se considera íntegro y adecuado para su uso en pruebas de biología molecular, como PCR (Figura 1).

Evaluación de la presencia de inhibidores de PCR

Solo las muestras de ADN extraídas mediante el método 6 fueron evaluadas para determinar la presencia de sustancias inhibitoras en el DNA obtenido, ello mediante reacciones de PCR en las cuales se utilizó el gen β- actina. Los productos de la amplificación fueron corridos en geles de agarosa al 1% para evaluar la presencia de bandas únicas que correspondieran al peso molecular del gen amplificado (157pb) (Figura 2).

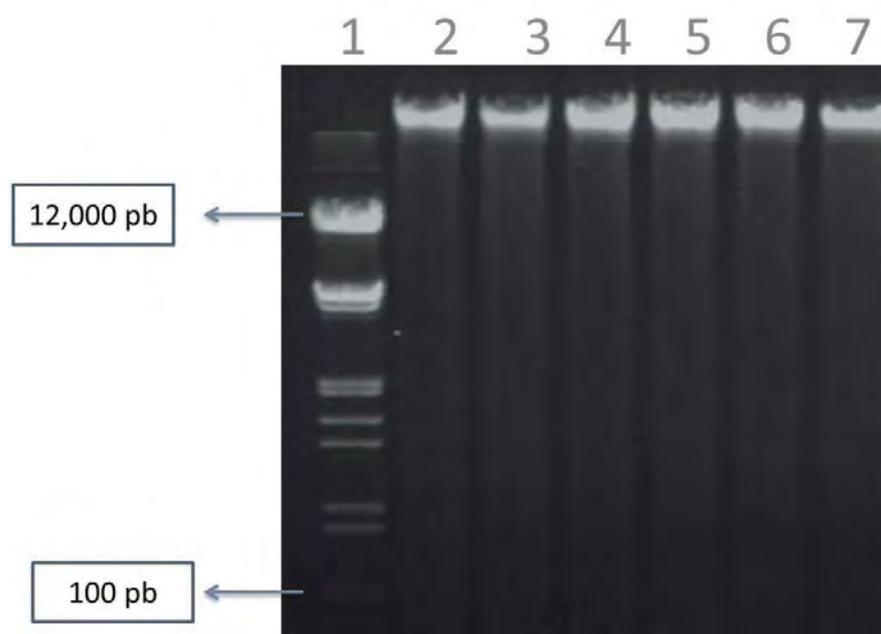


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de muestras de ADN genómico extraído de espermatozoides de toro congelado (3ng). El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. Los carriles 2 al 6 corresponden a las muestras de ADN extraído con el método 6.

Estandarización de las condiciones de amplificación óptimas para el gen β -actina

- Temperatura de alineación óptima

Para determinar la temperatura de alineación óptima para los genes β -actina se realizó un gradiente de temperatura en el cual se probaron 5 temperaturas de alineación de los cebadores. El gel de los productos amplificados mostró que la mejor amplificación se dio a 68°C.

- Proporción óptima de cebadores

Para determinar la proporción óptima para la mezcla de los cebadores para el gen β -actina se realizó realizaron reacciones de PCR empleando diferentes proporciones de cada cebador (forward y reverse).

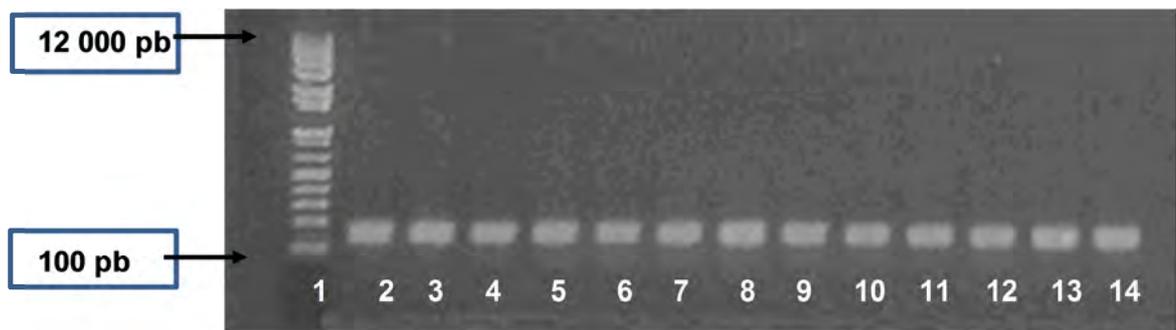


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación del gen β -actina empleando el ADN genómico extraído con el método 6 de espermatozoides congelados de bovino . El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 al 13 corresponde a los productos de amplificación del gen β -actina utilizando 13 muestras de ADN diferentes. El carril 14 corresponde a la amplificación del gen control contenido en el Kit de amplificación.

