

Extracción y cuantificación de ADN de pajillas de semen bovino criopreservado

Extraction and quantification of DNA bovine of straws semen criopreserved

Benigno RUÍZ SESMA ✉, **Reyna Isabel ROJAS MARTÍNEZ**, **Horacio RUÍZ HERNÁNDEZ**,
Paula MENDOZA NAZAR, **María Angela OLIVA LLAVEN**, **Carlos Enrique IBARRA**
MARTÍNEZ, **Gabriela AGUILAR TIPACAMU**, **José Guadalupe HERRERA HARO**, **Alfonso**
HERNÁNDEZ GARAY, **Diana SANZON GÓMEZ**, **Gerardo Uriel BAUTISTA TRUJILLO**,
Alfonso de Jesús RUÍZ MORENO y Leopoldo M. MEDINA SANZON

Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas. Rancho San Francisco Km 8
 Carretera Ejido Emiliano Zapata, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.

E-mails: brsesma@prodigy.net.mx y brsesma@colpos.mx ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 30/08/2009 Fin de arbitraje: 15/09/2009 Revisión recibida: 11/01/2010 Aceptado: 20/01/2010

RESUMEN

El semen criopreservado viene diluido con Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol, leche descremada en polvo y yema de huevo. Para extraer el ADN del semen es necesario eliminar el ADN exógeno, esto no se logra con las técnicas normales de extracción con semen fresco, por lo que es necesario recurrir a las técnicas forenses. El objetivo del presente estudio fue evaluar tres protocolos para la extracción de ADN de semen bovino criopreservado. El estudio se realizó en el laboratorio de fitopatología vegetal del Colegio de Postgraduados. Se utilizaron pajillas de ½ mL y ¼ mL. Las variables evaluadas fueron; Tiempo de ejecución del protocolo (T), pureza del ADN y concentración de ADN. Las técnicas evaluadas fueron: Tratamiento1: Yoshida *et al.* (1995). Tratamiento2: Penacino (1997). Tratamiento3: Técnica rápida de Penacino (1997). El menor tiempo para ejecución del protocolo fue para el tratamiento tres con 100 minutos. Los carriles 1 al 4 y 7 al 10, se observa la presencia de proteína. Cuando se utilizaron una o dos pajillas de ¼ mL se observa poca proteína y mejor calidad del ADN. En carriles del uno al 10, los valores de la relación A_{260}/A_{280} son inferiores 0.1. Los carriles 12 y 17 presentan valores cercanos al rango de pureza. Se concluye que para la extracción de ADN de semen bovino criopreservado se debe utilizar una pajilla de ¼ mL por muestra con la técnica Penacino (1997), y dos pajillas de ¼ mL por muestra para la técnica rápida Penacino (1997).

Palabras clave: Semen, toros, criopreservado, extracción, ADN

ABSTRACT

The semen criopreserved comes diluted with tris, citric acid, fructose, glicerol, milk skimmed in powder and yolk of egg. To extract the DNA of the semen it is necessary to eliminate the ADN exogen, this is not achieved with the normal technique of extraction with fresh semen, for what it is necessary to resort to the forensic techniques. The objective of the present study was to evaluate three protocols for DNA's extraction of bovine semen criopreserved. The study was realized in the laboratory of vegetable fitopatology of Colegio de Postgraduados. They were in use straws of ½ mL and ¼ mL. The evaluated variables were; Time of execution of the protocol (T), purity of the DNA and DNA's concentration. The evaluated techniques were: Treatment1: Yoshida *et al.* (1995). Treatment2: Penacino (1997). Treatment3: Penacino (1997)'s rapid Technique. The minor time for execution of the protocol was for the treatment three with 100 minutes. The rails 1 to 4 and 7 to 10, is observed the presence of protein. When one or two was in use straws of ¼ mL is observed few protein and better quality of the DNA. In rails of one to 10, the values of the relation A_{260}/A_{280} are low 0.1. The rails 12 and 17 present values near to the range of purity. There concludes that for DNA's extraction of bovine semen criopreserved must use a straw of ¼ mL for sample with the technique Penacino (1997), and two straws of ¼ mL for sample for the rapid technique Penacino (1997).

