

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Criopreservación de germoplasma masculino *ex vivo* en  
bovinos adultos**

Proyecto de Investigación

**Nathaly Alejandra Chicaiza Cabezas**

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 03 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Criopreservación de germoplasma masculino *ex vivo* en bovinos adultos**

**Nathaly Alejandra Chicaiza Cabezas**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte García, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 03 de mayo de 2018

## Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Nathaly Alejandra Chicaiza Cabezas

Código: 00116809

Cédula de Identidad: 1723884654

Lugar y fecha: Quito, 03 de mayo de 2018

## **DEDICATORIA**

Al mundo. Espero que este trabajo contribuya en el desarrollo de estudios de conservación que reviertan de alguna manera todo el daño que hemos causado. Esta es una parte de mi contribución.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y mis hermanos, por ser mi compañía y aliento en esta larga pero satisfactoria experiencia. Este logro es tan suyo como mío.

A Pedro Aponte, por ser mi guía y apoyo en el desarrollo del presente trabajo.

A mis amigos, gracias por cinco años de amor.

## RESUMEN

La pérdida de diversidad genética en especies silvestres y domésticas de mamíferos requiere del desarrollo de técnicas que permitan conservar su germoplasma. La criopreservación es una herramienta que permite el almacenamiento prolongado de material biológico a temperaturas criogénicas para suspender su actividad celular y evitar su degradación. Aunque la criopreservación de semen sea la técnica más utilizada para la conservación de germoplasma, la criopreservación de tejido gonadal es una alternativa para casos en los que esta no sea posible. La disponibilidad e importancia económica de los bovinos los convierte en modelos animales para el desarrollo de protocolos de conservación que puedan ser aplicados en otras especies de mamíferos. Es así que el objetivo de este estudio fue conservar germoplasma masculino *ex vivo* en bovinos adultos mediante criopreservación. Para esto se utilizaron dos criopreservantes, uno basado en DMSO y otro basado en yema de huevo y glicerol, sobre tejido testicular y tejido de la cola del epidídimo de bovinos. Se evaluó el cambio en parámetros como integridad de la membrana citoplasmática, motilidad, viabilidad, morfología, integridad del acrosoma e integridad de la cromatina en espermatozoides recuperados de los tejidos descongelados, así como cambios histológicos. Con el criopreservante basado en DMSO se obtuvieron porcentajes más altos en integridad de membrana de espermatozoides de la cola del epidídimo ( $9,0 \pm 2,5$  %), viabilidad de espermatozoides testiculares ( $9,3 \pm 0,9$  %) e integridad de la cromatina en espermatozoides testiculares ( $61,6 \pm 11,4$ ). Adicionalmente se comprobó que el almacenamiento de epidídimos a temperatura de refrigeración por 24 horas no altera la integridad de membrana, motilidad, viabilidad, integridad del acrosoma e integridad de la cromatina. Los resultados obtenidos demuestran que la criopreservación de tejido testicular y de la cola del epidídimo son alternativas para la conservación de germoplasma.

*Palabras clave:* criopreservación, germoplasma, tejido testicular, epidídimo, bovinos, DMSO, glicerol.

## ABSTRACT

The decrease on genetic diversity of wild and domestic mammal species requires the development of techniques that allow to conserve its germplasm. Cryopreservation is a tool that allows the long-term storage of biological material under cryogenic temperatures to suspend its cellular activity and avoid its degradation. Though semen cryopreservation is the most used technique for germplasm conservation, cryopreservation of gonadal tissue is an alternative for scenarios where semen cryopreservation is not possible. The availability and economic importance of bovine species makes them ideal animal models for the development of conservation protocols that can be applied on other mammal species. The aim of this study was to conserve male germplasm *ex vivo* in adult bovines by cryopreservation. This was achieved by using two cryoprotectants, one based on DMSO and the second based on egg-yolk and glycerol, to be used on the cryopreservation of testicular tissue and tissue from the epididymis cauda. Changes in cytoplasmic membrane integrity, motility, morphology, acrosome integrity and chromatin integrity were evaluated on spermatozoa recovered from the frozen-thawed tissue. With DMSO based cryoprotectant higher percentages were obtained regarding parameters as membrane integrity of epididymal spermatozoa ( $9,0 \pm 2,5$  %), viability of testicular spermatozoa ( $9,3 \pm 0,9$  %) and chromatin integrity of testicular spermatozoa ( $61,6 \pm 11,4$ ). Additionally, it was proven that the storage of epididymis at refrigeration temperatures for 24 hours did not alter the membrane integrity, motility, viability, acrosome integrity and chromatin integrity. The results obtained demonstrate that cryopreservation of testicular and epididymal tissue are alternatives for germplasm conservation.

*Key words:* cryopreservation, germplasm, testicular tissue, epididymis, bovine, DMSO, glycerol.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1. Preservación de germoplasma animal .....	11
1.2. Bovinos como animales modelo para la preservación de germoplasma .....	11
1.3. Criopreservación.....	12
1.4. Criobiología y efectos de la criopreservación .....	15
1.5. Agentes crioprotectores .....	17
1.6. Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino.....	18
1.7. Material usado en la criopreservación de germoplasma masculino .....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
2.1. Objetivo general .....	20
2.2. Objetivos específicos .....	20
<b>3. ÁREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>21</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>5. MATERIALES .....</b>	<b>22</b>
5.1. Procesamiento del material.....	22
5.2. Análisis histológico .....	22
5.3. Análisis espermático.....	23
5.4. Congelamiento lento.....	24
5.5. Descongelamiento rápido .....	25
5.6. Análisis estadístico .....	25
<b>6. MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
6.1. Recolección y procesamiento del material .....	25
6.2. Diseño experimental .....	26
6.3. Análisis histológico .....	27
6.4. Análisis espermático.....	28
6.5. Congelamiento lento.....	30
6.6. Descongelamiento rápido .....	31
6.7. Análisis estadístico .....	32
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
7.1. Análisis en muestras de tejido testicular.....	32
7.2. Análisis en muestras de tejido de la cola del epidídimo usando criopreservantes ....	35
7.3. Análisis en muestras de tejido de la cola del epidídimo sin uso de criopreservantes 37	37
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>48</b>

10.	RECOMENDACIONES.....	48
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	50
12.	TABLAS.....	60
13.	FIGURAS.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Pesos de los testículos y epidídimos usados en los experimentos.....	60
-----------------	--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Evaluación de viabilidad en espermatozoides usando tinción de eosina/nigrosina.	60
<b>Figura 2.</b>	Morfologías identificadas usando tinción de eosina/nigrosina.....	61
<b>Figura 3.</b>	Evaluación de integridad del acrosoma en espermatozoides bovinos usando tinción de Giemsa.....	61
<b>Figura 4.</b>	Evaluación de integridad de la cromatina en espermatozoides bovinos usando tinción de azul de toluidina.....	62
<b>Figura 5.</b>	Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	62
<b>Figura 6.</b>	Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	63
<b>Figura 7.</b>	Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	63
<b>Figura 8.</b>	Gráfico de interacciones entre los tamaños de las muestras de tejido testicular y los criopreservantes utilizados sobre la viabilidad espermática en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento.....	64
<b>Figura 9.</b>	Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	65
<b>Figura 10.</b>	Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	65
<b>Figura 11.</b>	Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	66
<b>Figura 12.</b>	Gráfico de efectos principales de los criopreservantes usados sobre la integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento.....	67

<b>Figura 13.</b> Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes .....	67
<b>Figura 14.</b> Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	68
<b>Figura 15.</b> Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	69
<b>Figura 16.</b> Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	69
<b>Figura 17.</b> Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.....	70
<b>Figura 18.</b> Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes .....	71
<b>Figura 19.</b> Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas .....	71
<b>Figura 20.</b> Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas .....	72
<b>Figura 21.</b> Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas .....	72
<b>Figura 22.</b> Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas. Se distinguieron cinco morfologías .....	73
<b>Figura 23.</b> Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas .....	73
<b>Figura 24.</b> Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas .....	74
<b>Figura 25.</b> Sección microscópica de tejido testicular post-congelación bajo diferentes tratamientos de criopreservación.....	75
<b>Figura 26.</b> Sección microscópica de tejido de la cola del epidídimo post-congelación bajo diferentes tratamientos de congelación usando criopreservantes.....	76
<b>Figura 27.</b> Sección microscópica de tejido de la cola del epidídimo post- congelación bajo diferentes a diferentes tiempos de procesamiento y temperaturas de congelación .....	77

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Preservación de germoplasma animal**

En las últimas décadas se ha evidenciado una pérdida considerable de diversidad genética tanto en poblaciones domésticas como silvestres, la cual ha llevado a catalogar a este periodo como una sexta ola de extinción (Desalle & Amato, 2017). Dentro de las soluciones que se han propuesto, una de las que ha captado mayor interés es el desarrollo de biobancos. Estos son depósitos de material biológico que permiten capturar y mantener la diversidad genética de una especie a partir de su germoplasma (Purdy, Wilson, Spiller, & Blackburn, 2016). El germoplasma animal consiste en el material genético que se transmite mediante gametos y que funciona como recurso genético ya que comprende células o tejidos que se pueden usar para generar nuevos individuos (Cabrera, Caicedo, & Aponte, 2017). El germoplasma masculino incluye semen y tejido testicular (Devi & Goel, 2016; Lima & DaSilva, 2017).

La conservación de germoplasma permite no solo restaurar poblaciones silvestres en peligro de extinción (Paiva, McManus, & Blackburn, 2016), sino también preservar la fertilidad en humanos que requieren tratamientos gonadotóxicos (Onofre, Baert, Faes, & Goossens, 2016), desarrollar técnicas en medicina regenerativa (Del Vento et al., 2018) y mantener la diversidad de especies de alto valor genético e interés agrícola (FAO, 2012).

### **1.2. Bovinos como animales modelo para la preservación de germoplasma**

La intensificación de la agricultura y los cambios en la demanda del mercado son las principales causas de pérdida de diversidad genética (Devi & Goel, 2016). Ya que el número limitado de individuos disponibles para experimentación y la vulnerabilidad de las especies silvestres no permite su uso en el desarrollo de protocolos de investigación, una alternativa es el uso de especies domésticas como modelos para generar conocimientos básicos que permitan desarrollar protocolos para otras especies (Strand et al., 2016).

Además de su uso como modelos animales, la conservación de germoplasma en especies domésticas se enfoca principalmente en mantener su potencial económico, mantener la estabilidad de los sistemas agrícolas y mantener su diversidad con fines de investigación (FAO, 2012). Dado que la ganadería es una de las actividades económicas de mayor relevancia a nivel mundial (Thornton, 2010), y que existe un fácil acceso a bovinos, esta podría ser una especie modelo para estudiar técnicas de conservación mediante criopreservación que se puedan aplicar en especies de mamíferos silvestres. Además, esta práctica representa ventajas como reducción de costos en la alimentación y en el transporte animal (Ribeiro-Peres, Munita-Barbosa, Yumi-Kanazawa, Mello-Martins, & Ferreira de Souza, 2014).

### **1.3. Criopreservación**

La criopreservación se define como el uso de temperaturas criogénicas para el almacenamiento de material biológico en un estado vivo y estructuralmente intacto mediante la suspensión de la actividad celular (Bakhach, 2009; Jang et al., 2017). El objetivo de esta técnica de conservación es suspender reacciones químicas, procesos biológicos y actividades extra e intracelulares para evitar la degradación de las células o el tejido durante su almacenamiento *ex vivo* (Bakhach, 2009; Campbell & Brockbank, 2007). Las técnicas de criopreservación se clasifican según la tasa de congelación usada, y aunque existen varios métodos el congelamiento lento, la vitrificación y el congelamiento rápido son las más utilizadas (FAO, 2012).

#### **1.3.1. Congelamiento lento**

El congelamiento lento es una técnica en la que se usa una tasa óptima y específica de congelación, según el tipo celular, que permite deshidratar la célula antes de alcanzar la temperatura a la cual se forman cristales de hielo (Onofre et al., 2016). El congelamiento lento se caracteriza por un periodo de equilibrio, en el cual aumenta la fuerza osmótica y ocurre un

eflujo de agua desde la célula, de manera que esta es sustituida por un agente crioprotector (FAO, 2012).

Dentro de la célula se mantiene una fracción no congelada, cuyo volumen disminuye mientras que su concentración de azúcares, sales y crioprotectores aumenta hasta que la viscosidad es tan alta que la fase líquida se convierte en un sólido amorfo sin cristales de hielo (FAO, 2012). Si la tasa es lo suficientemente lenta, el eflujo de agua será rápido y se prevendrá la formación de hielo intracelular debido a la eliminación del supercongelamiento (Jang et al., 2017). El supercongelamiento implica que la formación de hielo no empieza en el punto de congelación del crioprotector debido a que la tensión superficial de los cristales pequeños es mayor que en cristales grandes. Es decir que su punto de fusión/congelamiento disminuye (FAO, 2012).

Aunque esta técnica tenga la ventaja de no ser tóxica debido al uso de bajas concentraciones de crioprotector (Onofre et al., 2016), la principal desventaja es que si la tasa de congelación no es la óptima ocurre supercongelamiento (Jang et al., 2017). Este se controla mediante nucleación, que consiste en la organización de moléculas de agua en un núcleo cuando el sistema se encuentra a bajas temperaturas (Elliott, Wang, & Fuller, 2017). Esta puede ser heterogénea, cuando es catalizada por un sustrato sólido o líquido en contacto con agua, u homogénea, cuando las moléculas de agua se asocian y forman estructuras que promueven la nucleación. En muestras biológicas que pasan por un proceso de criopreservación, la nucleación ocurre de manera heterogénea (Elliott et al., 2017; Morris & Acton, 2013). La nucleación controlada durante la congelación de espermatozoides evita la formación de hielo intracelular mediante la formación de hielo extracelular (Morris & Acton, 2013).