Evaluación de la eficiencia de la extracción del ADN

Para evaluar la eficiencia de la extracción con el método de extracción 5 se verificó la concentración y calidad del ADN utilizando distintas concentraciones de células espermáticas (0.5 , 1 , 2.5 y 5×10^6). Se realizaron 5 extracciones de cada concentración, el promedio de cada uno se muestra en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación de la concentración y la calidad del ADN extraído de espermatozoides de bovino en diferentes concentraciones de muestra.

No. espermatozoides totales x10 ⁶	ng/ μ l	260/280	260/230
0.5	37.0 ^a	1.736 ^a	1.59 ^a
1.0	76.5 ^b	1.606 ^a	1.71 ^a
2.5	134.6 ^c	1.706 ^a	1.66 ^a
5.0	233.8 ^d	1.722 ^a	1.63 ^a

^{a,b,c,d} Filas de la misma columna con literal diferente presentan diferencia estadísticamente significativa (P< 0.05)

Los resultados indican que el método de extracción 6 es adecuado para realizar extracciones de muestras pequeñas obteniendo concentraciones de ADN adecuadas para su empleo en reacciones de PCR. Con base a los resultados se recomienda el empleo del método de extracción 6 cuando se dispone de muestras pequeñas (desde 0.5x10⁶ espermatozoides para la extracción).

Resistencia al almacenamiento

Para evaluar la estabilidad de las muestras de ADN extraído y almacenado en Tris pH=9 a -20°C se corrió en un gel de electroforesis con las muestras de ADN almacenadas a) 0 días; b) 1 mes c) 3 meses; d) 6 meses. El gel de electroforesis mostró que el ADN se desplazaba como banda única lo cual indica que la integridad del ADN se conservó por periodos de hasta 6 meses (Figura 3).

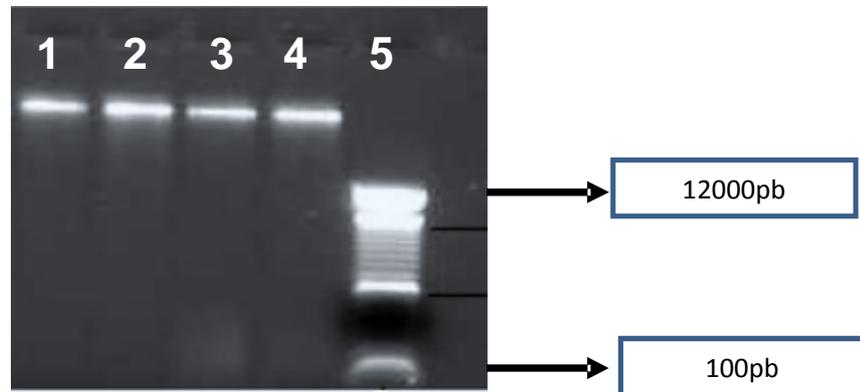


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN genómico extraído de espermatozoides de toro congelado (3ng) y almacenado. El carril 1 corresponde a la muestra de ADN sin almacenar, extraída el mismo día que se realizó el gel; el 2 corresponde a una muestra almacenada 1 mes; el 3 corresponde a una muestra almacenada durante 3 meses; el 4 corresponde a una muestra almacenada 6 meses y el 5 corresponde a los marcadores de peso molecular.

Para verificar la contaminación del ADN con sustancias inhibidoras de PCR se realizó una reacción de PCR con el gen β -actina. La electroforesis de los productos amplificados muestran una banda única correspondiente al peso molecular del gen control, lo cual indica que durante el almacenamiento las muestras se conservan estables en periodos de hasta 6 meses para emplearse en reacciones de PCR (Figura 4).