Key words: Semen, bulls, criopreserved, extraction, DNA

INTRODUCCION

La utilización de semen bovino criopreservado en pajillas permite la diseminación de

genes de reproductores con un mérito genético superior en los sistemas de producción, sin embargo, la mayoría de estos toros carecen de estudio en la cual se identifique los genes de importancia económica

como el gen leptina, caseína, etc. Para identificar los genes que transmiten los toros, es necesario la extracción del ADN, sin embargo, muchas veces no se tiene acceso a los toros y la única fuente para la obtención del ADN es el semen criopreservado, este generalmente viene diluido con Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol, leche descremada en polvo y yema de huevo (Olivares y Urdaneta, 1985; Boeta y Zarco 2000; Hernández *et al.* 2003; Medina-Robles *et al.* 2007), esto ocasiona que en la pajilla de semen se tenga ADN exógeno y el ADN del espermatozoide de toros, por lo que es necesario eliminar el ADN exógeno antes de extraer el ADN del espermatozoide, esto no se logra con las técnicas que normalmente se utilizan para la extracción de ADN de semen fresco, por lo que es necesario recurrir a las técnicas forenses. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar tres protocolos para la extracción de ADN de pajillas de semen bovino criopreservado.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de los tres protocolos de extracción y purificación de ADN a partir de pajillas de semen bovino criopreservado se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular del Colegio de Postgraduados, Campus-Montecillo. Se utilizaron pajillas de semen bovino criopreservado de 0.5 mL y 0.25 mL.

Las variables evaluadas fueron; Tiempo de ejecución del protocolo (T), pureza del ADN en gel de agarosa (Pur) y concentración de ADN. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

Tratamiento 1

Técnica descrita por Yoshida *et al.* (1995) que consiste en: Paso 1; Se colocaron 2 pajillas de semen bovino criopreservado de 0.5 mL o 0.25 mL en un tubo eppendorf de 1.5 mL, agregar 0.5 mL de solución de lisis 1 (Bufer TNE : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM tetraacetato etilenediamina (EDTA), 100 mM cloruro de sodio con 1% sulfato dodecil de sodio (SDS) y 100 µg./ml Proteinasa K). Los tubos con la solución de lisis 1 se encubo en baño maría por 3 horas a 70°C. Después de la incubación los tubos se centrifugaron a 14000 rpm por 10 minutos, se tiro el sobrenadante que contenía ADN del huevo de gallina y otras impurezas. Las cabezas de los espermatozoides quedaron en la pastilla en el fondo del tubo, a este se le agrego 0.1 ml de búfer de lisis TNE y se incubo en baño maría por 1 hora a 70°C

para asegurar la degradación de ADN extraño. Paso 2: En este paso se rompen las cabezas de los espermatozoides para liberar el ADN. Una vez retirado los tubos del baño maría, se le agrega 0.5 mL de solución de búfer de lisis TNE con 1% sulfato dodecil de sodio (SDS), 100 µg./ml Proteinasa K y 0.04 M Dithiotreitol (DTT), se incubo en baño maría por 8 horas a 56°C. Esta segunda digestión contiene el ADN de los espermatozoides principalmente. A cada tubo se le añadió 750 µl fenol, se mezcló en vortex (Modelo MS1 Minishaker, Marca IKA®) durante 30 segundos, se centrifugo (Modelo Spectrafuge 16M, Marca Labnet®) a 14000 rpm por 5 min. Se extrajo 750 µl del sobrenadante y le le agrego 750 µl de fenol, se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugo a 14000 rpm por 5 min. Nuevamente se extrajo 750 µl del sobrenadante y le aplico 750 µl de cloroformo/alcohol isopropilico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugo a 14000 rpm por 5 min. Del sobrenadante se extrajo 600 µl teniendo el cuidado de no extraer impurezas, a esto se le aplico 600 µl cloroformo/alcohol isopropilico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugo a 14000 rpm por 5 min. Se extrajeron 350 µl de sobrenadante y le agrego 35 µl (10% del volumen) de acetato de sodio (pH 5.3) y se le adiciono 875 µl de etanol puro (2.5 veces el volumen), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugo a 14000 rpm por 15 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejo secar en la incubadora (Boekel Scientific; BOEKEL®) a 37°C por 1 hora, finalmente, se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril y se guardaron a -4°C para su medición posterior.