El congelamiento lento se puede realizar como un proceso controlado o no controlado. En el proceso controlado se usan refrigeradores programables para controlar la tasa de

disminución de temperatura, mientras que en el proceso no controlado la tasa de congelación es gradual (aproximadamente  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) en congeladores convencionales hasta llegar a  $-80^{\circ}\text{C}$ . En ambos procesos se mantiene un periodo de equilibrio hasta alcanzar  $4^{\circ}\text{C}$ , y finalmente las muestras son almacenadas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Devi & Goel, 2016). La elección del método depende de las condiciones disponibles (Ribeiro-Peres et al., 2014).

### **1.3.2. *Vitrificación***

La vitrificación es una técnica de criopreservación en la que el material se solidifica sin pasar por una fase de cristalización (Curaba et al., 2011). En esta técnica se evita la formación de hielo debido a que la alta viscosidad del medio, combinada con una tasa rápida de congelamiento, permite la solidificación del líquido sin cristalización, de manera que la célula se encuentra en un estado vídrioso (Devi & Goel, 2016). El medio de criopreservación contiene una alta concentración de crioprotectores, lo que contribuye a una alta viscosidad de la solución y consecuentemente a una limitación en el movimiento de agua. Además, el aplicar una alta de congelación evita que ocurra nucleación y congelamiento (Pegg, 2007).

La principal desventaja de la vitrificación es la toxicidad de los crioprotectores debido a las altas concentraciones requeridas. Sin embargo, el uso de crioprotectores con más grupos polares permite una mayor unión a las moléculas de agua y por ende una menor concentración necesaria (Best, 2015). Otra desventaja es que si la vitrificación no ocurre de manera completa se pueden formar cristales intracelulares que romperían la membrana celular debido a fuertes flujos osmóticos (Onofre et al., 2016). Este problema también puede ocurrir si la tasa de descongelamiento no es lo suficientemente rápida, ya que ocurre nucleación y crecimiento de cristales de hielo (Pegg, 2007).

### **1.3.3. *Congelamiento rápido***

El congelamiento rápido es una técnica de criopreservación en la que el intercambio de agua y crioprotectores entre la célula y el medio no alcanza un estado de equilibrio antes de

que empiece el congelamiento (Shaw & Jones, 2003). Esta técnica se considera como un intermedio entre congelamiento lento y la vitrificación, ya que la tasa es más rápida que en el congelamiento lento pero utiliza una concentración más baja de crioprotectores que la vitrificación (AbdelHafez, Desai, Abou-Setta, Falcone, & Goldfarb, 2010; Zhu et al., 2014). El congelamiento rápido requiere una tasa ultrarápida de congelación, de manera que cuando la muestra disuelta en el medio de crioprotección es expuesta de manera directa e inmediata a nitrógeno líquido se espera que no se formen cristales de hielo en el medio intracelular ni extracelular ya que estos pasan a un estado vídrioso (Djuwantono et al., 2011).

#### **1.4. Criobiología y efectos de la criopreservación**

A temperaturas menores a 0°C los efectos celulares están dominados por el comportamiento del agua, ya que esta comprende el 80% de la masa de los tejidos (Pegg, 2007). Cuando las células son expuestas a temperaturas de congelación se pierde el equilibrio osmótico entre las células y su medio, de manera que el medio extracelular empieza a congelarse a -5°C, pero el interior de la célula permanece descongelado. Si la tasa de congelación y concentración de criopreservante no son controladas, las células pasan por un proceso de supercongelamiento entre -5°C y -10°C, en el cual aumenta la concentración de solutos en el medio extracelular y las células se equilibran mediante deshidratación. Cuando alcanzan una temperatura de -10°C a -15°C crecen los cristales de hielo extracelulares y se ensamblan en la membrana mediante enlaces de hidrógeno (Onofre et al., 2016). De esta manera, la congelación produce varios efectos en la célula, de cuyo control depende el éxito del proceso.

##### **1.4.1. Efectos fisicoquímicos**

Los efectos físicos incluyen deshidratación celular, estrés mecánico, cristalización intracelular y shock térmico. La deshidratación celular ocurre cuando la concentración de iones en el medio extracelular aumenta y se forma un gradiente de concentración que genera

la entrada de solutos y la salida de agua en la célula (Bakhach, 2009). La deshidratación causa lesiones celulares como desnaturalización de proteínas y lipoproteínas debido a la alta concentración de sales del medio y a la cristalización de sales de buffer, generando cambios importantes en el pH (Bakhach, 2009).

El estrés mecánico se refiere a la destrucción mecánica de la membrana plasmática debido a la formación de cristales, lo que promueve procesos como lisis, apoptosis o necrosis (Lee et al., 2014; Pegg, 2007). La congelación del medio también produce la formación de canales en los que se mantiene una fracción no congelada. Las células se concentran en estos canales y la alta densidad causa deformación celular (Bakhach, 2009).

La cristalización intracelular ocurre debido a la formación de hielo extracelular, principalmente con tasas rápidas de congelación. Esto ocurre cuando se forma hielo extracelular, lo cual impide la salida de agua de las células y ocurre nucleación intracelular (Bakhach, 2009; Morris & Acton, 2013).

Finalmente, el shock térmico ocurre entre 0 y  $-80^{\circ}\text{C}$  debido a cambios en la composición de aniones como acetato, cloruro, nitrato, yoduro y sulfato en el medio extracelular (Bakhach, 2009). Este proceso afecta principalmente a células espermáticas de diferentes especies de mamíferos (Curry, 2007), y está relacionado con cambios en la composición lipídica de la membrana (Mandal, Badyakar, & Chakrabarty, 2014). En bovinos, una alta concentración de colesterol libre, ácidos grasos libres, triacilglicerol y colesterol éster están asociados a una menor motilidad y fertilidad de los espermatozoides (Kikuchi et al., 1998).

#### **1.4.2. Efectos biológicos y genéticos**

Entre algunos efectos biológicos que pueden ocurrir durante la congelación están la formación de burbujas de gases en el espacio intracelular o efectos osmóticos debido a la fusión de cristales de hielo (Bakhach, 2009). Por otra parte, en cuanto a efectos genéticos, la criopreservación puede desestabilizar la cromatina y aumentar la susceptibilidad del ADN a

desnaturalización (Lin & Tsai, 2012). Estudios han demostrado que este proceso también provoca cambios en la expresión de miRNA asociados a proteínas críticas para procesos metabólicos (Zhang et al., 2017) y en el perfil epigenético celular, ya sea por alteración en la expresión de enzimas relacionadas a la metilación del ADN (Chatterjee et al., 2017), cambios en la acetilación de histonas (Elliott et al., 2017) u otros mecanismos.

### **1.5. Agentes crioprotectores**

Un agente crioprotector es un soluto que se añade al diluyente o medio celular para proteger a las células de efectos de criopreservación tales como shock térmico, estrés osmótico y alteraciones en la membrana (Layek, Mohanty, Kumaresan, & Parks, 2016). Estas moléculas protegen a las células debido a que se unen a las moléculas de agua y la vuelven osmóticamente inactiva, de manera que ya no se encuentra disponible para formar cristales de hielo (Elliott et al., 2017). Los crioprotectores deben cumplir con ciertas características como ser biológicamente aceptables, tener la capacidad de penetrar la célula, alta solubilidad en agua y baja toxicidad (Jang et al., 2017). Dependiendo de su peso molecular estos pueden ser extracelulares o intracelulares.

#### **1.5.1. *Crioprotectores extracelulares o no permeables***

Los crioprotectores no permeables son moléculas de alto peso molecular que no penetran la célula y que previenen la formación de cristales de hielo intracelulares mediante una rápida deshidratación (Lima & DaSilva, 2017). Estas moléculas también estabilizan proteínas mediante interacciones con la membrana lipídica (Costa et al., 2017) y corresponden principalmente a azúcares como glucosa, sacarosa o trehalosa (Best, 2015). Una desventaja de estos crioprotectores es que altas concentraciones generan estrés osmótico en las células previo a la congelación (FAO, 2012).

### **1.5.2. Crioprotectores intracelulares o permeables**

Los crioprotectores permeables son moléculas de bajo peso molecular que tienen la capacidad de penetrar la célula. Estos interactúan con las cabezas polares de los fosfolípidos de la bicapa lipídica y estabilizan la fase de gel de las membranas celulares (Best, 2015; Elliott et al., 2017). Los crioprotectores permeables más usados son dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y glicerol (Taşdemir et al., 2013). Estos reducen la concentración de electrolitos en la fracción no congelada y tienen acción antioxidante (Best, 2015; Jang et al., 2017).

### **1.6. Anatomía y fisiología del aparato reproductor masculino en mamíferos**

Los testículos son las gónadas masculinas, cuya función consiste en la producción de hormonas y espermatozoides. El parénquima testicular se organiza en un compartimento tubular e intertubular. El compartimento tubular se compone de túbulos seminíferos, los cuales a su vez se conforman por *tunica propria*, epitelio seminífero y lumen tubular (Lara et al., 2018). En el epitelio seminífero se encuentran células germinales, que darán origen a los espermatozoides, y células somáticas, como las células de Sertoli. Estas secretan moléculas requeridas por las células espermáticas y forman la barrera hemo-testicular (Griswold, 2018). Por otra parte, el compartimento intertubular se compone principalmente por células de Leydig. Estas se encargan de la biosíntesis y regulación en la producción de testosterona (Zirkin & Papadopoulos, 2018).

Los túbulos seminíferos forman una red llamada *rete testis*, de la cual se derivan los conductos eferentes. Estos se conectan al vaso deferente mediante un ducto largo y complejo llamado epidídimo. Además de transportar a los espermatozoides, el epidídimo cumple con otras importantes funciones como almacenamiento, maduración, desarrollo de la motilidad espermática y desarrollo del potencial de fertilización (Robaire, Hinton, & Orgebin-Crist, 2006). El epidídimo se divide en cuatro regiones: segmento inicial, cabeza, cuerpo y cola; y se

compone de cinco tipos celulares (Robaire et al., 2006). Las células de cada región del epidídimo tienen patrones de expresión específicos que aseguran que los espermatozoides desarrollen su motilidad y capacidad fecundante. De esta manera, en la cabeza ocurre la maduración temprana, en el cuerpo la maduración tardía y en la cola se almacenan las células espermáticas maduras (Browne, Yang, Leir, Eggener, & Harris, 2016).

Durante la maduración de los espermatozoides en el epidídimo ocurren cambios bioquímicos necesarios para una fertilización exitosa en un proceso denominado capacitación. Estos cambios incluyen la salida de colesterol de la membrana plasmática, la cual provoca un aumento en la permeabilidad a iones de calcio y bicarbonato, así como cambios en la actividad de cinasas y en los niveles de cAMP (Ickowicz, Finkelstein, & Breitbart, 2012).

### **1.7. Material usado en la criopreservación de germoplasma masculino**

En mamíferos, el semen ha sido el material más usado en estudios de criopreservación para la aplicación de técnicas de reproducción asistida y el desarrollo de bancos genéticos (Blackburn, 2018). El semen es el fluido expulsado en la eyaculación, el cual contiene no solo espermatozoides sino también fluidos secretados por glándulas accesorias (Cunha et al., 2016). El plasma seminal se compone de moléculas y factores que permiten la supervivencia y transporte de espermatozoides en el tracto femenino, y que modulan la capacidad de fertilización (Karunakaran & Devanathan, 2017). Este ha sido el germoplasma de preferencia debido a su fácil recolección y altas tasas de fertilidad que se pueden alcanzar (Purdy et al., 2016). Sin embargo, la recolección de semen es difícil en animales silvestres, o imposible en animales prepuberales o de interés económico que mueren de forma repentina (Albers & Barrios, 2011; Bertol et al., 2013). Es por esto que se han desarrollado técnicas de obtención y criopreservación de germoplasma a partir de tejido testicular (Devi & Goel, 2016; Sadri-Ardekani & Atala, 2014) y espermatozoides del epidídimo (Takeo et al., 2014).

La criopreservación de espermatozoides de la cola del epidídimo se ha propuesto como alternativa debido a que en esta región se almacena y preserva la fertilidad de los gametos (Robaire et al., 2006). Ya que no en todas las situaciones es posible obtener y criopreservar espermatozoides de la cola del epidídimo o de tejido testicular de manera inmediata, ya sea por falta de equipos o personal técnico (Bertol et al., 2013), es importante desarrollar protocolos de criopreservación de tejido que permitan obtener espermatozoides de buena calidad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Conservar germoplasma masculino *ex vivo* en bovinos adultos mediante criopreservación.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Criopreservar trozos de tejido testicular y aislar espermatozoides provenientes de estos en bovinos adultos.
- Criopreservar trozos de tejido de la cola del epidídimo y aislar espermatozoides provenientes de estos en bovinos adultos.
- Evaluar parámetros de integridad de la membrana plasmática, motilidad, viabilidad, morfología, integridad del acrosoma e integridad de la cromatina en espermatozoides provenientes de tejido testicular sometido a diferentes tratamientos de crioprotección.
- Evaluar parámetros de integridad de la membrana plasmática, motilidad, viabilidad, morfología, integridad del acrosoma e integridad de la cromatina en espermatozoides provenientes de tejido de la cola del epidídimo sometido a diferentes tratamientos de crioprotección.
- Evaluar la capacidad crioprotectora *in situ* del tejido de la cola del epidídimo en ausencia de agentes crioprotectores.

