

EXTRACCIÓN Y UTILIDAD DE DNA DE SEMEN BOVINO CONGELADO UTILIZANDO DIFERENTES CRIOPRESERVADORES



<https://doi.org/10.22533/at.ed.811112520032>

Data de aceite: 16/06/2025

Edgar Iván González Jiménez

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
Campo Experimental Tecomán, Colima
México.
<https://orcid.org/0000-0002-3095-6869>

Carlos Alberto Ramos Jonapa

Colegio de Postgraduados, Departamento de Ganadería, Campus Montecillos, Texcoco Estado De México, México.
<https://orcid.org/0009-0001-5752-058X>

Saúl Pardo Melgarejo

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
Campo Experimental Valle de Apatzingán, Michoacán, México.
<https://orcid.org/0000-0003-0138-1995>

Lily Xóchitl Zelaya Molina

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG), Jalisco, México.
<https://orcid.org/0000-0002-3474-3289>

José Herrera Camacho

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Morelia, Michoacán, México.
<https://orcid.org/0000-0002-0207-3313>

Marcelino Álvarez Silva

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),
Campo Experimental Tecomán, Colima
México.

RESUMEN: A través de las nuevas técnicas moleculares se desarrolló una estrategia de extracción de DNA a partir de semen bovino criopreservado con el fin de determinar la calidad y utilidad de DNA. En este trabajo se utilizó el material espermático de 15 sementales bovinos reproductivamente activos, cada semental fue sometido al proceso de extracción de semen utilizando un electroeyaculador, este se encarga de estimular por ondas de baja carga eléctrica las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho bovino, cada muestra de semen fue recolectada en tubos graduados, se realizó un análisis macroscópico y un espermograma de cada muestra espermática obtenida de los distintos sementales, las muestras fueron diluidas en partes iguales con 3 diferentes crioprotectores, se empajilló ajustando la carga espermática a 20 millones y se congelaron las pajillas por enfriamiento

lento en vapores de nitrógeno. Para el proceso de extracción de DNA de semen congelado se utilizaron dos protocolos, el tradicional método de fenol-cloroformo con proteinasa k (modificado) y el kit comercial de TRIzol™ Reagent. El DNA obtenido bajo los dos protocolos, se utilizó para medir su calidad y pureza con un NanoDrop® 2000 y se amplificó un fragmento del gen 16S rDNA para confirmar su utilidad en la amplificación mediante PCR de los genes de interés.

PALABRAS CLAVE: molecular, extracción, DNA, PCR.

EXTRACTION AND USEFULNESS OF DNA OF BOVINE FROZEN SEMEN USING DIFFERENT CRIOPRESERVADORES

SUMMARY: Through the new molecular techniques a DNA extraction strategy was developed from cryopreserved bovine semen in order to determine the quality and usefulness of DNA. In this work the sperm material of 15 reproductively active bovine stallions was used, each stallion was subjected to the semen extraction process using an electroejaculator, this is responsible for stimulating the accessory glands of the reproductive system of the bovine male by waves of low electrical charge, each semen sample was collected in graduated tubes, a macroscopic analysis and a spermogram of each sperm sample obtained from the different stallions was performed, the samples were diluted in equal parts with 3 different cryoprotectants, empajilló adjusted the sperm load to 20 million and The straws were frozen by slow cooling in nitrogen vapors. For the extraction process of frozen semen DNA, two protocols were used, the traditional method of phenol-chloroform with proteinase k (modified) and the commercial kit of TRIzol™ Reagent. The DNA obtained under the two protocols was used to measure its quality and purity with a NanoDrop® 2000 and a fragment of the 16S rDNA gene was amplified to confirm its usefulness in PCR amplification of the genes of interest.

KEY WORDS: molecular, extraction, DNA, PCR.

INTRODUCCIÓN

En México la ganadería bovina es una de las actividades agropecuarias de mayor importancia, ocupando más del 50% del territorio nacional, manteniendo cerca de 32 millones de cabezas de ganado bovino. La producción de leche en el año 2010 tuvo un marcado aumento llegando a los 10,000 millones de litros y la producción de carne tuvo sus estándares productivos de 1,500 millones de toneladas en ese mismo año. Aun y con estos aumentos productivos, la eficiencia de los distintos sistemas de producción es baja, si bien la producción ha aumentado esto se debe gracias al aumento también de la población de cabezas de ganado (Magaña *et al.*, 2006).