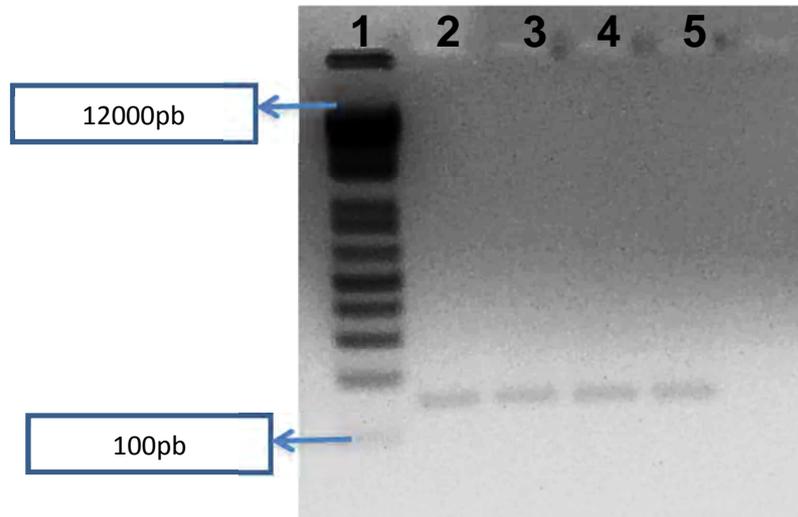


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de los productos de amplificación de 4 muestras de ADN genómico extraído de espermatozoides de toro congelado y almacenado. Carriles: 1 marcadores de peso molecular; 2 los productos de amplificación de la muestra de ADN sin almacenar, extraída el mismo día que se realizó el gel; 3 productos de amplificación de una muestra almacenada 1 mes; 4 productos de amplificación de una muestra almacenada durante 3 meses; 5 productos de amplificación de una muestra almacenada 6 meses.

IX. DISCUSIÓN

El propósito de las técnicas de extracción de ADN es obtener altas concentraciones del ácido nucleico con el mínimo de degradación y con un grado de pureza tal que permita realizar pruebas de biología molecular (Rada y Taboada, 1998) . Cuando los valores de pureza se encuentran en un rango de 1.7 a 2.0, el ADN obtenido se encuentra libre de contaminantes celulares. Valores por debajo de 1.7, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol y valores por arriba de 2 significa que hay ARN disperso. (Demeke y Henkins, 2010).

En este trabajo se probaron 6 métodos para la extracción de ADN de espermatozoides de toro previamente almacenados en congelación. Los 6 métodos resultaron ser eficaces para la extracción del material genético, sin embargo el método ensayado para la extracción de ADN de células somáticas con el empleo de fenol – cloroformo, fue el que presentó el menor rendimiento, esto posiblemente se debe a las características morfológicas del espermatozoide, ya que debido a su naturaleza exigen tratamientos más fuertes para lograr liberar el material genético atrapado en el núcleo, esto debido principalmente a la presencia de la teca perinuclear que protege al núcleo y que se une estrechamente al núcleo participando en la mayor compactación de la cromatina espermática asociado a las protaminas que son proteínas que se unen al ADN y entre ellas, creando una estructura más estable que en otros tipos celulares (Gutiérrez, 2006.; Juárez, 2000; Juárez y Mujica 1999).

Por otra parte las mayores concentraciones de DNA se obtuvieron con los métodos 5, 6, 4, 3 (en orden descendente) en los que se empleó un detergente (CTAB en el método 6, SDS en el método 4 y brij en el método 3 y 4) para degradar la membrana celular y el resto de organelos espermáticos. Posiblemente este tratamiento permitió que la solución de lisis (proteínasa papaína) actuara directamente sobre la estructura proteica que protege el núcleo espermático llamada teca perinuclear. Así mismo el empleo de sustancias descondensantes, como el DTT y la heparina, permitieron recuperar mayor cantidad de ADN y de mejor calidad ya que por un lado el DTT tiene acción sobre los puentes disulfuro entre las protaminas, y la heparina se une a éstas proteínas siendo secuestradas y eliminadas en los lavados sin contaminar a las muestras de ADN (Gutiérrez, 2006). Sin embargo, el método 6 fue el único que pudo proporcionar valores de calidad adecuados para ser empleados en pruebas de PCR ($260/80=1.75$ y $260/230=1.65$), lo cual fue

indicativo de que el material obtenido está libre de contaminantes que pudieran interferir con las reacciones. En este trabajo se postula que la eficiencia del método 6 se debe a la acción específica de cada uno de los reactivos utilizados en cada fase de la extracción:

1. Un detergente con acción sobre las membranas celulares (CTAB), eliminando la primer barrera de protección del núcleo (membrana plasmática) y otros elementos celulares con membrana como el acrosoma y mitocondrias (Sollero *et al.*, 2004; Vinod, 2004; Carpi *et al.*, 2011).
2. Una solución de lisis, que actuaría sobre los elementos proteicos del espermatozoide (flagelo y teca perinuclear) (Luque, 2008; Carpi *et al.*, 2011).
3. Agentes descondensantes (DTT y heparina), con acción sobre las proteínas asociadas directamente con el ADN (protaminas), dejando al ADN libre (Juárez y Mujica 1999; Juárez, 2000; Gutiérrez, 2006).
4. Un segundo detergente (SDS) que desnaturaliza a las protaminas capturadas y cualquier otro contaminante de naturaleza lipídica o proteica que se encuentre en el medio, purificando al ADN (Moller *et al.*, 1992; Vinod, 2004; Carpi *et al.*, 2011).