### **3. ÁREA DE ESTUDIO**

Se obtuvieron testículos de toros adultos mediante la Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito. Los protocolos de criopreservación, análisis seminales y análisis histológicos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito. Los cortes histológicos de las muestras se realizaron en el laboratorio de Patología del área de Sanidad Animal en Agrocalidad, ubicado en Tumbaco.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La alta tasa de pérdida de diversidad genética que se vive actualmente concierne no solo al área de conservación, sino que también tiene impactos agrícolas y económicos. Esta pérdida está asociada a cambios en la demanda del mercado y en el manejo de sistemas agrícolas (Devi & Goel, 2016). Una alta diversidad en especies domésticas permite una mejor respuesta a cambios en los ecosistemas y una mejor eficiencia de producción (FAO, 2012).

La conservación de germoplasma de especies domésticas es una herramienta necesaria para mantener la estabilidad de los sistemas agrícolas (FAO, 2012), y dado que la ganadería es una de las principales actividades económicas a nivel mundial (Thornton, 2010), el desarrollo de técnicas de criopreservación y biotecnologías reproductivas es esencial. Además de suplir las necesidades agrícolas, el uso de especies domésticas permite generar modelos para el desarrollo de protocolos de conservación en especies silvestres (Strand et al., 2016).

En mamíferos, la criopreservación ha sido un proceso eficiente al ser aplicado en técnicas de reproducción asistida usando semen como material inicial (Curry, 2007). Aunque su recolección es fácil y presenta una alta tasa de fertilidad (Purdy et al., 2016), su uso se complica en algunos escenarios puntuales. En el caso de especies silvestres, estas están sujetas a legislaciones de protección en la mayoría de los países y no se han establecido protocolos de recolección de semen en la mayoría de ellas. Por otra parte, los animales prepuberales carecen de gametos, y los animales élite de alto valor genético que mueren de

forma repentina requieren de protocolos y esquemas temporales para la recolección de material seminal (Albers & Barrios, 2011; Bertol et al., 2013). Es por esto que se requieren alternativas que permitan conservar el germoplasma masculino en estas situaciones.

Entre las posibles alternativas se ha propuesto el uso de tejido testicular para mantener la capacidad reproductiva (Curaba et al., 2011; Lima & DaSilva, 2017; Pacchiarotti et al., 2013; Sadri-Ardekani & Atala, 2014) y la recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo (Almeida et al., 2017; Bachtell, Conaghan, & Turek, 1999; Bertol et al., 2013). En este estudio también se propone el uso de material tisular de la cola del epidídimo con fines de criopreservación.

## **5. MATERIALES**

### **5.1. Procesamiento del material**

- 6 pares de testículos de toros adultos
- Cajas Petri
- Pinzas y bisturí

### **5.2. Análisis histológico**

- Tubos Falcon de 15 mL
- Solución de Bouin:
  - 70% Ácido pícrico saturado
  - 25% Formaldehído
  - 5% Ácido acético glacial
- Etanol 70%, 95% y 100%
- Xilol
- Paraplast
- Moldes para inclusión en parafina
- Casetes histológicos

- Micrótopo
- Baño de flotación
- Portaobjetos y cubreobjetos
  - Alcohol ácido:
  - 70% Etanol absoluto
  - 5% 1N Ácido clorhídrico (HCl)
- Polilisina (1:100)
- Hematoxilina de Harris
- Medio de montaje

### **5.3. Análisis espermático**

- Cajas Petri
- Bisturí
- PBS
- Tubos Eppendorf

#### **5.3.1. Evaluación de motilidad y permeabilidad de membrana**

- 0,15 M Fructosa
- 57 mM Citrato de sodio
- Portaobjetos y cubreobjetos

#### **5.3.2. Evaluación de viabilidad y morfología**

- Cloruro de sodio (NaCl)
- Reactivo Nigrosina
- Reactivo Eosina Y
- Portaobjetos

### **5.3.3. Evaluación de integridad del acrosoma**

- Etanol 96%
- Giemsa 6% (v/v)
- Portaobjetos

### **5.3.4. Evaluación de integridad de la cromatina**

- 0,1 M Ácido cítrico
- 0,2 M Fosfato de sodio
- Acetona
- Etanol 96%
- 1N Ácido clorhídrico (HCl)
- Azul de toluidina
- Portaobjetos

## **5.4. Congelamiento lento**

### **5.4.1. Criopreservante basado en DMSO**

- Medio Mínimo Esencial (Minimum Essential Medium, MEM) 1X:
  - 10% MEM 10X
  - 1.7% Bicarbonato de sodio
  - 2% L-glutamina
  - 1% Aminoácidos no esenciales
  - 1% Penicilina/Estreptomicina
  - 3% HEPES buffer
  - 0,4% Gentamicina (10 mg/mL)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Suero Fetal Bovino (Fetal Calf Serum, FCS)
- 0,14M Sacarosa

- Tubos Falcon de 15 mL
- Papel aluminio autoclavado
- Tanque de nitrógeno líquido

#### **5.4.2. Criopreservante basado en yema de huevo y glicerol**

- 2 yemas de huevo
- 88 mM Ácido cítrico monohidratado
- 55 mM glucosa
- Glicerol
- Tubos Falcon de 15 mL
- Papel aluminio autoclavado
- Tanque de nitrógeno líquido

#### **5.5. Descongelamiento rápido**

- MEM 1X
- Suero Fetal Bovino (FCS)
- PBS
- Tubos Falcon de 15 mL

#### **5.6. Análisis estadístico**

- Software Estadístico Minitab 17 (Minitab Inc., 2018)

### **6. MÉTODOS**

#### **6.1. Recolección y procesamiento del material**

Se recolectaron seis pares de testículos de toros adultos de 2 a 3 años de edad en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito. Estos se transportaron a 5°C hasta el laboratorio de Biotecnología Animal de la USFQ. Los testículos se lavaron con agua corriente y se colocaron en cajas Petri, donde se removió la túnica vaginal parietal con subcapas externas y el epidídimo y se pesaron los epidídimos y testículos. Se asignó un número a cada

par de testículos y se identificaron como derecho e izquierdo. Se separó la cola del epidídimo de cada epidídimo y se realizaron cortes transversales de tejido testicular y tejido de la cola del epidídimo. De los segmentos testiculares se obtuvieron cubos de tejido testicular.

## **6.2. Diseño experimental**

Se evaluó la acción de dos criopreservantes en la congelación de trozos de diferentes tamaños de tejido testicular y en tejido de la cola del epidídimo siguiendo un protocolo de congelamiento lento no controlado. Se utilizaron los testículos y epidídimos definidos como derechos, se tomaron muestras y se realizaron análisis seminales e histológicos, los cuales se utilizaron como controles iniciales del proceso. En el tejido testicular se cortaron trozos catalogados como grandes (aproximadamente  $1 \text{ cm}^3$ ) y pequeños (aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^3$ ), mientras que en el tejido de la cola del epidídimo se manejó un solo tamaño (aproximadamente  $0,5 \text{ cm}^3$ ). Cada tipo de muestra (testículo grande, testículo pequeño y epidídimo) se congeló usando criopreservantes basados ya sea en DMSO o en yema de huevo y glicerol, así como controles internos sin criopreservante.

También se evaluó la capacidad crioprotectora del medio interno del tejido de la cola del epidídimo. Se mantuvieron epidídimos en refrigeración ( $4^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas, se tomaron muestras y se realizaron análisis seminales e histológicos, los cuales se usaron como controles iniciales. Se congelaron trozos de la cola del epidídimo sin ningún criopreservante usando un protocolo de congelamiento lento no controlado. También se congelaron y almacenaron las colas de los epidídimos completas en un congelador doméstico a  $-20^\circ\text{C}$ .

Las muestras fueron descongeladas siguiendo un protocolo de descongelamiento rápido. Se realizaron los mismos análisis histológicos y seminales post-congelación. Se realizaron análisis estadísticos para determinar diferencias significativas entre los parámetros considerados dentro de los análisis seminales.

### 6.3. Análisis histológico

Se tomó una muestra pequeña de tejido, se colocó en un tubo Falcon de 15 mL y se fijó en solución de Bouin durante al menos dos días a temperatura ambiente y en oscuridad. Para su inclusión en parafina, se lavaron las muestras dos veces con etanol 70% para remover la mayor parte de la solución de Bouin y se siguió un protocolo de deshidratación con alcoholes crecientes: etanol 70% por 15 minutos (2 veces), etanol 95% por 20 minutos, etanol 95% por 20 minutos (2 veces), etanol 100% por 20 minutos (3 veces), xilol por 10 minutos, xilol por 5 minutos (2 veces), xilol: Paraplast (1:1) por 45 minutos, xilol:Paraplast (1:2) por 45 minutos y Paraplast por 30 minutos (2 veces). Finalmente se colocaron las muestras en moldes, los cuales se fijaron en casetes histológicos y se mantuvieron estos a 4°C hasta la realización de los cortes.

Se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un micrótopo semiautomático, se colocó cada corte de tejido en un baño de flotación a 40°C y se recolectó en portaobjetos limpios y previamente cubiertos con polilisina. Para cubrir los portaobjetos con polilisina, primero se mantuvieron en alcohol ácido durante 30 minutos, se lavaron con agua destilada, se secaron, se mantuvieron en polilisina (1:10) durante 5 minutos, se secaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Una vez colocados los cortes en las láminas portaobjetos, se removió la parafina del tejido de los portaobjetos con pasos de xilol alcoholes decrecientes: xilol por 3 minutos (3 veces), etanol 100% por 1 minuto y etanol 95% por 1 minuto. Se hidrató el tejido con agua destilada por 2 minutos (3 cambios) y se realizó una tinción con hematoxilina de Harris durante 15 segundos. Se lavaron las láminas con agua destilada y se mantuvieron en agua corriente durante 10 minutos para la diferenciación del colorante. Se lavaron las láminas con agua destilada y se deshidrató el tejido con etanol 95% por 1 minuto (2 veces), etanol 100% (2 veces) y xilol por 1 minuto (3 veces). Se colocaron dos gotas de medio de montaje sobre

cada corte de tejido coloreado en las láminas, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó secar durante 24 horas. Finalmente se observó la morfología de los tejidos por microscopía óptica a 400x.

#### **6.4. Análisis espermático**

Se colocó 1 mL de PBS 1X a los trozos de tejido y se extrajeron los espermatozoides mediante maceración mecánica con un bisturí. Se recuperó 1 mL de suspensión de espermatozoides en tubos Eppendorf y se mantuvieron a 37°C. Para realizar los frotis se colocó una gota (10 µL) de cada muestra en los portaobjetos y se realizaron las tinciones como se indica a continuación.

##### **6.4.1. Evaluación de motilidad y permeabilidad de membrana**

Para evaluar la motilidad y permeabilidad de la membrana plasmática de los espermatozoides se utilizó la prueba HOS (Hypo-osmotic Swelling). La solución HOS se preparó en dos fracciones. La fracción A 0,15 M fructosa y la fracción B 57 mM citrato de sodio. Se mezclaron las fracciones en partes iguales y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Al momento de realizar la prueba, se mezclaron 10 µL de la muestra con 20 µL de la solución HOS previamente calentada a 38 °C y se incubó a la misma temperatura durante 30 minutos. Se colocaron 10 µL de la mezcla en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía óptica a 400x. Se contaron al menos 150 espermatozoides por cada muestra y se consideró una membrana funcional al observar cambios en el volumen de la cola de los espermatozoides. La motilidad se evaluó subjetivamente otorgando valores de 0 a 5.

##### **6.4.2. Evaluación de viabilidad y morfología**

La evaluación de viabilidad e identificación de morfología espermática se realizó mediante tinción con el reactivo eosina/nigrosina. Se preparó una solución 0,9% cloruro de sodio, 5% nigrosina y 0,67% eosina Y en agua destilada. Con este fin se calentó la solución salina a 38°C, se agregó la eosina Y y la nigrosina. Se mantuvo en agitación durante 15

minutos. Se aumentó la temperatura y se retiró justo en el punto de ebullición. Se enfrió, filtró y almacenó la solución a 4°C en oscuridad hasta su uso.

Al momento de requerirse, se calentó el reactivo a 38°C y se mezclaron 6,5 µL de este con 6,5 µL de la muestra durante 30 segundos. Se realizó un frotis con 6,5 µL de la mezcla, se secó al aire rápidamente y se observó por microscopía óptica a 400x. Se contaron al menos 150 espermatozoides en cada frotis y se consideraron los que tenían una coloración rosada/morada en la región de la cabeza como aquellos no viables (Figura 1). También se identificaron 5 morfologías principales: espermatozoides normales, cabezas sin cola, gota citoplasmática distal (CD), doblez distal y defecto Dag (Figura 2).

#### **6.4.3. Evaluación de integridad del acrosoma**

La integridad del acrosoma se evaluó mediante una tinción con Giemsa. Se realizó un frotis de cada muestra, cada uno de los cuales se fijó en etanol 96% durante 10 minutos y se coloreó con Giemsa 6% (v/v) en agua destilada durante 12 horas. Se lavaron las láminas coloreadas con agua corriente, se dejaron secar y se observaron mediante microscopía óptica a 400x. Se contaron al menos 150 espermatozoides en cada frotis y se consideraron aquellos con una coloración rosada intensa en la zona del acrosoma como espermatozoides con acrosoma normal (Figura 3).