Tratamiento 2

Técnica descrita por Penacino (1997). Paso 1: Se colocaron 2 pajillas de semen bovino criopreservado de 0.5 mL o 0.25 mL en un tubo eppendorf de 2 mL, para la separación del material utilizado como diluyente (yema de huevo) a cada tubo se le agrego 40 µl Proteinasa K (Se disolvió 10 mg de proteinasa K liofilizada en 2 ml de agua destilada estéril), 200 µl de sulfato dodecil de sodio (SDS) 10 % (se disolvió 50 gr de dodecil sulfato de sodio en 450 ml de agua caliente, se ajusto el a pH 7.2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y se aforo 500 ml) y 1000 µl de TEC (se mezcló 100 ml de [1 ml de TRIS/CIH 1M pH: 7.5 con 2 ml de EDTA disódico 0.5M pH: 8, aforado a 100 ml con agua destilada] con 3.3 ml de cloruro de sodio 3M). Los tubos se mezclaron en vortex durante 30

segundos y se incubó en baño maría durante 2 horas a 56 °C. Se centrifugó a 14000 por 10 minutos y se retiró el sobrenadante, que contiene ADN extraño. Paso 2: El precipitado del paso anterior (espermatozoides), se resuspendió nuevamente en 40 μ l Proteinasa K (Se disolvió 10 mg de proteinasa K liofilizada en 2 ml de agua destilada estéril), 200 μ l de sulfato dodecil de sodio (SDS) 10 % (se disolvió 50 gr de dodecil sulfato de sodio en 450 ml de agua caliente, se ajustó el pH 7.2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y se aforó 500 ml) y 1000 μ l de TEC (se mezcló 100 ml de [1 ml de TRIS/CIH 1M pH: 7.5 con 2 ml de EDTA disódico 0.5M pH: 8, aforado a 100 ml con agua destilada] con 3.3 ml de cloruro de sodio 3M y se agregó 10 μ l de Dithiotreitol DTT (se disolvió 0.154 gr. de ditiotreitól en 1 ml de agua destilada estéril y se conservó a -20 °C). Posteriormente los tubos se incubaron a 56°C durante 12 horas. Después de esto, a cada tubo se le añadió 750 μ l fenol, se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se extrajo 750 μ l del sobrenadante y le agregó 750 μ l de fenol, se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Nuevamente se extrajo 750 μ l del sobrenadante y le aplicó 750 μ l de cloroformo/alcohol isopropílico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Del sobrenadante se extrajo 600 μ l y se le agregó 600 μ l cloroformo/alcohol isopropílico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se extrajeron 350 μ l de sobrenadante, a esto se le agregó 35 μ l de cloruro de sodio 10% del volumen (se disolvió 17.5 gr de cloruro de sodio en agua destilada y se aforó 100 ml) y se le adicionó 700 μ l de EtOH/Amonio, 2 veces el volumen (Se disolvió 12 mg de acetato de amonio en 100 ml de etanol absoluto y se conservó en hielo), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar en la incubadora a 37°C por 1 hora, finalmente, se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril y se guardaron a -4°C para su medición posterior.

Tratamiento 3

Técnica descrita por Penacino (1997). Se colocaron 2 pajillas de semen bovino criopreservado de 0.5mL o 0.25 mL en un tubo eppendorf de 1.5 mL, a cada tubo se le agregó 400 μ l de TEC (se mezcló 100 ml de [1 ml de TRIS/CIH 1M pH: 7.5 con 2 ml de EDTA disódico 0.5M pH: 8, aforado a 100 ml con agua destilada] con 3.3 ml de cloruro de sodio 3M) ; y