Durante los últimos años la inseminación artificial ha demostrado ser la tecnología reproductiva que más ha contribuido a acelerar el progreso genético del ganado vacuno del país y a su vez a desarrollar capacidades para que los sistemas de producción ganadera sean más eficientes, sin embargo, el éxito de esta tecnología depende en gran medida de la capacidad fecundante del semen tras ser diluido y congelado, esta técnica no está exenta de riesgos, si bien el uso de semen congelado contribuye al control y prevención de ciertas enfermedades de los animales domésticos, cuando sus fundamentos son violados en su uso práctico puede convertirse en un serio peligro por la diseminación más intensa

de enfermedades patógenas, aun incluso con mayor frecuencia que con la monta natural (Muiño *et al.*, 2005).

Diversas investigaciones sobre la flora bacteriana del material espermático de sementales bovinos han puesto en evidencia la presencia de microorganismos patógenos y saprofitos de varios géneros y especies. La introducción del semen congelado, práctica generalizada en la actualidad, agravo el problema debido a que facilita el intercambio del material seminal sin limitaciones geográficas y sin limitar la supervivencia de los agentes infecciosos (Muiño *et al.*, 2005; Silveira y Machado 2005). Por lo anterior el aprovechamiento de pruebas genéticas es fundamental para el desarrollo de estrategias con mayor especificidad y sensibilidad en la detección de agentes patógenos que pueden ser transmitidos por este tipo de material biológico.

La obtención de material genético con calidad óptima para el desarrollo y aplicación de variantes de técnicas de PCR es fundamental, debido a que sin esto se disminuye la posibilidad de determinar su estado sanitario para implementar estrategias de conservación. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de tres criopreservadores de semen (leche, lecitina y yema de huevo) en el proceso de extracción de DNA (método tradicional de fenol-cloroformo con proteínasa K y el método comercial de TRIzol™) y en la amplificación mediante PCR de un fragmento del gen 16S para determinar el mejor criopreservador de semen para muestras en las que se determinaran los patógenos de importancia.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio: El estudio se realizó en la costa sur del estado de Jalisco, el clima de esta región es cálido subhúmedo con lluvias marcadas en verano, con un rango de precipitación pluvial anual de 600-2000 mm distribuidos en los meses de junio a octubre, la altura promedio sobre el nivel del mar de esta región oscila en los 433 m., la temperatura de 20 - 28°C (INEGI, 2009).

Recolección, evaluación y congelación de semen: Se utilizaron 15 sementales bovinos (*Bos taurus* X *B. indicus*), reproductivamente activos provenientes de unidades de producción libres de enfermedades de transmisión sexual (brúcela y tuberculosis). La colecta de semen se realizó dentro de mangas de manejo animal con piso firme y con el uso de un electroeyaculador (The Pulsator IV) previo lavado del prepucio con solución salina fisiológica y gentamicina (200 µg/mL). El semen se recolecto en tubos Falcón estériles graduados con capacidad de 15 mL y fue analizado macroscópicamente (color y volumen) y se dividió en cuatro alícuotas del mismo volumen y a cada una se le adiciono un diluyente con diferente crioprotector de fuentes lipoproteicas no penetrante en proporción 1:1 (V:V), los crioprotectores utilizados fueron: a) lecitina, b) leche, c) yema de huevo y d) muestra control (sin diluyentes). Cada diluyente se elaboró con glucosa como fuente energética, glicerol

como crioprotector penetrante de membrana, utilizando un TRIS (buffer) para mantener la osmolaridad. A cada muestra diluida se le realizó un espermiograma para analizar la motilidad total y progresiva, morfología, vitalidad y concentración de los espermatozoides recolectados (Morillo *et al.*, 2012)

Con los datos obtenidos durante el análisis microscópico y se realizó la dilución del semen y se envaso en pajillas francesa de 0.25 mL con una carga espermática de 20 millones, utilizando la fórmula de concentración ajustada (concentración x volumen x motilidad x vitalidad x morfología / concentración final de la dosis). Cada pajilla se selló con calor y se empaquetaron en los gobelets identificados con el nombre del semental y el tipo de diluyente utilizado (leche, lecitina, yema de huevo y crudo).