#### **6.4.4. Evaluación de integridad de la cromatina**

Para evaluar la integridad de la cromatina en las células espermáticas se usó una tinción de azul de toluidina en buffer McIlvane. El buffer se preparó en dos soluciones. La solución A ácido cítrico 0,1 M y la solución B fosfato de sodio 0,2 M. Se mezclaron las soluciones (70% solución A y 30% solución B), se ajustó el pH a 3,5 y se almacenó a 4°C hasta su uso, no más de 2 semanas después de su preparación.

Se realizó un frotis de cada muestra y se fijó durante 1 hora a 4°C en una solución de acetona y etanol 96% (1:1). Se lavaron los portaobjetos en agua destilada y se mantuvieron en

HCl 1N durante 5 minutos. Se realizó un segundo lavado y se colocó la solución de azul de toluidina durante 5 minutos. La solución de azul de toluidina se preparó con 50% de buffer McIlvane en agua destilada y 0,05% de azul de toluidina. Se lavaron los portaobjetos en agua destilada, se secaron y se observaron mediante microscopía óptica a 400x. Se contaron al menos 150 espermatozoides en cada frotis y se consideraron a aquellos con una coloración azul intensa en la zona de la cabeza como espermatozoides con ADN fragmentado (Figura 4).

## **6.5. Congelamiento lento**

### **6.5.1. Criopreservante basado en DMSO**

El criopreservante basado en DMSO se preparó en base al protocolo sugerido por (Izadyar et al., 2002), con 60% de MEM 1X, 20% DMSO y 20% de FCS. Este se suplementó con 0,14 M de sacarosa. Se colocaron las muestras en tubos Falcon de 15 mL y se mantuvieron a 4°C. En cada tubo se colocó 10 mL del criopreservante, gota a gota en tres fracciones, con un periodo de espera de 20 minutos entre fracción. Después de aplicar la última fracción se mantuvieron las muestras durante un periodo de equilibrio de 20 minutos a 4°C. Se descartó el criopreservante y se colocaron los trozos de tejido embebidos en papel aluminio previamente autoclavado. Las muestras envueltas se colocaron en tubos Falcon y se mantuvieron en congelación a -80°C. Después de tres días las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante una semana.

### **6.5.2. Criopreservante basado en yema de huevo y glicerol (YHG)**

El criopreservante basado en glicerol y yema de huevo se preparó en dos fracciones, modificando el protocolo sugerido por (De Leeuw, De Leeuw, Den Daas, Colenbrander, & Verkleij, 1993). La fracción A se preparó con 1 yema de huevo por cada 100 mL de solución, 80% de agua destilada, 88 mM ácido cítrico monohidratado y 55 mM glucosa. La fracción B se preparó con 1 yema de huevo por cada 100 mL de solución, 65% de agua destilada, 14% de

glicerol, 55 mM glucosa y 88 mM ácido cítrico monohidratado. En ambas soluciones se ajustó el pH a 7.

Se colocaron las muestras en tubos Falcon, se añadieron 10 mL de la fracción A y se mantuvieron a 4°C durante 1 hora. Se añadieron 10 mL de la fracción B y se mantuvo a 4°C durante un periodo de equilibrio de 4 horas. Se descartó el criopreservante y se colocaron los trozos de tejido embebidos en papel aluminio previamente autoclavado. Las muestras envueltas se colocaron en tubos Falcon y se mantuvieron en congelación a -80°C. Después de tres días las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido (-196°C) durante una semana.

### **6.5.3. Muestras sin criopreservante**

Las muestras sin criopreservante se colocaron directamente en papel aluminio previamente autoclavado y se siguió el protocolo de congelamiento dependiendo del tipo de muestra.

### **6.6. Descongelamiento rápido**

Se recuperaron las muestras empacadas en papel aluminio del tanque de nitrógeno y congelador, y se descongelaron de manera inmediata mediante inmersión en agua a 40°C durante 2 minutos. Después de su descongelamiento, las muestras embebidas en el criopreservante basado en DMSO se colocaron en tubos Falcon de 15 mL y se lavaron en 3 veces su volumen de MEM 1X con 5% FCS a 38 °C. Estos lavados se realizaron gota a gota en tres fracciones con un periodo de espera de 20 minutos entre fracción. Después de la última fracción se descartó la solución de lavado y se añadió el mismo volumen de la muestra en PBS a 38 °C. Las muestras embebidas en el criopreservante basado en yema de huevo y glicerol y las muestras congeladas sin criopreservante se lavaron en 3 veces su volumen de PBS a 38 °C. Se descartó la solución y se añadió el mismo volumen de la muestra en PBS a 38 °C. Después, se realizaron los análisis histológicos y seminales ya mencionados anteriormente.

## 6.7. Análisis estadístico

Mediante One-Way ANOVA se determinaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos aplicados y el control inicial para los parámetros ya mencionados anteriormente. También se realizó un test de Tukey (95% de confianza) para determinar diferencias significativas entre las medias de cada parámetro analizado. En el caso de encontrar diferencias significativas se realizó un Two-Way ANOVA para determinar los factores y las interacciones que influyen de manera significativa, así como gráficos de interacción y de efectos principales para determinar las combinaciones que producen los mejores resultados. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el software estadístico Minitab 17.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Análisis en muestras de tejido testicular

A partir de las muestras de tejido testicular se realizaron análisis para determinar diferencias significativas en varios parámetros espermáticos al comparar la actividad de criopreservantes basados en DMSO o en yema de huevo-glicerol. Se estudiaron dos tamaños de tejido testicular y se compararon con un control inicial, (analizado en el día 0 antes de la criopreservación) y con un control interno (tratamiento con tejido congelado sin criopreservante). Mediante One-Way ANOVA se determinó que no existieron diferencias significativas entre los animales usados para todos los parámetros analizados ( $P > 0,05$ ).

#### 7.1.1. *Integridad de la membrana plasmática*

No se mantuvo la integridad de la membrana plasmática en los espermatozoides de las muestras de ninguno de los tratamientos de criopreservación después del descongelamiento. En la Figura 5 se observa que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados y el control interno, pero si en relación al control inicial ( $P < 0,01$ ).

### **7.1.2. Motilidad**

No se observó motilidad en los espermatozoides después del congelamiento bajo ninguno de los tratamientos. En la Figura 6 se comparan las medias de la motilidad espermática de los tratamientos utilizados con el control inicial y el control interno. En el control inicial se observó una motilidad significativamente mayor que en el resto de los tratamientos post-congelación ( $P < 0,01$ ). Así mismo no existieron diferencias entre los tratamientos aplicados y el control sin criopreservante post-congelación.

### **7.1.3. Viabilidad**

Como se observa en la Figura 7, se determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos utilizados ( $P < 0,01$ ) y con el control inicial. A pesar de que todos los tratamientos generaron menores porcentajes de viabilidad que aquel del control inicial ( $P < 0,01$ ), los espermatozoides provenientes de los trozos pequeños de tejido testicular y tratados con criopreservante a base de DMSO tuvieron mejores porcentajes de supervivencia espermática que el resto de los tratamientos post-congelación. Dado que los factores tamaño, criopreservante y su interacción fueron significativos, se realizó un gráfico de interacciones (Figura 8). Este permitió reconfirmar al tratamiento de DMSO en trozos pequeños de tejido testicular como aquel en el que se obtuvo una mayor viabilidad.

### **7.1.4. Morfología**

En la Figura 9 se muestran los porcentajes de cinco morfologías principales reconocidas en muestras de tejido testicular de diferentes tamaños bajo diferentes protocolos de criopreservación. Los tratamientos post-congelación se compararon con un control inicial y un control interno. No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides con morfología normal ( $P > 0,05$ ). Se encontró una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) en el porcentaje de espermatozoides que presentaron morfología con gota

citoplasmática distal (CD) al aplicar tratamientos de congelamiento. Sin embargo, no se notaron diferencias entre los tratamientos y el control interno (sin criopreservante).

En cuanto a la morfología correspondiente a cabezas espermáticas sin cola, se observó una fuerte tendencia a un aumento en el porcentaje de esta morfología al aplicar tratamientos de congelamiento. Sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $P > 0,05$ ). Tampoco se observaron diferencias significativas entre el porcentaje de espermatozoides que presentaron defecto Dag en los tratamientos post-congelación y el control inicial ( $P > 0,05$ ). Finalmente, aunque se observó una considerable disminución de los porcentajes de presencia de la morfología doblez distal en relación al control inicial ( $P > 0,05$ ), no se observó que los factores tamaño ( $P > 0,05$ ), criopreservante ( $P > 0,05$ ) o su interacción ( $P > 0,05$ ) fueran significativos.

#### **7.1.5. Integridad del acrosoma**

Como se presenta en la Figura 10, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto al realizar comparaciones entre los tratamientos, el control interno y el control inicial ( $P > 0,05$ ).

#### **7.1.6. Integridad de la cromatina**

En la Figura 11 se presentan las medias de integridad de la cromatina para cada tratamiento. Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control inicial ( $P < 0,01$ ). Se determinó que el tamaño ( $P > 0,05$ ) y la interacción entre este factor y el criopreservante usado ( $P > 0,05$ ) no fueron significativos, mientras que el criopreservante usado si fue significativo. El criopreservante basado en DMSO fue el que presentó un menor descenso en el porcentaje de espermatozoides con cromatina íntegra post-congelación ( $P < 0,01$ ). Un análisis de interacciones entre los factores mencionados (Figura 12) indicó que el criopreservante que genera un mayor porcentaje de integridad de la cromatina es DMSO.

### **7.1.7. Análisis histológico**

La morfología del tejido testicular se vio afectada al aplicar tratamientos de congelación. Como se observa en la Figura 25, los túbulos seminíferos se mostraron menos organizados y con un mayor espacio entre sí post-congelación. La mejor morfología post-congelación, muy similar a la del control pre-congelación se observó en los trozos pequeños de tejido testicular criopreservados con una solución crioprotectora basada en DMSO.

## **7.2. Análisis en muestras de tejido de la cola del epidídimo usando criopreservantes**

Se determinaron diferencias significativas en varios parámetros al comparar la actividad de criopreservantes basados en DMSO y yema de huevo-glicerol en la preservación de espermatozoides obtenidos a partir de tejido de la cola del epidídimo. Mediante One-Way ANOVA se determinó que no existieron diferencias significativas entre los animales usados para todos los parámetros analizados ( $P > 0,05$ ).

### **7.2.1. Integridad de la membrana plasmática**

La integridad de la membrana plasmática disminuyó significativamente en todos los tratamientos después de la congelación, en comparación con el control inicial ( $P < 0,01$ ). En la Figura 13 se observa que al usar el criopreservante basado en DMSO hay una tendencia a un mayor porcentaje de integridad de membrana, sin embargo esta diferencia no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

### **7.2.2. Motilidad**

La motilidad disminuyó significativamente en los espermatozoides sometidos a congelamiento en comparación con el control inicial ( $P < 0,01$ ). Como se observa en la Figura 14, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a congelamiento, pero si en comparación con el control inicial.

### **7.2.3. Viabilidad**

Las muestras sometidas a tratamientos de criopreservación demostraron una viabilidad significativamente menor al control inicial ( $P < 0,01$ ), como se observa en la Figura 15. Aunque las muestras congeladas usando el criopreservante basado en yema de huevo-glicerol aparentan una mayor viabilidad, las diferencias entre los tratamientos que se congelaron no fueron significativas.

### **7.2.4. Morfología**

En la Figura 16 se muestran las cinco principales morfologías identificadas en espermatozoides obtenidos a partir de tejido de la cola del epidídimo. Se comparó el porcentaje de cada morfología del control inicial con los porcentajes obtenidos de los tratamientos que pasaron por un proceso de congelación. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de morfología normal, gotas citoplasmáticas distales (CD), cabezas sin cola y doblez distal ( $P > 0,05$ ). En cuanto al defecto Dag, se observó una disminución significativa en los tratamientos donde las muestras fueron congeladas, en comparación con el control inicial ( $P < 0,05$ ). Así mismo, no se observaron diferencias significativas entre dichos tratamientos post-congelación ( $P > 0,05$ ).

### **7.2.5. Integridad del acrosoma**

En la Figura 17 se observa una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional, en comparación con el control inicial ( $P < 0,01$ ). A pesar de que se observa una tendencia a mayor integridad en el tratamiento a base de DMSO, esta no fue significativa ( $P > 0,05$ ).

### **7.2.6. Integridad de la cromatina**

Como se presenta en la Figura 18, los espermatozoides de todos los tratamientos mostraron un 100% de integridad de la cromatina.

### **7.2.7. Análisis histológico**

Se observó una reducción en el lumen de las muestras post-congelación, como se presenta en la Figura 26. Estos resultados coinciden con los análisis espermáticos, en los cuales se comprobó una disminución significativa en los parámetros analizados post-congelación.

### **7.3. Análisis en muestras de tejido de la cola del epidídimo sin uso de criopreservantes**

Se determinaron diferencias estadísticas en varios parámetros al comparar tiempos de procesamiento y protocolos de congelación en espermatozoides obtenidos a partir de tejido de la cola del epidídimo. Mediante One-Way ANOVA se determinó que no existieron diferencias significativas entre los animales usados para todos los parámetros analizados ( $P > 0,05$ ).

#### **7.3.1. Integridad de la membrana plasmática**

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en los que se aplicó un tratamiento de congelación y en los que no ( $P < 0,01$ ). Como se observa en la Figura 19, el porcentaje de espermatozoides con membranas íntegras en el control inicial fue similar al correspondiente en muestras que estuvieron 24 horas en refrigeración ( $P > 0,05$ ). La congelación generó descensos estadísticamente significativos en la integridad de la membrana tanto en muestras congeladas en nitrógeno líquido como en refrigeradores domésticos a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 19). Estos dos últimos tratamientos no mostraron diferencias estadísticas entre sí ( $P > 0,05$ ).