20 μ l Proteinasa K (Se disolvió 10 mg de proteinasa K liofilizada en 2 ml de agua destilada estéril), 40 μ l de sulfato dodecil de sodio (SDS) 10 % (se disolvió 50 gr de dodecil sulfato de sodio en 450 ml de agua caliente, se ajustó el pH 7.2 por agregado de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado y se aforó 500 ml) y 5 μ l de DTT(se disolvió 0.154 gr. de ditiotreitól en 1 ml de agua destilada estéril y se conservó a -20 °C), cada tubo se mezcló en vortex durante 30 segundos y posteriormente se incubó en baño maría durante 20 minutos a 60 °C. Después de esto, a cada tubo se le añadió 750 μ l fenol, se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se extrajo 750 μ l del sobrenadante y le agregó 750 μ l de fenol, se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Nuevamente se extrajo 750 μ l del sobrenadante y le aplicó 750 μ l de cloroformo/alcohol isopropílico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Del sobrenadante se extrajo 600 μ l y se le agregó 600 μ l cloroformo/alcohol isopropílico (24:1), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se extrajeron 350 μ l de sobrenadante, a esto se le agregó 35 μ l de cloruro de sodio 10% del volumen (se disolvió 17.5 gr de cloruro de sodio en agua destilada y se aforó 100 ml) y se le adicionó 700 μ l de EtOH/Amonio, 2 veces el volumen (Se disolvió 12 mg de acetato de amonio en 100 ml de etanol absoluto y se conservó en hielo), se mezcló en vortex durante 30 segundos, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. El sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar en la incubadora a 37°C por 1 hora, finalmente, se resuspendió en 30 μ l de agua destilada estéril y se guardaron a -4°C para su medición posterior. Para la cuantificación del ADN se utilizó el método de absorción de luz ultravioleta: Se efectuó a partir de diluciones 1/200 a 1/500 en agua destilada, para determinar la absorción de luz UV a las longitudes de onda 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. Las relaciones 260/280 y 260/230 permitieron detectar la presencia de posibles contaminantes en las muestras. Se calcula el contenido de ADN asumiendo que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 μ g/ml de ADN doble cadena. Por otro lado, se procedió a verificar la calidad de la extracción del ADN de las muestras, en gel de agarosa al 0.8% (0.24 g de agarosa y 30 ml de buffer TBE 1X (Tris Borato-EDTA), por medio de una electroforesis, utilizando una cámara modelo horizon 58, (Life Technologies®). En cada pozo se depositó un volumen final de 5 μ l (2 μ l de colorante Naranja G y 3 μ l de ADN), usando como buffer de

corrida TBE. Las condiciones de la electroforesis fueron de 40 minutos a 86 voltios. Transcurrido dicho tiempo los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de ($1 \mu\text{g/ml}$) durante 30 minutos. Los resultados fueron evaluados en el fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, Marca Bio Rad) de luz ultra violeta (UV) y se capturaron las imágenes por computadora en el programa Quantivone, para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN.

A las variables evaluadas se les realizó un análisis descriptivo (Steel, Torrie y Dickey 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo de ejecución para tratamiento dos fue 940 min, seguido del tratamiento uno y tres con 825 y 100 min respectivamente. En la Figura 1, se aprecia la calidad del ADN extraído. En los carriles 5, 11 y 17 se utilizaron dos pajillas de $\frac{1}{4}$ mL, en los carriles 6, 12 y 18 se utilizó una pajilla de $\frac{1}{4}$ mL, en el resto de los carriles se utilizaron dos pajillas de $\frac{1}{2}$ mL. En los carriles 1 al 4 y 7 al 10, se aprecia la presencia de mucha proteína. Sin embargo en los carriles donde se utilizaron una o dos pajillas de $\frac{1}{4}$ mL se observa poca proteína y mejor calidad del ADN. Del Valle, Rodríguez y Espinoza (2004) mencionan que la diferencia en la cantidad y calidad de ADN observada en algunas extracciones podría deberse, a la presencia de ARN. El tratamiento tres en los carriles 13, 14, 15 y 16 no se observó ADN, esto posiblemente debido a la cantidad de muestra utilizada, y al poco tiempo empleado para que se llevara a cabo la lisis celular ya que este protocolo únicamente considera 20 minutos en incubación a 60°C . Becton Dickinson (2008) y Durviz (2008)

menciona que la baja o nula cantidad de ADN o lisis celular incompleta obtenido de algún protocolo, en algunas ocasiones se debe al exceso de muestra utilizado, por lo que es recomendable utilizar menor cantidad o prolongar el tiempo de incubación en el paso correspondiente a la lisis.

Las bandas de ADN observadas en los carriles 5, 11, 17 y 6, 12, 18, indica una desproteínización aceptable, esto debido a la mejor relación solución de lisis y cantidad de muestra utilizada, mientras que el ADN observado en los carriles 1 al 4 del tratamiento uno y 7 al 11 del tratamiento dos, presenta contaminación de proteínas, ocasionado por el exceso de muestra. Cattaneo *et al.* (1997); Buttler, (2001) mencionan que una técnica que permite extraer el ADN de un medio que contenga contaminantes es mucho más prometedora que un método que busque extraer los contaminantes de la preparación. El extraer el ADN con un protocolo o método adecuado minimiza los problemas de contaminación puesto que no se requiere extraer todo el ADN allí presente sino obtenerlo en una cantidad y calidad suficiente sobre todo cuando éste va a ser utilizado para pruebas moleculares. La remoción de los contaminantes del extracto es usualmente una tarea difícil que con frecuencia lleva a inhibición de las reacciones o errores en la amplificación (Buttler, 2001). Tratándose de métodos fenólicos de desproteínización, la no remoción adecuada de proteínas en los extractos para la obtención de ADN es un indicador de deficiencia en el procedimiento (Maniatis, 1982). En el Cuadro 1 se muestra la cantidad y calidad del ADN obtenida en cada uno de los tratamientos. Para el tratamiento uno, todos los valores de la relación A_{260}/A_{280} son inferiores 0.1, lo mismo se presentó en el tratamiento dos en los