La congelación del semen inició con el enfriamiento de las pajillas sometiéndolas a 5° C durante 4h, posteriormente se preparó una hielera térmica de unicel con nitrógeno líquido, dentro de la cual se colocó una base de unicel de 5 cm de ancho y sobre esta se colocaron los gobelets con las pajillas, se tapó la hielera y se comenzó con el proceso de congelación lenta con vapores de nitrógeno dejando pasar en este punto 30 min. Pasado este tiempo se colocaron los gobelets directamente en la hielera con el nitrógeno líquido retirando la base de unicel para terminar con el proceso de congelación. Después de este punto las muestras de semen fueron colocadas dentro de un termo criogénico a -196° C utilizando nitrógeno líquido y el material se conservó hasta su uso en laboratorio.

Métodos de extracción de DNA: La extracción del DNA de las muestras de semen con los diferentes crioprotectores no penetrantes, se realizó en el Laboratorio del Centro de Recursos Genéticos Microbianos del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Tepatitlán de Morelos, Jalisco.

Para el proceso de extracción de DNA se utilizó el contenido de 3 pajillas de cada uno de los crioprotectores incluyendo 3 para el control, utilizando esta cantidad para cada uno de los protocolos de extracción. Las pajillas de cada tratamiento, fueron descongeladas a temperatura ambiente, colocando el material espermático en tubos Eppendorf de 1.5 mL y sometidas a dos protocolos de extracción: protocolo a) método tradicional Fenol-Cloroformo (FCF) descrito por Wilson (1990) modificado; el cual consistió como primer punto en la separación de material orgánico e inorgánico, agregando a cada muestra de semen 500 μ L de reactivo Tris-etilendiaminotetraacético (TE) 50:20, se mezclaron en el vórtex y fueron centrifugadas 12000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, el sobrenadante fue eliminado y posteriormente se adicionaron 175 μ L de TE 50:20 y se mezcló en el vórtex, y para lograr una lisis celular y degradación de proteínas se agregó 15 μ L de proteínasa K (20 mg/mL) y 40 μ L de dodecil sulfato de sodio al 10 % (SDS, por sus siglas en ingles), dejando incubar durante dos h en baño metabólico a 56° C.

Posteriormente, para purificar la muestra se adicionaron 500 μL de TE 10:1 y 20 μL de NaCl (5M), y para precipitar los restos de proteína se agregó 500 μL de fenol frío, agitando suavemente durante 10 minutos y centrifugando a 4° C a una velocidad de 12 000 rpm durante 5 m y recuperando el sobrenadante en un tubo nuevo, a este sobrenadante se le agregó 500 μL de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) se centrifugó a 4° C durante 2 minutos a 12 000 rpm y se recuperó el sobrenadante en otro tubo nuevo, este paso se realizó para eliminar los restos de fenol, repitiendo este punto dos veces; al sobrenadante del último paso se le agregó 500 μL de isopropanol frío para precipitar los ácidos nucleicos dejando la muestra reposar durante toda una noche en 20° C;

Transcurrido este tiempo, las muestras fueron atemperadas y centrifugadas a 12000 rpm durante 10 m a 4° C, se eliminó el sobrenadante de la muestra con cuidado verificando en este punto la formación de un botón con el material genético en el fondo del tubo, dicho botón se lavó agregando 1mL de etanol frío al 70%, se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 m a 4° C y se eliminó el sobrenadante, para eliminar el resto de etanol los tubos se secaron en estufa de aire forzado a 65° C durante 2h , cada muestra seca se hidrató con 50 μL de agua libre de nucleasas y se guardó a 20° C hasta su uso.

El protocolo b) método de extracción comercial TRIzol™ (Reagent Invitrogen de Thermo Fisher), siguiendo los pasos recomendados por el fabricante la muestra final también fue hidratada en agua libre de nucleasas aforando a 50 mL y se almacenó a -20° C hasta su uso.