#### **7.3.2. Motilidad**

Como se observa en la Figura 20, se observó una disminución significativa en la motilidad de los espermatozoides al aplicar protocolos de congelación ( $P < 0,01$ ). Esta disminución fue independiente de la temperatura de congelación ( $P > 0,05$ ). Por otra parte, no

se observaron diferencias significativas en la motilidad espermática al analizar el control inicial y las muestras que estuvieron en refrigeración durante 24 horas ( $P > 0,05$ ).

### **7.3.3. Viabilidad**

Se observó una reducción significativa en la viabilidad de los espermatozoides al aplicar protocolos de congelación ( $P < 0,01$ ). Como se observa en la Figura 21, la viabilidad se redujo independientemente de la temperatura de congelación aplicada ( $P > 0,05$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la viabilidad espermática al analizar el control inicial y las muestras que estuvieron en refrigeración durante 24 horas.

### **7.3.4. Morfología**

En la Figura 22 se presentan los porcentajes de las cinco morfologías espermáticas distinguidas. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las morfologías normal, gotas CD, cabezas sin cola y defecto Dag ( $P > 0,05$ ). En cuanto a la morfología doblez distal se observó un mayor porcentaje de espermatozoides con esta morfología en el tratamiento con una temperatura de congelación de  $-20\text{ °C}$  ( $P = 0,055$ ).

### **7.3.5. Integridad del acrosoma**

Se observó una reducción significativa en la integridad del acrosoma de los espermatozoides al aplicar protocolos de congelación ( $P < 0,01$ ). Como se observa en la Figura 23, la viabilidad se redujo independientemente de la temperatura de congelación aplicada ( $P > 0,05$ ). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en la integridad del acrosoma al analizar el control inicial y las muestras que estuvieron en refrigeración durante 24 horas.

### **7.3.6. Integridad de la cromatina**

No se observaron diferencias significativas en la integridad de la cromatina de los espermatozoides en ninguno de los tratamientos. Como se observa en a Figura 24 se obtuvo el

mismo resultado (100% de integridad de cromatina) independientemente del tiempo de procesamiento y temperatura de congelación.

### **7.3.7. Análisis histológico**

Como se presenta en la Figura 27, se observó una disminución considerable en el lumen en el tejido de la cola del epidídimo post-congelación en las dos temperaturas analizadas. En las muestras de tejido analizadas después de estar 24 horas en refrigeración y el control inicial se observó una morfología similar. Estos resultados coinciden con los análisis espermáticos, en los cuales no se observaron diferencias significativas debido al mantenimiento las muestras en refrigeración por 24 horas, pero si al congelarlas en nitrógeno líquido o en refrigeradores domésticos a -20 °C.

## **8. DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos al evaluar parámetros seminales bajo diferentes condiciones de congelación en tejido testicular y de la cola del epidídimo en bovinos, indican que la criopreservación de tejido gonadal es una alternativa para la conservación de germoplasma masculino. Además, se demostró que las muestras no requieren de un procesamiento inmediato si se almacenan en refrigeración, facilitando la aplicación de estas técnicas en casos especiales.

En la última década se ha documentado una rápida disminución en especies de mamíferos silvestres, estando una de cada cuatro especies en peligro de extinción (Silva, Lima, Peixoto, & Souza, 2015). El desarrollo de técnicas de criopreservación usando bovinos como modelos animales permitirá mantener la diversidad tanto de especies agrícolas, como de especies silvestres. Aunque la criopreservación sea una técnica extensamente aplicada en la conservación de semen (Lonergan, 2018), las dificultades que conlleva su recolección requieren de prácticas alternativas. De esta manera, la criopreservación de germoplasma a

partir de tejido testicular y de la cola del epidídimo puede ser utilizada para el desarrollo de bancos de germoplasma masculino de mamíferos.

En los experimentos realizados, independientemente del tratamiento de congelación, criopreservante y tejido utilizado, la integridad de la membrana plasmática y la motilidad de los espermatozoides post-congelación disminuyó. El porcentaje máximo de integridad de membrana alcanzado fue de  $9 \pm 2,51$  % usando un criopreservante basado en DMSO en espermatozoides obtenidos a partir de la cola del epidídimo, mientras que no se observó motilidad con ninguno de los tratamientos. Según Layek et al. (2016), la membrana plasmática es una de las estructuras que se ve mayormente afectada al aplicar tratamientos de criopreservación. A diferencia de este trabajo que utilizó trozos de tejido epididimario o testicular como fuente de espermatozoides, estudios similares en semen de toro, han demostrado una disminución significativa en estos parámetros (López & Rivera, 2015), sin embargo esta corresponde a una integridad y motilidad del 60%.

A fin de evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática se realizaron análisis de integridad de membrana y motilidad mediante la prueba Hypo-Osmotic Swelling (HOS). En esta se considera a la capacidad del espermatozoide de hincharse en la zona de la cola, en presencia de estrés hipo-osmótico, como un indicador de que el transporte de fluidos a través de la membrana es normal (Ramu & Jeyendran, 2013). De la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática depende la supervivencia y capacidad de fertilización de los espermatozoides (Dalton, 2011), por lo que es importante evaluar la alteración de estos parámetros post-congelación. Durante la criopreservación la membrana plasmática cambia de estado fluido a rígido, afectando su permeabilidad y límites de tolerancia osmóticos (Layek et al., 2016; Sieme, Oldenhof, & Wolkers, 2015). Además, se producen cambios en la concentración de solutos a nivel intracelular y extracelular debido a la formación de cristales de hielo (Bakhach, 2009). Estos cambios seguramente afectaron a los espermatozoides

evaluados, de manera que la generación de niveles osmóticos superiores a los tolerables causó pérdida de funcionalidad en la membrana plasmática.

Las diferencias obtenidas al criopreservar tanto trozos de tejido como material seminal pueden estar relacionadas a que las proteínas del plasma seminal son esenciales para la estabilidad de la membrana celular debido a que se unen a esta y cambian su permeabilidad (Cunha et al., 2016). Además, una de las principales limitaciones al criopreservar tejido es la distribución homogénea del criopreservante debido a que es más complicado alcanzar altas tasas de descongelación (Jang et al., 2017). Seguramente esta fue la razón por la que los porcentajes de integridad de membrana y motilidad obtenidos en el presente trabajo fueron bajos en comparación con otros estudios, pero mejores al utilizarse trozos más pequeños de tejido.

A pesar de que se han desarrollado técnicas y protocolos que permiten congelar muestras biológicas evitando la formación de hielo intracelular, este no ha sido el caso para técnicas de descongelación (Manuchehrabadi et al., 2017). La descongelación es uno de los pasos críticos en la supervivencia de los espermatozoides debido a los efectos que pueden ocurrir si la liberación de agua debido al derretimiento del hielo no es lo suficientemente rápida (Elliott et al., 2017). Entre los efectos están la cristalización debido al crecimiento de pequeños cristales de hielo (Manuchehrabadi et al., 2017), y la dilución localizada de solutos, causando un aumento en la concentración de sal y provocando daños irreversibles en la membrana (Elliott et al., 2017). Las bajas tasas de congelación seguramente también influyeron en la pérdida de integridad de la membrana plasmática.

Ya que la prueba HOS se realiza *in vivo*, también es posible evaluar la motilidad de los espermatozoides. Este parámetro disminuyó en todos los tratamientos y tejidos evaluados, a excepción del tejido almacenado en refrigeración por 24 horas. Este último no demostró variación significativa en comparación con el control inicial. Así como la criopreservación

afecta a la membrana plasmática, también ocurren daños en las membranas mitocondriales. Estos provocan disfunción mitocondrial y alteraciones en la producción de ATP, por lo que la motilidad disminuye post-congelación (O'Connell, McClure, & Lewis, 2002).

La viabilidad espermática post-congelación también disminuyó en todos los tratamientos y tejidos procesados. El mayor porcentaje de viabilidad obtenido fue de  $9.33 \pm 0.88$  %, usando criopreservante basado en DMSO y trozos pequeños de tejido testicular. Estudios de criopreservación han reportado porcentajes de viabilidad de entre el 50-60 % para espermatozoides eyaculados (Curry, 2007), y 40 % para espermatozoides recuperados del epidídimo (Strand et al., 2016). Sin embargo, en estos estudios, los espermatozoides tienen un periodo de vida muy limitado en comparación con la posibilidad de criopreservación a largo plazo. Este parámetro se analizó mediante tinción con eosina-nigrosina. Esta técnica se basa en el uso de dos colorantes. La eosina penetra la membrana de los espermatozoides no viables, mientras que la nigrosina permite tener un color de contraste para facilitar la labor de diferenciar los espermatozoides vivos y muertos. De esta manera los espermatozoides viables no presentan color y los no viables presentan un color de rosado a morado (Srivastava & Pande, 2017). Esta tinción también permite identificar las principales morfologías espermáticas.

Ya que el tamaño del tejido y el crioprotector usados fueron variables significativas, la baja viabilidad observada se puede deber a limitaciones en la transferencia homogénea del criopreservante en el tejido. Por otra parte, el DMSO es un solvente aprótico con una alta afinidad por agua, el cual actúa como crioprotector debido a que reemplaza una parte del agua dentro y fuera de las células, reduciendo el tamaño de cristales de hielo y limitando el incremento en la concentración de solutos durante el congelamiento (Papadopoulou, Chatzimeletiou, Syrrou, Kalinderis, & Iakovidou-Kritsi, 2015). Sin embargo, en el presente trabajo, bajo las condiciones utilizadas, solo contribuyó a la criopreservación de un porcentaje

limitado de espermatozoides. Por otra parte, la viabilidad de los espermatozoides post-congelación se ve afectada por su composición lipídica. En mamíferos, la susceptibilidad de la membrana plasmática a daños por criopreservación está relacionada a un alto ratio de ácidos grasos saturados: no saturados y bajo contenido de colesterol (Meseguer et al., 2004). El patrón de composición lipídica en los espermatozoides depende de su estado de maduración. De esta manera, mientras que los espermatozoides del epidídimo tienen un bajo contenido lipídico y alto contenido de ácidos grasos no saturados y colesterol (Mandal et al., 2014), los espermatozoides testiculares tienen un ratio óptimo de colesterol y fosfolípidos (Voglmayr, Chartier, & Sawyer, 1983). Esto permite que las membranas de los espermatozoides testiculares sean más cohesivas e impermeables, lo cual explicaría su tolerancia a bajas temperaturas. La diferencia en el ratio de lípidos entre espermatozoides testiculares y del epidídimo seguramente es la razón por lo que la viabilidad fue más alta en espermatozoides testiculares.

En cuanto a morfología, en los resultados obtenidos se observa que la morfología normal en los espermatozoides se mantuvo constante a pesar de los tratamientos de congelación. En el caso de los espermatozoides obtenidos a partir de tejido testicular esta morfología representó del 30-40%. Simerly et al. (2016) encontraron que las diferencias morfológicas de espermatozoides en tejido testicular están relacionadas a que estos son espermatozoides inmaduros. Por otra parte, en espermatozoides obtenidos a partir de tejido de la cola del epidídimo la morfología normal representó del 70-80%. En muestras de semen se ha reportado un porcentaje de espermatozoides con morfología normal de 65-75% (Walters et al., 2004). Estos resultados son similares a los obtenidos en las muestras de tejido de la cola del epidídimo en el presente trabajo ya que es en esta región donde se almacenan los espermatozoides maduros que serán eyaculados (Robaire et al., 2006). Es así que la diferencia

en los porcentajes obtenidos entre espermatozoides testiculares y del epidídimo se debe muy posiblemente a su estado de madurez.

Por otra parte, las cabezas espermáticas sin cola fueron el mayor defecto identificado en muestras de tejido testicular. Estudios previos indican a esta como la anomalía dominante en espermatozoides descongelados, y la atribuyen a daños por shock térmico (Khalil, El-Harairy, Zeidan, Hassan, & Mohey-Elsaeed, 2017). En las muestras obtenidas a partir de tejido de la cola del epidídimo las gotas citoplasmáticas distales fueron el mayor defecto observado. Estos resultados coinciden con un estudio realizado por Ribero-Peres et al. (2014) en espermatozoides del epidídimo en toros. Estudios indican que existe una relación entre anomalías morfológicas y bajas tasas de fertilidad en bovinos debido a modificaciones en el proceso de capacitación y en la interacción con ovocitos (Walters, Eyestone, Saacke, Pearson, & Gwazdauskas, 2004). Entre estas modificaciones se encuentra la presencia de gotas citoplasmáticas. Estas son remanentes del citoplasma de las células germinales que se mantienen adheridos en la región del cuello de las espermátidas durante la espermatogénesis (T.G. Cooper, 2005). Cuando los espermatozoides son transportados hacia la cola del epidídimo, esta gota migra desde el cuello hacia el anillo y se pierde cuando son eyaculados (T.G. Cooper, 2011). Esta morfología se considera como una anomalía ya que estudios indican que una incorrecta migración de las gotas citoplasmáticas está relacionada con pérdida de la motilidad y espermiogénesis anormal (Xu et al., 2013), lo cual incide en la fertilidad de los espermatozoides

En cuanto a la integridad de la membrana acrosomal, en muestras de tejido testicular no se observó variación post-congelación, manteniéndose en un 80-90%. El alto porcentaje de integridad acrosomal identificado podría deberse a que los espermatozoides testiculares están en un estado inmaduro. De esta manera, (Hirohashi & Yanagimachi, 2018) señalan que los espermatozoides requieren pasar por un proceso de capacitación que involucra a la reacción

del acrosoma, para adquirir la capacidad de fertilización. Aunque se induzca la maduración de los espermatozoides testiculares analizados, estos no serían capaces de fertilizar el ovocito mediante inseminación artificial debido a que es necesario que una membrana plasmática intacta se fusione con la membrana del acrosoma para que ocurra la reacción del acrosoma (Khalil et al., 2017). Sin embargo, (Mazur, Leibo, & Seidel, 2008) mencionan que aunque los espermatozoides se identifiquen como no viables debido a su pérdida de motilidad, metabolismo e integridad de membrana, aún pueden fertilizar ovocitos mediante técnicas como inyección intracitoplasmática.