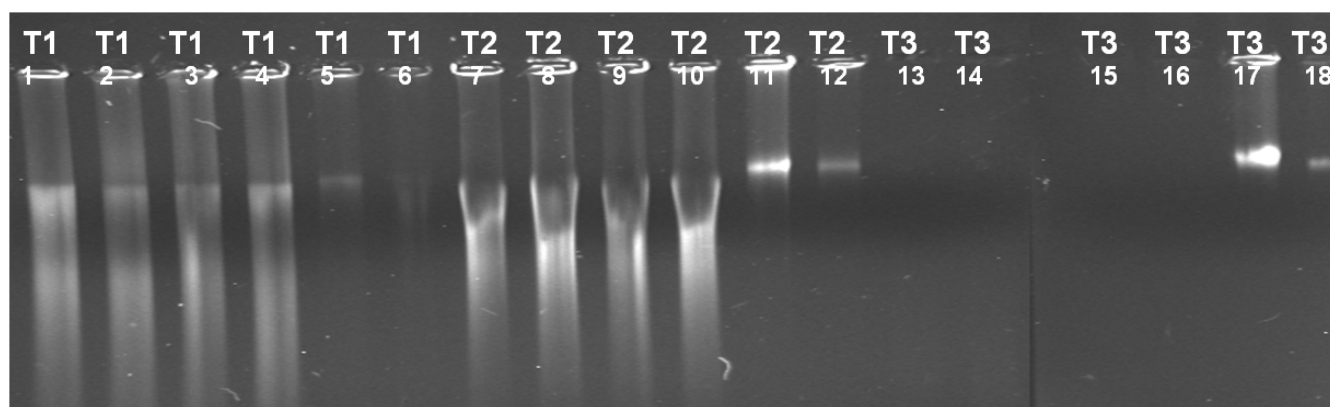


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (0.8%) del ADN extraído con los diferentes protocolos. Carriles 1 al 6, Tratamiento uno, 7 al 12, tratamiento dos y 13 al 18, tratamiento tres

carriles del 7 al 10, esto indica presencia de muchos contaminantes en la muestra, sin embargo, en el carril 11 se observa un valor de 0.57, indicando este la presencia de proteínas. Para el carril 12, el valor encontrado fue 1.45, indicando la presencia de ADN y poca contaminación de proteínas. Para el caso del tratamiento tres, los carriles 13 al 16 no se observaron presencia de ADN en el gel de agarosa y los valores encontrados indican la presencia de contaminación. El carril 17 y 18, se observa un valor de 1.28 y 2.55 respectivamente, indicando la presencia de contaminantes y de ADN.

Para la relación $A_{260} \text{ nm}/A_{230} \text{ nm}$, se aprecian los valores en el cuadro uno, el tratamiento uno en los carriles uno al seis, siete al 11 y 13 al 16 para el tratamiento dos y tres respectivamente, muestran la presencia de carbohidratos, proteínas o fenoles. El carril 12 del tratamiento dos y 17 del tratamiento tres presentan valores cercanos al rango de pureza.

Del Valle *et al.* (2004), mencionan que una proporción de 0.6 para la relación (A_{260}/A_{280}) corresponde a la presencia única de proteínas; y una proporción entre 1.8–2.0, corresponde a un 90% - 100% de pureza de los ácidos nucleicos. Al respecto, Schultz *et al.* (1994); Del Valle *et al.* (2004); De Jesús *et al.* (2005) mencionan que los valores mayores a 2.0 de la relación indican exceso de ARN

Cuadro 1. Valores de la absorbancia de ADN bicatenario de semen bovino criopreservado extraídos con tres protocolos.