La efectividad del CTAB ha sido evaluada en diversos estudios, Valadez y Kahl (2000), mencionan que este detergente se une fuertemente al ADN, desplaza las proteínas y previene su degradación.

El protocolo 6 fue el que permitió obtener las mayores concentraciones de ADN extraído, además de tener la mejor calidad medida mediante la relación 260/280 y 260/230, mantener la integridad del ADN y resultar útil en reacciones de PCR. La electroforesis en gel de agarosa mostró que el ADN obtenido no mostraba degradación significativa, obteniéndose una banda única correspondiente al peso molecular del ADN, lo cual lo hace apto para pruebas de biología molecular como “huella genética” y PCR. Por otro lado, las reacciones de PCR en las que se obtuvieron productos correspondientes al peso molecular de ACTB indicaron que es un método que permite obtener ADN libre de sustancias inhibitoras de la PCR. Algunos investigadores indican que cuando se emplea CTAB se obtienen bajas relaciones A260/A230, lo cual indica contaminación con componentes celulares, como polisacáridos, los cuales pueden inhibir reacciones de PCRtr (Demeke y Henkins, 2010). En el presente estudio, la calidad 260/230 cumple

con los valores mínimos para considerar adecuadas las muestras de ADN extraído para su empleo en pruebas de PCR.

Al evaluar la resistencia al almacenamiento se observaron bandas únicas correspondientes al peso molecular del ADN, lo que indica que se mantiene íntegro y sin contaminación que pudiera interferir en reacciones de PCR cuando se almacena hasta por 6 meses en congelación a -20°C , por lo que se puede considerar estable.

El método 6 también fue probado para ser empleado directamente con espermatozoides frescos. La calidad obtenida fue la misma que cuando se trabajó con espermatozoides previamente congelados a -20°C . Sin embargo la concentración de ADN obtenida fue menor cuando se extrajo el ADN de espermatozoides frescos. Esta diferencia estadísticamente significativa se atribuye a que los espermatozoides congelados sufren daños y alteraciones en su estructura, como lo muestran diferentes investigaciones, lo cual posiblemente hizo a este tipo de células más sensibles al tratamiento con los detergentes y soluciones para la extracción del material genético. Sin embargo el rendimiento obtenido de los espermatozoides frescos es bueno y se considera que la técnica puede emplearse para extraer el ADN de este tipo de muestras sin realizar modificaciones. Sí se requirieran mayores concentraciones de ADN la recomendación sería trabajar con una cantidad mayor de espermatozoides o diluir el material genético extraído en una cantidad menor de buffer.

Diversos reportes indican que la contaminación del ADN y su degradación influyen en los resultados de PCR y PCRtr, provocando sobre todo grandes fluctuaciones en las mediciones analíticas y la repetibilidad de los resultados y, por lo tanto, impidiendo la estandarización de las condiciones óptimas de amplificación (Demeke y Henkins, 2010), por lo cual resulta vital que todo procedimiento de extracción sea validado y que se demuestre que las condiciones de extracción son óptimas para obtener los mejores rendimientos en cuanto a concentración, calidad, integridad y ausencia de inhibidores de PCR asegurando la eficiencia en las reacciones de PCR y qPCR (Demeke y Henkins, 2010).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el método de extracción 6 puede substituir protocolos que utilizan elementos químicos contaminantes y peligrosos, como es el caso de protocolos con fenol-cloroformo. Para lograr esto, consideramos que cuatro pasos fueron esenciales para complementar el proceso de extracción con CTAB o SDS:

1. La liberación de componentes celulares mediante el tratamiento inicial con CTAB.
2. La eliminación de proteínas y lípidos mediante el empleo de la proteinasa papaína y SDS.
3. La extracción diferencial del ADN con un tratamiento débil con DTT, lo cual permite eliminar en los primeros pasos el ADN mitocondrial o proveniente de células somáticas contaminantes.
4. El tratamiento con DTT y heparina como agentes descondensantes del núcleo y con detergente SDS, que permiten liberar el ADN de los agentes compactantes (teca perinuclear, protaminas y puentes disulfuro).