En el caso de los espermatozoides obtenidos de tejido de la cola del epidídimo se observó una disminución considerable en la integridad del acrosoma post-congelación independientemente del criopreservante y la temperatura de congelación aplicadas. En apoyo a esta aseveración, estudios previos en espermatozoides del epidídimo de cerdos (Kikuchi et al., 1998) y toros (Khalil et al., 2017) muestran que la integridad del acrosoma se ve afectada por el congelamiento. La disminución en la integridad acrosomal en los espermatozoides provenientes de tejido del epidídimo podría explicarse en términos de alteraciones en la membrana inducidas por la criopreservación que se asimilan a cambios en la membrana de un espermatozoide cuyo acrosoma ha reaccionado (Talukdar et al., 2016). La reacción del acrosoma es el último paso en el proceso de capacitación (Karunakaran & Devanathan, 2017). Esta forma parte de un conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren en los espermatozoides desde su maduración en el epidídimo que son esenciales para una unión exitosa al ovocito (Ickowicz et al., 2012). Entre los cambios que ocurren durante la capacitación se encuentra un eflujo de colesterol, el cual cambia la organización de la membrana plasmática y aumenta su fluidez y permeabilidad a iones de bicarbonato y calcio (Ickowicz et al., 2012; Karunakaran & Devanathan, 2017). Los cambios que ocurren en la capacitación son similares a los cambios que ocurren por congelamiento,

por lo que estos reciben el nombre de criocapacitación. Los daños por criocapacitación incluyen fosforilación de tirosina, formación de ROS (reactive oxygen species) y desestabilización de lípidos de la membrana plasmática (Layek et al., 2016). En este sentido, (Srivastava et al., 2013) encontraron evidencia que sugiere que el contenido de colesterol de la membrana plasmática está relacionado con la integridad de la membrana del acrosoma. De esta manera, los cambios en el contenido lipídico de los espermatozoides del epidídimo explicarían su susceptibilidad a una reacción del acrosoma temprana.

En cuanto a los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo que se mantuvieron en refrigeración (4 °C) durante 24 horas, no se observó variación en ninguno de los parámetros analizados en relación al material recién colectado. Estos resultados coinciden con estudios previos en espermatozoides del epidídimo en los que se muestra que la integridad de la membrana plasmática, motilidad, viabilidad e integridad del acrosoma se mantienen por 24 horas a temperatura ambiente (Bertol et al., 2013) y a temperatura de refrigeración (4 °C) (Cunha et al., 2016; Khalil et al., 2017; Kikuchi et al., 1998; Strand et al., 2016). Estos estudios sugieren que los espermatozoides del epidídimo son resistentes a cambios de temperatura. De esta manera, en el caso de muerte repentina de un animal de interés se podrían mantener trozos de tejido del epidídimo en refrigeración por un periodo de 24 horas hasta su procesamiento.

Finalmente, para el análisis de integridad de cromatina se usó la tinción de azul de toluidina. Este es un colorante básico con alta afinidad por componentes ácidos en el tejido que permite verificar la susceptibilidad del ADN a desnaturalización (Ribeiro-Peres et al., 2014; Sridharan & Shankar, 2012). En los espermatozoides obtenidos de tejido testicular se observó un porcentaje máximo de integridad de 70% al usar DMSO como agente crioprotector. Según Ribeiro-Peres et al. (2014), un porcentaje que indica buena calidad en muestras frescas está entre 95-97%. Sin embargo, estudios en semen reportan disminución en

la integridad de la cromatina post-congelación (Khalil et al., 2017). En cuanto a espermatozoides obtenidos de tejido de la cola del epidídimo en este estudio, la integridad de la cromatina se mantuvo en 100%. Estos resultados coinciden con estudios previos que indican resultados similares y los atribuyen al estado de compactación de la cromatina (Angelopoulou, Plastira, & Msaouel, 2007). La cromatina espermática está compuesta por ADN nuclear y proteínas asociadas. Su integridad es esencial para el funcionamiento de los espermatozoides ya que defectos en esta están asociados con disfunciones en la motilidad, fertilización y desarrollo temprano del embrión (Khalil et al., 2017; Wu & Chu, 2008). Durante la espermiogénesis ocurren cambios en la cromatina como el reemplazo de protaminas en las histonas (Erenpreisa et al., 2003; Robaire et al., 2006). Durante la maduración en el epidídimo, las protaminas se enlazan mediante enlaces disulfuro y compactan la cromatina, de manera que mientras más compactada está es más difícil que el colorante se una (Andrabi, 2007). Esto podría explicar que la cromatina se haya mantenido íntegra en las muestras de epidídimo, pero los porcentajes hayan sido variables en las muestras de tejido testicular, en donde ocurren cambios en la constitución de las nucleoproteínas.

Por otra parte, la cromatina se puede desestabilizar durante la criopreservación debido a la alta fuerza iónica en el núcleo congelado e influjo excesivo de iones libres de calcio. Esto causa la activación de enzimas degradadoras de nucleoproteínas (Karunakaran & Devanathan, 2017). Otro factor atribuido es la producción de ROS, causando la activación de caspasas por el daño oxidativo (Khalil et al., 2017).

En general, los resultados obtenidos en todos los parámetros analizados indican que la mayor limitación en la criopreservación de tejido es la transferencia homogénea del agente crioprotector al interior de los tejidos donde se encuentran los espermatozoides. Sin embargo, esta es una técnica que debe ser mejorada debido a sus potenciales aplicaciones. La tolerancia

de los espermatozoides del epidídimo a temperaturas de refrigeración sugiere que estos se pueden usar en técnicas de reproducción o almacenamiento en un periodo de 24 horas desde la muerte del animal.

## **9. CONCLUSIONES**

La criopreservación de tejido testicular y tejido de la cola del epidídimo es una técnica alternativa para la conservación de germoplasma de mamíferos en escenarios donde la recolección de semen no es posible. Entre los parámetros analizados, los mejores resultados se obtuvieron utilizando DMSO con sacarosa y suero fetal bovino como agente crioprotector, sin embargo estos no cumplen con los porcentajes reportados como indicadores de buena calidad en estudios realizados utilizando material seminal. La principal limitación en la criopreservación de tejido es la transferencia de masa y calor, causando problemas en la distribución homogénea del criopreservante hacia el interior de los tejidos y en alcanzar tasas rápidas de descongelación.

El almacenamiento de epidídimos a temperatura de refrigeración por 24 horas no demostró cambios en los parámetros analizados en comparación con las muestras frescas. Esto implica que en el caso de que no se cuente con las condiciones adecuadas para obtener espermatozoides de un animal de interés ante su muerte repentina, los epidídimos pueden ser almacenados por un periodo de al menos 24 horas a 4 °C para su procesamiento.

## **10. RECOMENDACIONES**

- Disminuir el tamaño de los trozos de tejido que serán criopreservados y utilizar criopreservantes basados en DMSO.
- Utilizar mayores volúmenes de material a criopreservar a fin de compensar los bajos porcentajes de calidad espermática post-congelación.
- Mantener las muestras a una temperatura de 4 °C durante su procesamiento post-congelación para reducir la tasa de las reacciones metabólicas de células testiculares no

espermáticas que puedan conducir a la muerte de los espermatozoides. Con este mismo fin, utilizar antioxidantes en las soluciones criopreservantes.

- Modificar el proceso de remoción del criopreservante post-congelación, mediante la adición de un buffer hipertónico seguido de un buffer isotónico para evitar daños osmóticos.
- Usar temperaturas más altas de descongelación para disminuir el tiempo en el cual se derriten los cristales de hielo y evitar la formación de cristales grandes que comprometan la integridad de la membrana plasmática y acrosómica de los espermatozoides.
- Usar los resultados obtenidos para establecer protocolos definidos que permitan la conservación de germoplasma espermático en otras especies de mamíferos mediante la criopreservación de tejido testicular y de la cola del epidídimo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- AbdelHafez, F. F., Desai, N., Abou-Setta, A. M., Falcone, T., & Goldfarb, J. (2010). Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 20(2), 209-222. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.11.013>
- Almeida, F. C., Silva, S. V., Souza, H. M., Gomes, W. A., Lima Filho, J. A. C., Wicke, A. A., ... Guerra, M. M. P. (2017). Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. *Andrologia*, 49(3), e12623. <https://doi.org/10.1111/and.12623>
- Andrabi, S. M. H. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(12), 561-569. <https://doi.org/10.1007/s10815-007-9177-y>
- Angelopoulou, R., Plastira, K., & Msaouel, P. (2007). Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(1), 36. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-5-36>
- Bachtell, N. E., Conaghan, J., & Turek, P. J. (1999). The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, 14(12), 3048-3051. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.12.3048>
- Bakhach, J. (2009). The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*, 5(3), 119-126. <https://doi.org/10.4161/org.5.3.9583>
- Bertol, M. A. F., Weiss, R. R., Thomaz-Soccol, V., Kozicki, L. E., Fujita, A. S., Abreu, R. A. de, & Green, K. T. (2013). Viability of bull spermatozoa collected from the

- epididymis stored at 18-20°C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(5), 777-783. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000500008>
- Best, B. P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422-436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
- Blackburn, H. D. (2018). Biobanking Genetic Material for Agricultural Animal Species. *Annual Review of Animal Biosciences*, 6(1), 69-82. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014603>
- Browne, J. A., Yang, R., Leir, S.-H., Eggener, S. E., & Harris, A. (2016). Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. *Molecular Human Reproduction*, 22(2), 69-82. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav066>
- Cabrera, F., Caicedo, A., & Aponte, P. M. (2017). Usos potenciales de germoplasma animal masculino con fines de preservación de fauna silvestre. *Bionatura*, 2(4), 465-467. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.10>
- Campbell, L. H., & Brockbank, K. G. M. (2007). Serum-free solutions for cryopreservation of cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43(8-9), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9039-z>
- Chatterjee, A., Saha, D., Niemann, H., Gryshkov, O., Glasmacher, B., & Hofmann, N. (2017). Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*, 74, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.12.002>
- Cooper, T. G. (2005). Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, 20(1), 9-11. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh555>
- Cooper, T. G. (2011). The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13(1), 130-138. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.97>

- Costa, G. M. J., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Figueiredo, A. F. A., Tavares, A. O., Rezende-Neto, J. V., ... França, L. R. (2017). Horse spermatogonial stem cell cryopreservation: feasible protocols and potential biotechnological applications. *Cell and Tissue Research*, 370(3), 489-500. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2673-1>
- Cunha, A. T. M., Carvalho, J. O., Kussano, N. R., Martins, C. F., Mourão, G. B., & Dode, M. A. N. (2016). Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*, 73(3), 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.170>
- Curaba, M., Verleysen, M., Amorim, C. A., Dolmans, M.-M., Van Langendonck, A., Hovatta, O., ... Donnez, J. (2011). Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by vitrification. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1229-1234.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.062>
- Curry, M. R. (2007). Cryopreservation of Mammalian Semen. En J. Day & G. Stacey (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (2.<sup>a</sup> ed., Vol. 368, pp. 303-311). Totowa, NJ: Humana Press.
- Dalton, J. C. (2011). Semen Quality Factors Associated with Fertility. *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, 265-281.
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of Various Cryoprotective Agents and Membrane-Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>
- Del Vento, F., Vermeulen, M., de Michele, F., Giudice, M., Poels, J., des Rieux, A., & Wyns, C. (2018). Tissue Engineering to Improve Immature Testicular Tissue and Cell Transplantation Outcomes: One Step Closer to Fertility Restoration for Prepubertal

- Boys Exposed to Gonadotoxic Treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 286. <https://doi.org/10.3390/ijms19010286>
- Desalle, R., & Amato, G. (2017). Conservation Genetics, Precision Conservation, and De-extinction. *Hastings Center Report*, 47, S18-S23. <https://doi.org/10.1002/hast.747>
- Devi, L., & Goel, S. (2016). Fertility preservation through gonadal cryopreservation. *Reproductive Medicine and Biology*, 15(4), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s12522-016-0240-1>
- Djuwantono, T., Wirakusumah, F. F., Achmad, T. H., Sandra, F., Halim, D., & Faried, A. (2011). A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34+ enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. *BMC Research Notes*, 4(1), 371. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-371>
- Elliott, G. D., Wang, S., & Fuller, B. J. (2017). Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.004>
- Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., ... Pjanova, D. (2003). Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry*, 52A(1), 19-27. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.10015>
- FAO. (2012). *Cryoconservation of animal genetic resources*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Griswold, M. D. (2018). 50 years of Spermatogenesis: Sertoli cells and their Interactions with Germ Cells. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y027>
- Hirohashi, N., & Yanagimachi, R. (2018). Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y045>