Calidad de ADN: La pureza de cada muestra de DNA extraída se evaluó con un espectrofotómetro (NanoDrop2000 Thermo Scientific), en rangos de 260-280 nm. Para determinar la integridad de cada muestra de DNA, se realizaron geles de agarosa al 1%; los geles se cargaron con el DNA y se colocaron en una cámara de electroforesis. Se hizo una comparación entre la concentración y pureza del DNA obtenido de las muestras y se confirmó su utilidad para PCR punto final con la amplificación de una secuencia parcial de ~500 pares de bases del 16S rDNA utilizando los iniciadores universales 5B forward 5'-TTG GAGAGTTTTGATCMTGG-3' y 3A reverse 3'-GTATTACCGCGGCTGCTG-5', con esta prueba también se evaluó la presencia de inhibidores de PCR.

Análisis de datos: Los datos obtenidos de la calidad de DNA (amplificación, concentración y pureza), en función del diluyente y método de extracción utilizado, fueron organizados y sometidos a estadística descriptiva obteniendo la proporción de muestras que cumplían con los criterios de calidad del DNA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de calidad de ADN (Tabla 1), muestran que, para la variable de amplificación, el método fenol-cloroformo, fue el que arrojó el mayor porcentaje de muestras que cumplían con el criterio establecido; sin importar el tipo de diluyente; no obstante, se observó que la mayor proporción de muestras de semen de bovino diluidas en leche (93.33%) o yema de huevo (92.85%), respecto a los diluyentes control o lecitina cumplieron con los criterios establecidos.

Respecto a la concentración, la mayor proporción de muestras (84.6%) que cumplieron con los criterios establecidos para esta variable, se observaron en el medio de extracción fenol-cloroformo y sin la adición de diluyente.

En referencia a la pureza, se observó que más del 50 % de las muestras extraídas con el método fenol-cloroformo, cumplieron con el criterio establecido, sin embargo, la proporción fue mayor, cuando se utilizó lecitina como diluyente, respecto a los demás crioprotectores. Mientras que la proporción de muestras útiles cuando se empleó el TRIzol™, fue menor del 50% independientemente del diluyente.

DILUYENTE	AMPLIFICACION		CONCENTRACION		PUREZA	
	FCF	TRIzol™	FCF	TRIzol™	FCF	TRIzol™
CONTROL	71.4	40.0	84.6	15.4	69.2	46.1
LECITINA	86.6	33.3	46.6	26.7	80.0	46.6
LECHE	93.3	42.8	66.6	0.0	66.7	28.57
YEMA HUEVO	92.8	0.00	21.4	0.0	57.1	26.7

Tabla 1. Resultados de criterios evaluados de los diferentes diluyentes utilizados.

La utilidad del DNA extraído para la amplificación de PCR, se evaluó con el DNA obtenido de las muestras diluidas en lecitina y bajo los dos métodos de extracción de este estudio, el cual después de corrida la PCR, se realizaron geles de agarosa al 1.5% y la revelación de los geles nos mostró que la funcionalidad para PCR de las muestras obtenidas por el método fenol-cloroformo amplificó en 86% de las muestras, mientras que las trabajadas con el kit TRIzol™ solo amplificaron en un 8.7% de la muestras (Figura 1).

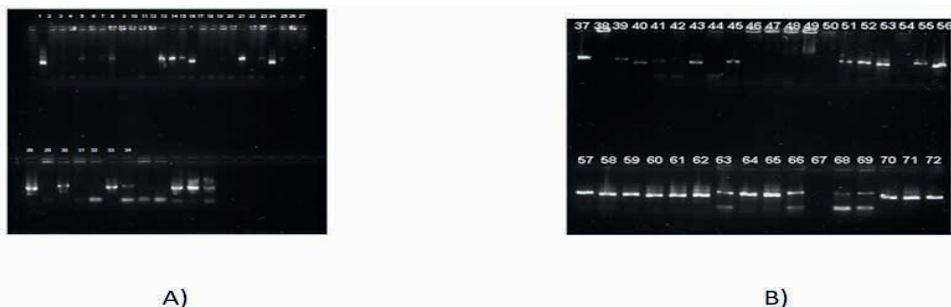


Figura 1. Electroforesis de PCR de DNA A) método TRIzol™ y B) método fenol-cloroformo