Por otro lado, cuando se pretende estandarizar una técnica para emplearse a gran escala el aspecto económico resulta un factor importante. En la actualidad se ha generalizado el empleo de kits para la extracción de ADN de muestras pequeñas, aunque la extracción es más rápida que con los métodos basados en CTAB y SDS, los kits resultan ser más costosos (Demeke y Henkins, 2010). El método estandarizado en este trabajo además de permitir la extracción de ADN de calidad y concentraciones óptimas, también es un método de bajo costo. Al realizar la evaluación de costos de los reactivos se encontró que el costo por extracción es de \$3.77 MN/muestra, mientras que el empleo de kits comerciales eleva el costo por extracción más de 10 veces, por ejemplo el kit comercial Genomic DNA Isolation Kit® (Biovision) tiene un costo de \$195.00 USD para 50 extracciones, lo que representa un costo de aproximadamente \$49.00 MN. Otro ejemplo es el kit comercial Maxwell 16 Cell DNA Purification Kit® (Promega), que tiene un costo de \$252.00 UDS para 48 extracciones, lo que implica un costo aproximado de \$66.00 MN por extracción.

X. CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de toro presentan estructuras que protegen al ADN, por lo que el tratamiento con métodos útiles para la extracción de ADN de células somáticas o de espermatozoides de humano no son eficientes en la extracción de ADN espermático..
2. El empleo de un detergente para la remoción de la membrana plasmática permite la acción directa de la solución de lisis sobre las estructuras espermáticas.
3. La eliminación de la primera barrera de protección reduce los tiempos de incubación con la solución de lisis.
4. El empleo de DTT y heparina permite descondensar la cromatina fuertemente compactada, permitiendo obtener mayores concentraciones de ADN.
5. El empleo del detergente SDS permite desnaturalizar las proteínas contaminantes obteniendo ADN más puro.
6. El método de extracción 6 permite obtener muestras de ADN a partir de semen fresco o descongelado en cantidades y características adecuadas para su utilización en pruebas de biología molecular como la PCR.
7. El almacenamiento del ADN extraído por el método 6 es estable al almacenamiento en congelación hasta por 6 meses.
8. El método de extracción 6 es una alternativa rápida, económica y eficiente para la extracción de ADN genómico a partir de espermatozoides de toro.

XI. LITERATURA CONSULTADA

Attia SM, Schmid TE, Badary OA, Hamada FM, Adler ID. Molecular cytogenetic analysis in mouse sperm of chemically induced aneuploidy: studies with topoisomerase II inhibitors. *Mutation Research*. 2002; 520: 1–13.

Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watr P. *The molecular Biology of the Cell*. 2002. 4th Edition. Gerland. Science.

Banks W. *Histología Veterinaria Aplicada*. 2da ed. 1996. Manual Moderno.

Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 1982; 93(2):298-305.

Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 2007; 8(9):227.

Bearer EL, Friend DS. Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microscop Tech*. 1990; 16(4):281-97.

Boom W, Adriaanse H, Kievits T, Franklin - Lens P, inventores. Akzo Nobel N.V. propietario. Process for isolating nucleic acid. .Holanda, patente EP0389063 B1, 1997 ago 13.

Caballero RJC, Moyano E, Muñoz BJ. Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo en gel de agarosa. [Serial on Line] 2003 may [cited] 2008 jun1(1):[1 screen]. Aviable from:
URL: www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/38%20PURIFICACIÓN%20DNA%20PLÁSMIDO.pdf

Capo AJ. Comparación de tres métodos de extracción y purificación de ADN a partir de restos óseos para análisis forense. Tesis de Licenciatura. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica 2009.

Carpi FM, Di Pietro F, Vincenzetti S, Mignini F, Napolioni V. Human DNA extraction methods: patents and applications. *Recent Pat DNA Gene Seq*. 2011; 5(1): 1-7.

Chandler JE, Steinholt-Chenevert C, Adkinson RW, Moser EB. Sex ratio variation between ejaculates within sire evaluated by polimerase chain reaction, Calving and Forrowing Records. *J. Dairy Sci*. 1998; 81(7): 1855-1867.

Chandler JE, Taylor TM, Canal AL, Cooper RK, Moser EB, McCormick ME, Willard ST, Rycroft HE, Gilbert GR. Calving sex ratio as related to the predicted Y-chromosome-bearing spermatozoa ratio in bull ejaculates. *Theriogen*. 2007; 67(3): 563-71.

Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real [Serial on Line] 2004 [cited] 2008 Feb 1(1):[1 screen]. Available from: URL: external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t12.pdf

Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Cytogenetic and molecular analysis of male infertility: Y chromosome deletion during nonobstructive azoospermia and severe oligozoospermia. *Cell Biochem Biophys*. 2006; 44(1):171-7.

Delgado NM, Flores-Alonso JC, Rodríguez-Hernández HM, Merchant-Larios H, Reyes R. Heparin and glutathione II: correlation between decondensation of bull sperm cells and its nucleons. *Arch Androl*. 2001; 47(1):47-58.

Demeke T, Jenkins GR. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 396(6):1977-90

De Vries M, Ramos L, Housein Z, De Boer P. Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol Open*. 2012; 1(5):446-57

Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*. 2006; 8(1):11-29.

Felipe Y. Caracterización bioquímica de las proteínas extraídas de la teca perinuclear antes y después de la congelación de semen bovino. . FMVZ-UNAM. México 2006

Fernández RM, Peciña A, Lozano-Arana MD, García-Lozano JC, Borrego S, Antiñolo G. Novel one-step multiplex PCR-based method for HLA typing and preimplantational genetic diagnosis of β -Thalassemia. [Serial on Line] 2013 [cited] 2013 Feb: [9 screen]. Available from URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/585106>

Fawcett DW. The mammalian Spermatozoon. *Developmental Biology*. 1975; 44: 394-436.

Flores-Sánchez I, Gutiérrez-Salinas J, Enriquez-Alvarado E, Hernández Rodríguez S, Ramos-Barragán C, Salamanca-Ceciliano A, Cruz – Tovar L, Suástegui-Domínguez S. Detección del virus del papiloma humano tipos 16 y 18 en muestras de semen de pacientes de un programa de reproducción asistida. *Ginecol Obstet Mex* 2010;78(12):645-651.

Footo RH. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci* 2002. 80:1-10.

Galofré JC, Calleja A, Panizo A, Salvador J. Biología molecular del carcinoma de tiroides de estirpe folicular (II). Aplicaciones clínicas. *Rev Med Univ Navarra*. 2003. 47(2): 23-29.

García-Montoya E. Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España 2001.

Garner DL. Sex- sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl.* 2001; 22(4):519-526.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Serial on Line] 2000 [cited] 2013 nov 1(1):[1 screen]. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10005/>

Griffiths AJF, Meller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbarte WM. *An introduction to genetic analysis*. Freeman. 1996. USA. 6ta.

Goddard ME, Hayes BJ. Genomic selection. *J Anim Breed Genet.* 2007; 124(6): 323-30.

Gutiérrez - Pérez O. Correlación del daño de la teca perinuclear y la descondensación del núcleo del espermatozoide criopreservado del cerdo. Tesis de Maestría. F;VZ, UNAM, México 2006.

Hafez ESE. Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a. ed. Mc Graw Hill Interamericana. 1998. 98-101, 401-404.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard ME. Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *J Dairy Sci.* 2009; 92(2):433-43.

Howeler M, Ghiorse WC, Walker LP. A quantitative analysis of DNA extraction and purification from compost. *J Microbiol Methods.* 2003 Jul; 54(1):37-45.

Juárez – Mosquesda ML. Caracterización de una nueva subestructura de la teca perinuclear del espermatozoide maduro no capacitado del cobayo. Tesis de doctorado. CINVESTAV, IPN, México 2000.

Juárez M ML. And Mujica A. A perinuclear theca substructure is formed during epididymal guinea pig sperm maturation and disappears in acrosome reacted cells. *Journal of Structural Biology* 1999; 128: 225-236

Kalyanasundaram D, Kim JH, Yeo WH, Oh K, Lee KH, Kim MH, Ryew SM, Ahn SG, Gao D, Cangelosi GA, Chung JH. Rapid extraction and preservation of genomic DNA from human samples. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405(6):1977-83.

Kim JW, Park SY, Ryu HM, Lee DE, Lee BY, Kim SY, Park YS, Lee HS, Seo JT. Molecular and clinical characteristics of 26 cases with structural Y chromosome aberrations. *Cytogenet Genome Res.* 2012; 136(4):270-7.

Le Guillou J, Ropers MH, Gaillard C, David-Briand E, Desherces S, Schmitt E, Bencharif D, Amirat-Briand L, Tainturier D, Anton M. Organization of lipids in the artificial outer membrane of bull spermatozoa reconstructed at the air-water interface. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013; 108:246-54.

Leclerc P, Goupil S. Distribution and localization of calmodulin-binding proteins in bull spermatozoa. *Biol Reprod*. 2000; 62(6):1875-81.