- Ickowicz, D., Finkelstein, M., & Breitbart, H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*, *14*(6), 816-821. <https://doi.org/10.1038/aja.2012.81>
- Izadyar, F., Matthijs-Rijssenbilt, J. J., den Ouden, K., Creemers, L. B., Woelders, H., & de Rooij, D. G. (2002). Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of Andrology*, *23*(4), 537-545.
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., ... Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, *6*(1), 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- Karunakaran, M., & Devanathan, T. G. (2017). Evaluation of bull semen for fertility-associated protein, *in vitro* characters and fertility. *Journal of Applied Animal Research*, *45*(1), 136-144. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1129343>
- Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2017). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Kikuchi, K., Nagai, T., Kashiwazaki, N., Ikeda, H., Noguchi, J., Shimada, A., ... Kaneko, H. (1998). Cryopreservation and Ensuing In Vitro Fertilization Ability of Boar Spermatozoa from Epididymides Stores at 4°C. *Theriogenology*, *50*, 615-623.
- Lara, N. L. M., Costa, G. M. J., Avelar, G. F., Lacerda, S. M. S. N., Hess, R. A., & de França, L. R. (2018). Testis Physiology—Overview and Histology. En *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64567-1>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, *172*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>

- Lee, Y.-A., Kim, Y.-H., Ha, S.-J., Kim, K.-J., Kim, B.-J., Kim, B.-G., ... Ryu, B.-Y. (2014). Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose1. *Journal of Animal Science*, 92(3), 984-995. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6843>
- Lima, D. B. C., & DaSilva, L. D. M. (2017). Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, 47(11). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170135>
- Lin, C., & Tsai, S. (2012). The effect of cryopreservation on DNA damage, gene expression and protein abundance in vertebrate. *Italian Journal of Animal Science*, 11(1), e21. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e21>
- Lonergan, P. (2018). Review: Historical and futuristic developments in bovine semen technology. *Animal*, 1-15. <https://doi.org/10.1017/S175173111800071X>
- López, N., & Rivera, D. (2015). *Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de toro*. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras.
- Mandal, R., Badyakar, D., & Chakrabarty, J. (2014). Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. *Advances in Andrology*, 2014, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2014/190542>
- Manuchehrabadi, N., Gao, Z., Zhang, J., Ring, H. L., Shao, Q., Liu, F., ... Bischof, J. C. (2017). Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. *Science Translational Medicine*, 9(379), eaah4586. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4586>
- Mazur, P., Leibo, S. P., & Seidel, G. E. (2008). Cryopreservation of the Germplasm of Animals Used in Biological and Medical Research: Importance, Impact, Status, and

- Future Directions. *Biology of Reproduction*, 78(1), 2-12.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064113>
- Meseguer, M., Garrido, N., Martínez-Conejero, J. A., Simón, C., Pellicer, A., & Remohí, J. (2004). Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. *Fertility and Sterility*, 81(3), 588-594. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.09.035>
- Minitab Inc. (2018). *Minitab 17*. Minitab Inc. Recuperado a partir de <http://www.minitab.com/en-us/>
- Morris, J. G., & Acton, E. (2013). Controlled ice nucleation in cryopreservation – A review. *Cryobiology*, 66(2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.11.007>
- O’Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704-709. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>
- Onofre, J., Baert, Y., Faes, K., & Goossens, E. (2016). Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human Reproduction Update*, 22(6), 744-761. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw029>
- Pacchiarotti, J., Ramos, T., Howerton, K., Greilach, S., Zaragoza, K., Olmstead, M., & Izadyar, F. (2013). Developing a Clinical-Grade Cryopreservation Protocol for Human Testicular Tissue and Cells. *BioMed Research International*, 2013, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/930962>
- Paiva, S. R., McManus, C. M., & Blackburn, H. (2016). Conservation of animal genetic resources – A new tact. *Livestock Science*, 193, 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.09.010>

- Papadopoulou, E., Chatzimeletiou, K., Syrrou, M., Kalinderis, A., & Iakovidou-Kritsi, Z. (2015). Cytogenetic behavior of cryoprotectant DMSO. *Aristotle University Medical Journal*, 42(1).
- Pegg, D. E. (2007). Principles of Cryopreservation. En J. Day & G. Stacey (Eds.), *Methods in Molecular Biology: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (2.<sup>a</sup> ed., Vol. 368, pp. 39-57). Totowa, NJ: Humana Press.
- Purdy, P. H., Wilson, C. S., Spiller, S. F., & Blackburn, H. D. (2016). Biobanking genetic resources: challenges and implementation at the USDA National Animal Germplasm Program. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(8), 1072. <https://doi.org/10.1071/RD15399>
- Ramu, S., & Jeyendran, R. S. (2013). The Hypo-osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity. En D. T. Carrell & K. I. Aston (Eds.), *Spermatogenesis* (Vol. 927, pp. 21-25). Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_3)
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Robaire, B., Hinton, B., & Orgebin-Crist, M.-C. (2006). The Epididymis. En J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (3.<sup>a</sup> ed., pp. 1701-1148). Elsevier.
- Sadri-Ardekani, H., & Atala, A. (2014). Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(3), 68. <https://doi.org/10.1186/scrt457>

- Shaw, J. M., & Jones, G. M. (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6), 583-605. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg041>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20-26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- Silva, A. R., Lima, G., Peixoto, G., & Souza, A. L. (2015). Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility. *Research and Reports in Biodiversity Studies*, 1. <https://doi.org/10.2147/RRBS.S54294>
- Sridharan, G., & Shankar, A. A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP*, 16(2), 251. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>
- Srivastava, N., & Pande, M. (2017). *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. Springer.
- Srivastava, N., Srivastava, S., Ghosh, S., Kumar, A., Perumal, P., & Jerome, A. (2013). Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(2), 126-131. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60132-3](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60132-3)
- Strand, J., Ragborg, M. M., Pedersen, H. S., Kristensen, T. N., Pertoldi, C., & Callesen, H. (2016). Effects of post-mortem storage conditions of bovine epididymides on sperm characteristics: investigating a tool for preservation of sperm from endangered species. *Conservation Physiology*, 4(1), cow069. <https://doi.org/10.1093/conphys/cow069>
- Takeo, T., Fukumoto, K., Kondo, T., Haruguchi, Y., Takeshita, Y., Nakamuta, Y., ... Nakagata, N. (2014). Investigations of motility and fertilization potential in thawed

- cryopreserved mouse sperm from cold-stored epididymides. *Cryobiology*, 68(1), 12-17. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.10.007>
- Talukdar, D. J., Ahmed, K., Deka, B. C., Sinha, S., Deori, S., & Das, G. C. (2016). Cryo-capacitation changes during cryopreservation of swamp buffalo spermatozoa. *Indian Journal of Animal Sciences*, 86(4), 397-400.
- Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydın, F. N., ... Gürcan, İ. S. (2013). Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. *Cryobiology*, 66(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.10.006>
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853-2867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>
- Voglmayr, J. K., Chartier, D. M., & Sawyer, R. F. (1983). Viability of ram testicular spermatozoa following cryopreservation in rete testis fluid. *Cryobiology*, 20(4), 421-431. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(83\)90032-9](https://doi.org/10.1016/0011-2240(83)90032-9)
- Walters, A. H., Eyestone, W. E., Saacke, R. G., Pearson, R. E., & Gwazdauskas, F. C. (2004). Sperm Morphology and Preparation Method Affect Bovine Embryonic Development. *Journal of Andrology*, 25(4), 554-563. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02826.x>
- Wu, T. F., & Chu, D. S. (2008). Sperm Chromatin. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 7(10), 1876-1886. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800005-MCP200>
- Xu, H., Yuan, S.-Q., Zheng, Z.-H., & Yan, W. (2013). The cytoplasmic droplet may be indicative of sperm motility and normal spermiogenesis. *Asian Journal of Andrology*, 15(6), 799-805. <https://doi.org/10.1038/aja.2013.69>

- Zhang, Y., Dai, D., Chang, Y., Li, Y., Zhang, M., Zhou, G., ... Zeng, C. (2017). Cryopreservation of boar sperm induces differential microRNAs expression. *Cryobiology*, 76, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.013>
- Zhu, J., Jin, R., Wu, L., Johansson, L., Guo, T., Liu, Y., & Tong, X. (2014). Cryoprotectant-free ultra-rapid freezing of human spermatozoa in cryogenic vials. *Andrologia*, 46(6), 642-649. <https://doi.org/10.1111/and.12131>
- Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018). Leydig cells: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioy059>

## 12. TABLAS

**Tabla 1. Pesos de los testículos y epidídimos usados en los experimentos.**

Número Asignado	Derecho/Izquierdo	Peso (g) testículo	Peso (g) epidídimo
1	Derecho	133,3	27,2
1	Izquierdo	139,8	23,8
2	Derecho	180,2	28,0
2	Izquierdo	199,9	24,4
3	Derecho	146,7	37,0
3	Izquierdo	155,8	31,3

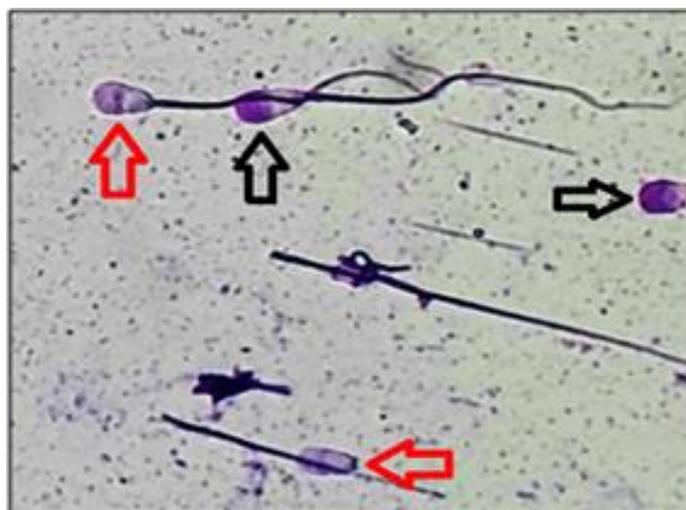
## 13. FIGURAS



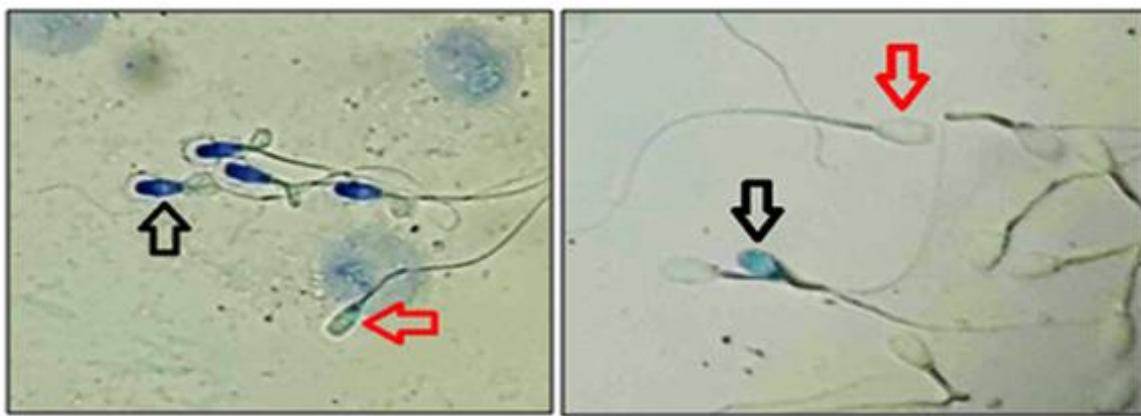
**Figura 1. Evaluación de viabilidad en espermatozoides usando tinción de eosina/nigrosina.** La flecha roja indica un espermatozoide viable y la flecha negra indica un espermatozoide no viable.



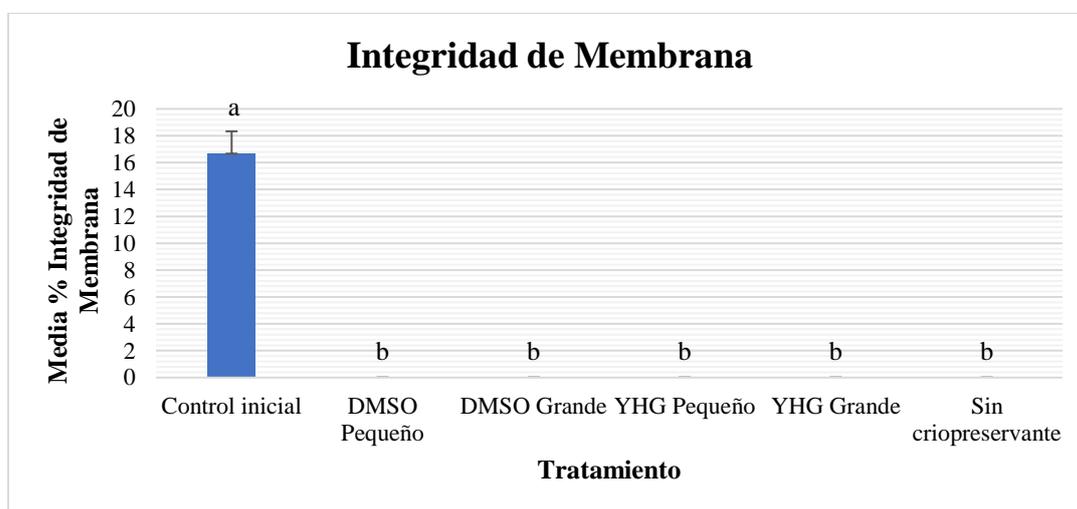
**Figura 2. Morfologías identificadas usando tinción de eosina/nigrosina.** A: Morfología normal, B: Gota citoplasmática distal (CD), C: Cabezas espermáticas sin cola, D: Defecto Dag, E: Doblez distal.