Carril	Tratamiento	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	1	0.13
2	1	-0.35
3	1	-0.25
4	1	-0.48
5	1	-0.63
6	1	-0.55
7	2	-0.13
8	2	2.88
9	2	-0.40
10	2	-0.48
11	2	3.23
12	2	28.40
13	3	-0.63
14	3	-0.43
15	3	-0.43
16	3	-0.60
17	3	41.38
18	3	14.58

en la muestra y para la relación (A_{260}/A_{230}) valores menores a 2.0 indican presencia de carbohidratos, proteínas o fenoles, indicando también la integridad de los ácidos nucleicos (ARN), valores inferiores a 2.0 permiten suponer la presencia de degradación de las moléculas. En este estudio el análisis de la pureza (A_{260}/A_{280}) no mostró diferencias entre los tratamientos cuando se utilizan dos pajillas de $\frac{1}{2}$ mL por muestra, esto indica que la cantidad de muestra utilizada es demasiada en relación a la cantidad de reactivo aplicado para la reacción de lisis. El tratamiento dos mostró mejor resultado cuando se utilizo una pajilla de $\frac{1}{4}$ mL, para el tratamiento tres el mejor resultado se logro utilizando dos pajillas de $\frac{1}{4}$ mL.

CONCLUSIONES

Para la extracción de ADN de semen bovino criopreservado se debe utilizar una pajilla de $\frac{1}{4}$ mL por muestra con la técnica descrita por Penacino (1997) y dos pajillas de $\frac{1}{4}$ mL por muestra para la técnica rápida descrita por Penacino (1997). No se recomienda utilizar dos o mas pajillas de $\frac{1}{2}$ mL por muestra con ningún protocolo de los aquí evaluados.

LITERATURA CITADA

- Becton Dickinson. 2008. Kit S QuickGene de extracción de ADN en Tejidos (DT-S). Para aislamiento de ADN genómico de muestras en tejidos. Manual. Fuji Photo Film Co., Ltd. Life science products division. Nishiazabu 2-Chome, Minato-ku, TOKYO. JAPAN. 18 p
- Boeta, M., y L. Zarco. 2000. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de semen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas, Veterinaria México. Nota de Investigación. No 001.
- Buttler, J. 2001. Forensic DNA Typing; Biology and Technology behind STR Markers. Academic, California, USA. 322 p.
- Cattaneo, C.; O. J. Craig and N. R. Sokol. 1997. Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene frequencies. J. Forensic Sci. 42: 1126-1135.
- De Jesús, R.; N. Moreno y J. A. Martínez. 2005. Ensayo de dos métodos de extracción de ADN de ratón para ser usado en el control genético de

- ratones consanguíneos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Revista Científica* 15 (2): 134-140.
- Del Valle, C.; A. Rodríguez y M. Espinoza. 2004. Comparación de tres métodos de extracción de ADN a partir de restos óseos. *Complejo de Ciencias Forenses del Organismo de Investigación Judicial, Heredia, Costa Rica. Rev. Biol. Trop.* 52 (3): 717-725
- Durviz, S. L. 2008. Kit extracción DNA SSS. REA1. RBME01/ RBME02. 5 pp.
- Hernández, P. J. E.; R. F. Fernández, R. Y. Gutiérrez, I. A. Córdova y N. E. Gómez. 2003. Adición de ácido ascórbico en el diluyente para congelar semen de bovino y su efecto en la motilidad y viabilidad de semen posdescongelado. *Rev. Salud Anim.* 25 (1): 39-44.
- Maniatis, T.; E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab, New York, 468 p.
- Medina Robles, V.M.; E. Sánchez Carvajal, Y. M. Velasco Santamaria y P. E. Cruz Casallas. 2007. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA) *Revista Orinoquia* 11 (1): 75-86.
- Miesfeld, R. 1999. *Applied Molecular Genetics*. John Wiley, New York, USA. 293 p.
- Olivares R. y R. Urdaneta. 1985. Colección, evolución y procesamiento del semen de toros. *Fonaiap Divulga* (17): 4-9.
- Penacino, G. A. 1997. Investigación e implementación de sistemas de identificación de individuos por técnicas de biología molecular, con especial referencia a los estudios post-mortem. Tesis doctoral. Unidad de Análisis de ADN, Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos, Buenos Aires, Argentina.
- Schultz, D. J.; R. Craig, D. L. Cox Foster, R. O. Mumma and J. I. Medford. 1994. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 310-316.
- Steel, R. G. D.; J. H. Torrie and D. A. Dickey. 1997. *Principles and procedures of statistics*, 3rd. ed. McGraw Hill.
- Yoshida, K.; K. Sekiguchi, N. Mizuno, K. Kasai, I. Sakai, H. Sato and S. Seta, S. 1995. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Science International. National Research Institute of Police Science. Chiyoda-ku, Tokyo. Japan* p. 25-33.