Li CX, Han JP, Ren WY, Ji AQ, Xu XL, Hu L. DNA Profiling of Spermatozoa by Laser Capture Microdissection and Low Volume-PCR. *PLoS One*. 2011; 6(8):e22316.

Longo FJ, Krohne G, Franke WW. Basic proteins of the perinuclear theca of mammalian spermatozoa and spermatids: a novel class of cytoskeletal elements. *J Cell Biol*. 1987; 105(3):1105-20.

Luan T, Woolliams JA, Lien S, Kent M, Svendsen M, Meuwissen TH. The accuracy of genomic selection in norwegian red cattle assessed by cross-validation. *Genetics*. 2009; 183(3): 1119-26.

Luque H, Herráez A. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Elsevier. España. 2008. 120 p.

Maldonado- Astudillo YI. Obtención de cepas híbridas de *Pleurotus* spp. Por apareamiento de neohaplontes compatibles. Tesis de Maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. IPN. México 2007.

Meikar O, Da Ros M, Kotaja N. Epigenetic regulation of male germ cell differentiation. *Subcell Biochem*. 2012; 61:119-38.

Meredith M, Bright JA, Cockerton S, Vintiner S. Development of a one-tube extraction and amplification method for DNA analysis of sperm and epithelial cells recovered from forensic samples by laser microdissection. *Forensic Sci Int Genet*. 2011. 14.

Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*. 1992; 20(22): 6115–6116.

McCarthy, Christina, inventora. Reproductive Health Science Pty, propietario. Nucleic acid extraction. Australia, patente WO2011026194 A1. 211 marzo 10.

Moreno RD, Schatten G. Microtubule configurations and post-translational alpha-tubulin modifications during mammalian spermatogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000; 46(4):235-46

Navarro G, Tros C, Diseño y desarrollo de nuevas formulaciones para la vehiculización de genes terapéuticos con aplicación al cáncer de hígado y colon. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2008, 74: 229-256.

Navarro - Partida J, Sandoval - Rodríguez AS. *Biología Molecular en Medicina. Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXII (2008). 163-174.

Naumenko VA, Tyulenev YA, Yakovenko SA, Kurilo LF, Shileyko LV, Segal AS, Zavalishina LE, Klimova RR, Tsibizov AS, Alkhovskii SV, Kushch AA. Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. *Herpesviridae*. 2011 Jun 28;2(1):7.

Nicklas JA, Buel E.. Quantification of DNA in forensic samples. *Anal Bioanal Chem.* 2003 Aug;376(8):1160-7.

Oko R and Maravei D. Protein Composition of the Perinuclear Theca of Bull Spermatozoa. *Biol Reprod.* 1994; 50:1000-1014.

Parati K, Bongioni G, Aleandri R, Galli A. Sex ratio determination in bovine semen: a new approach by quantitative real time PCR. *Theriogenology.* 2006; 66 (9): 2202-2209.

Parks JE, Arion JW, Foote RH. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 1987; 37(5):1249-58.

Pike, L.J., Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid Res.* 2003. 44, 655–667.

Poljak M, Seme K, Gale N. Rapid extraction of DNA from archival clinical specimens: our experiences. *Pflugers Arch.* 2000; 439(3 Suppl).

Rada A, Taoboada L. Métodos de obtención y purificación de AND humano para su aplicación en Genética Molecular. *BIOFARBO.* 1998; VI: 63-67.

Radpour R, Sikora M, Grussenmeyer T, Kohler C, Barekati Z, Holzgreve W, Lefkovits I, Zhong X. Simultaneous Isolation of DNA, RNA, and Proteins for Genetic, Epigenetic, Transcriptomic, and Proteomic Analysis. *J proteome res.* 2009, 8, 5264–5274

Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update.* 2009; 15(5):553-72.

Sánchez-Vázquez ML1, Flores-Alonso JC, Merchant-Larios H, Reyes R. Presence and release of bovine sperm histone H1 during chromatin decondensation by heparin-glutathione. [Syst Biol Reprod Med.](#) 2008; 54(6):221-30.

Santella RM. Approaches to DNA/RNA Extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(9):1585-7.

Schillaci R, Capra G, Bellavia C, Ruvolo G, Scazzone C, Venezia R, Perino A, Selingson D. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil Steril*. 2013; 100(5):1236-40.

Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*. 1995; 16(1):80-7.

Shrawder E. propietarios. Syngene, Inc. solicitante. Method of isolating and purifying nucleic acids from biological samples. USA, patente 4935342, 1986 diciembre 1.