El uso de 3 pajillas de 200 mL cada una por diluyente para el método de extracción fenol-cloroformo mostró buenos resultados en los criterios evaluados en esta investigación, existe nula información sobre el uso de los crioprotectores utilizados para la extracción de DNA, pero Ruiz *et al.* (2010) y Durviz, (2008), menciona que la baja o nula cantidad de DNA obtenida de algún protocolo, es debido al exceso de muestras utilizado, por lo que se recomienda utilizar menor cantidad, con fenol-cloroformo debe ser de 0.25 a 0.50 mL de contenido espermático, es decir una cantidad similar a la utilizada en esta investigación, ya que con una mayor cantidad de muestra se obtuvieron resultados negativos, o en su caso prolongar el tiempo de incubación en el paso que corresponde a la degradación o lisis celular. Bajo estos mismos criterios se cree que para obtener mejores resultados con el protocolo de extracción del kit comercial TRIzol™, la cantidad de muestra de semen a utilizar debe ser menor para la obtención de los mejores estándares establecidos para calidad y pureza de DNA. De la misma manera Del Valle *et al.* (2004) mencionan en su estudio que la causa probable entre la diferencia de pureza y cantidad de DNA que observaron durante la extracción podría deberse, a la presencia de RNA en los mismos. El extraer el DNA con un método o protocolo adecuado para cada muestra minimiza los problemas de contaminación puesto que no se requiere extraer todo el DNA presente sino obtenerlo en cantidad y calidad suficiente cuando este va a ser utilizado para pruebas moleculares. La eliminación total de los contaminantes durante la extracción de DNA es usualmente una tarea complicada que con mucha frecuencia nos lleva a la inhibición o errores en la amplificación (Buttler, 2001).

CONCLUSIÓN

La utilización de crioprotectores elaborados a base de lecitina en esta investigación resultaron aceptables al momento de evaluar la calidad del DNA extraído de semen de bovinos. De los dos métodos de extracción el que mostró los mejores resultados en todas las variables estudiadas fue el método tradicional fenol-cloroformo, por lo que al trabajar con semen bovino criopreservado para evaluar la calidad de extracción de DNA con seguridad se puede recomendar este protocolo utilizado en esta investigación.

REFERENCIAS

Buttler, J.M. 2001. Forensic DNA Typing. Biology & Technology behind STR Markers. San Diego: Academic Press

Del Valle, C., Rodríguez, A., Espinoza, M. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. Revista de biología tropical, 52(3), 717-725.

Durviz, S.L. (2008). Kit extracción DNA SSS. REAI. RBME1L/ RBMEq2.5 pp.

INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, La Huerta, Jalisco, Clave geoestadística 14043.

Magaña, M. J. G., Ríos, A. G., Martínez, G. J. C. 2006. Los sistemas de doble propósito y los desafíos en los climas tropicales de México. Universidad Autónoma de Yucatán. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 14:105-114.

Morillo, M., Salazar, S., Castillo, E. 2012. Evaluación del potencial reproductivo del macho bovino. Maracay, VE, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 60 p.

Muñoz, R., Fernández, M., Areán, H., Viana, J. L., López, M., Fernández, A., Peña, A. I. 2005. Nuevas tecnologías aplicadas al proceso y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. Información Técnica Económica Agraria (ITEA). 3 101:175-191.

Ruiz, S. B., Rojas, M. R., Mendoza, N. P. 2010. Extracción de ADN de semen bovino congelado. Chiapas, México. PP. 19.

Silveira, E. A., Machado, R. 2005. Flora bacteriana del semen de toro antes y después de la congelación (Bacterial flora of bull semen before and after freezing process). Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET). 6 10:1-8

Wilson, K. 1990. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Current protocols in molecular biology (Ausubel FM and Brent R, Eds.). Greene Publ. Assoc. and Wiley Interscience, New York, 241-245.