Silva MA, Pontes NE, Da Silva KM, Guerra MM, Freitas AC. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Anim Reprod Sci*. 2011; 129(3-4):146-51.

Sollero, B. P.; Faria, D. A.; Paiva, S. R.; Guimãraes, S. E. F.; Lopes, P. S.; Paixão, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. Memórias del Congresso Internacional de zootecnia, marzo 28-31 2004. Brasília. : SBZ, 2004. Aviable on line: [http://www.ufv.br/dzo/labtec/textos/Resumos%20Expandidos%20Publicados%20em%20Anais%20de%20Congressos%20ou%20Periodicos2/ZOOTEC%202004/\(2004\)%20M%C3%89TODO%20R%C3%81PIDO%20DE%20EXTRA%C3%87%C3%83O%20DE%20DNA%20UTILIZANDO%20CTAB%20EM%20TECIDOS%20MUSCULARES%20DE%20SU%C3%8DNOS.pdf](http://www.ufv.br/dzo/labtec/textos/Resumos%20Expandidos%20Publicados%20em%20Anais%20de%20Congressos%20ou%20Periodicos2/ZOOTEC%202004/(2004)%20M%C3%89TODO%20R%C3%81PIDO%20DE%20EXTRA%C3%87%C3%83O%20DE%20DNA%20UTILIZANDO%20CTAB%20EM%20TECIDOS%20MUSCULARES%20DE%20SU%C3%8DNOS.pdf)

Sutovsky P, Oko R, Hewitson L, Schatten G. The removal of the sperm perinuclear theca and its association with the bovine oocyte surface during fertilization. *Dev Biol*. 1997 Aug 1;188(1):75-84.

Sun D. Xie Y; Fan X. Liu R.; Chu Q. Zhang Y. Zhang S. autores. Uiversidad China de Agricultura, propietario. China, patente CN102296062 B 2012 ago 22.

Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*. [Serial on Line] 2009 [cited] 20013 jul 1(1):[1 screen]. Aviable from: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2789530/pdf/JBB2009-574398.pdf>

Thakuria D, Schmidt O, Egan D, Doohan FM. Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology & Biochemistry*. 2008; 40:1390–1403.

Tomanee P, Hsu JT, Ito Y. Preparative fractionation of protein, RNA, and plasmid DNA using centrifugal precipitation chromatography with tubular dialysis membrane inside a convoluted tubing as separation channel. *Biotechnol Prog*. 2006; 22(2):532-7.

Tovich PR, Oko RJ. Somatic histones are components of the perinuclear theca in bovine spermatozoa. *J Biol Chem*. 2003; 278(34):32431-8.

Tovich PR, Sutovsky P, Oko RJ. Novel aspect of perinuclear theca assembly revealed by immunolocalization of non-nuclear somatic histones during bovine spermiogenesis. *Biol Reprod.* 2004; 71(4):1182-94.

Triant DA, Whitehead A. Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples. *J Hered.* 2009 Mar-Apr;100(2):246-50.

Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH. *Molecular Biology: Instant notes.* 2dn. 2000. Bios. Springer.109-110

Toshimori K and Ito Ch. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol.* 2003; 66(5):383-96.

Ulloa M. Estandarización de la Técnica de PCR en tiempo real para los genes IFN- γ , TNF- α , IL-10, TGF- β y β - actina en ratones infectados con malaria. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM. 2007.

Vázquez – Aguirre M. Sexaje de espermatozoides de bovino mediante métodos físicos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia –UNAM. 2008.

Viltrop T, Krjutskov K, Palta P, Metspalu A. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 2010; 398(2):260-2.

Vinod KK. Total genomic DNA extraction, purity analysis and quantitation. Presented in the CAS training program on "*Exploiting Hybrid Vigour in Crop Plants Through Breeding and Biotechnological Approaches*", Mar 11-31, 2004, Centre for Plant Breeding and Genetics, Tamil Nadu Agricultural University. Coimbatore. 2004a. pp. 92-104

Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology.* 2003; 59(2): 571-84.

Vuichard S, Borer U, Bottinelli M, Cossu C, Malik N, Meier V, Gehrig C, Sulzer A, Morerod ML, Castella V. Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study. *Investig Genet.* 2011 May 4;2:11.

Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.* 1991; 44(4):569-74.

Wistuba, O. Patología molecular: Aplicaciones de la biología molecular en anatomía patológica. *Revista médica de Chile.* [online]. Julio. 2001;129(7): 791-804. [cited Mayo 2011] Disponible en:<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000700014&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-9887.

Wykes SM and Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 2003; 278(32): 29471-7