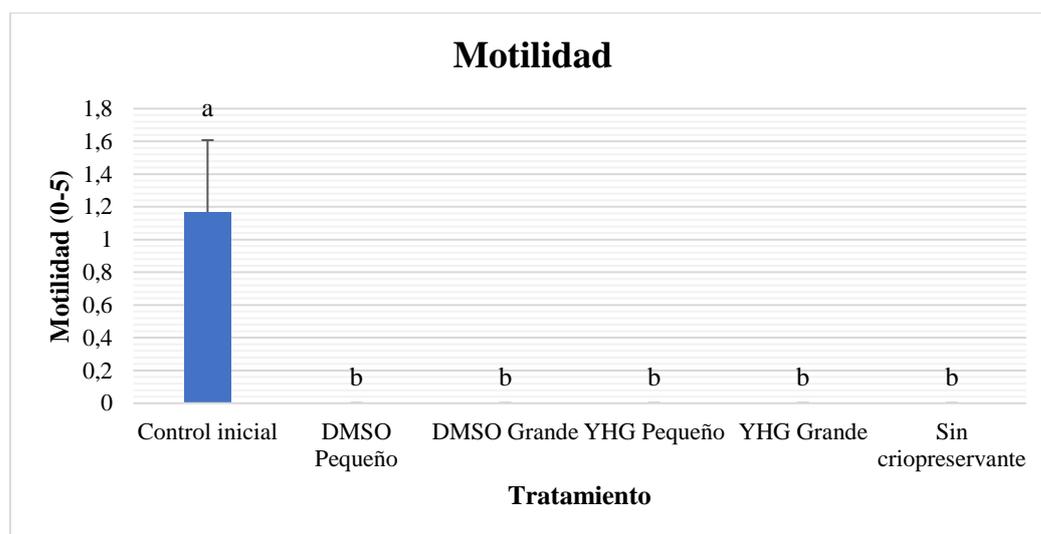
**Figura 3. Evaluación de integridad del acrosoma en espermatozoides bovinos usando tinción de Giemsa.** Las flechas rojas indican espermatozoides con el acrosoma anormal y las flechas negras indican espermatozoides con el acrosoma intacto.



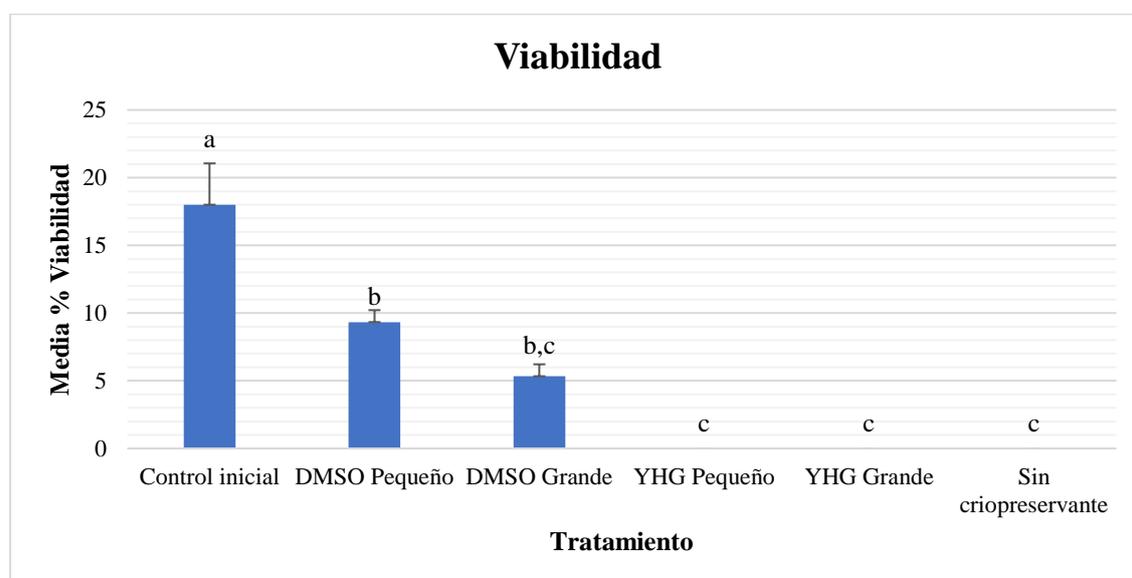
**Figura 4. Evaluación de integridad de la cromatina en espermatozoides bovinos usando tinción de azul de toluidina.** Las flechas rojas indican espermatozoides con cromatina íntegra y las flechas negras indican espermatozoides con cromatina fragmentada.



**Figura 5. Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

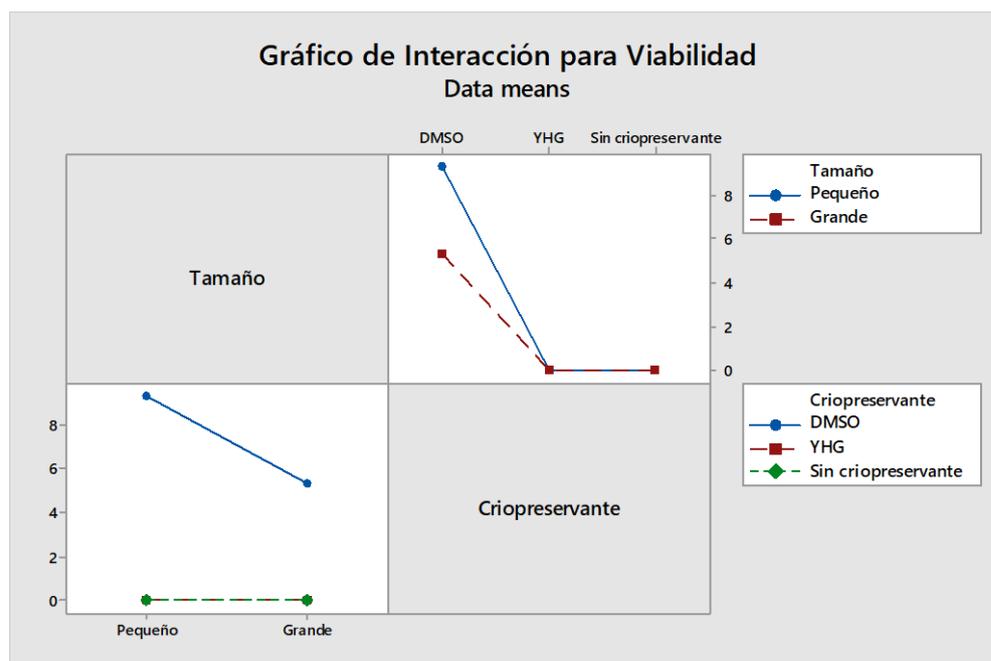


**Figura 6. Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

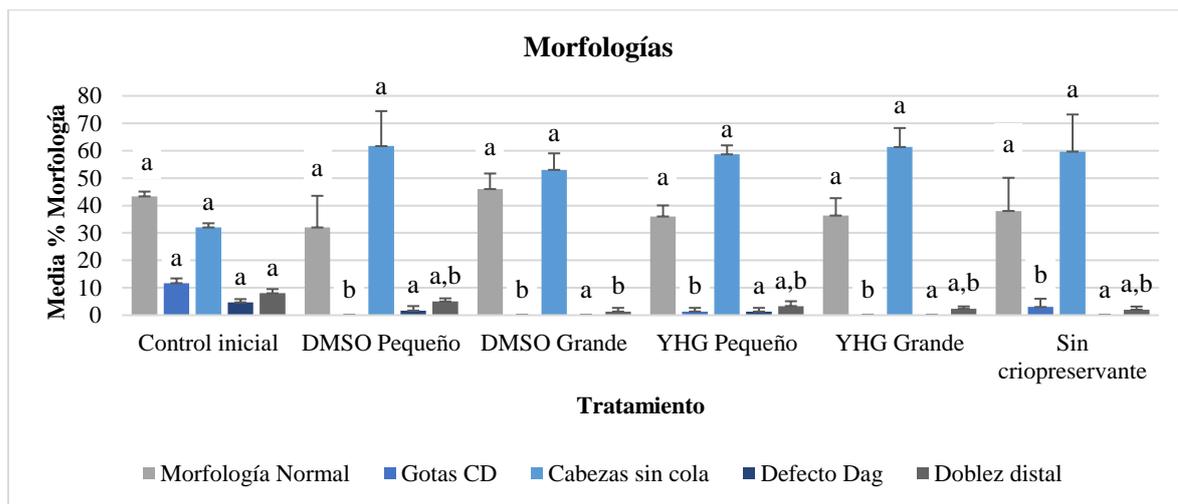


**Figura 7. Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando**

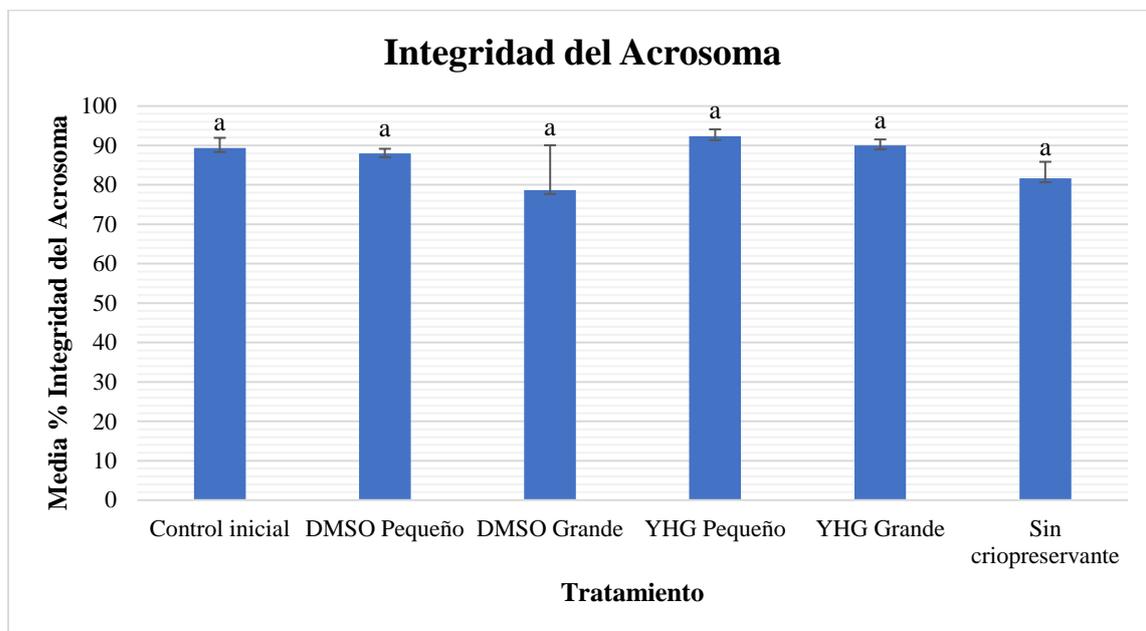
**criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



**Figura 8.** Gráfico de interacciones entre los tamaños de las muestras de tejido testicular y los criopreservantes utilizados sobre la viabilidad espermática en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento. Los factores tamaño ( $P < 0,05$ ), criopreservante ( $P < 0,01$ ) y su interacción ( $P < 0,01$ ) fueron significativos. DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante.

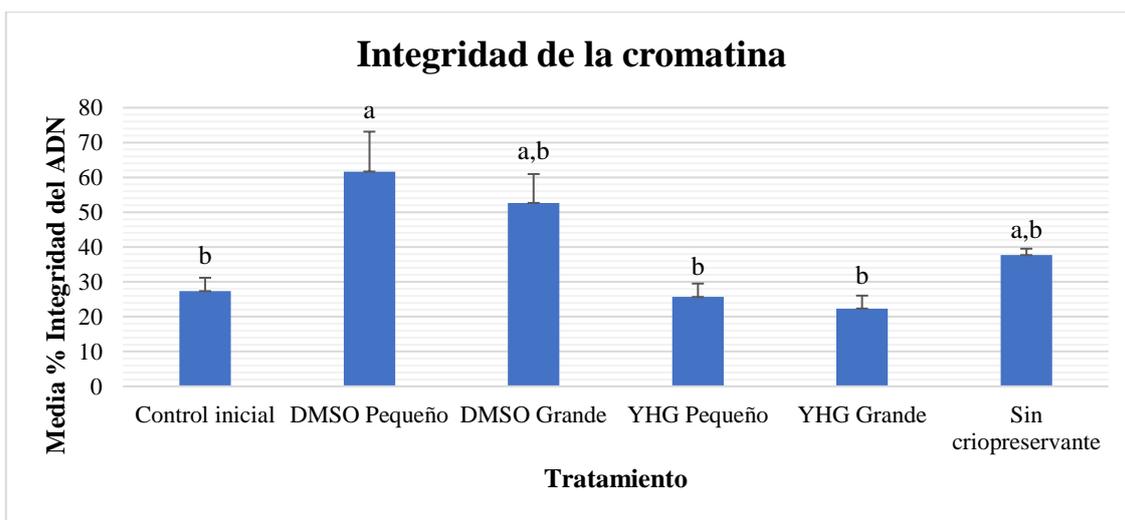


**Figura 9. Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Se distinguieron cinco morfologías. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

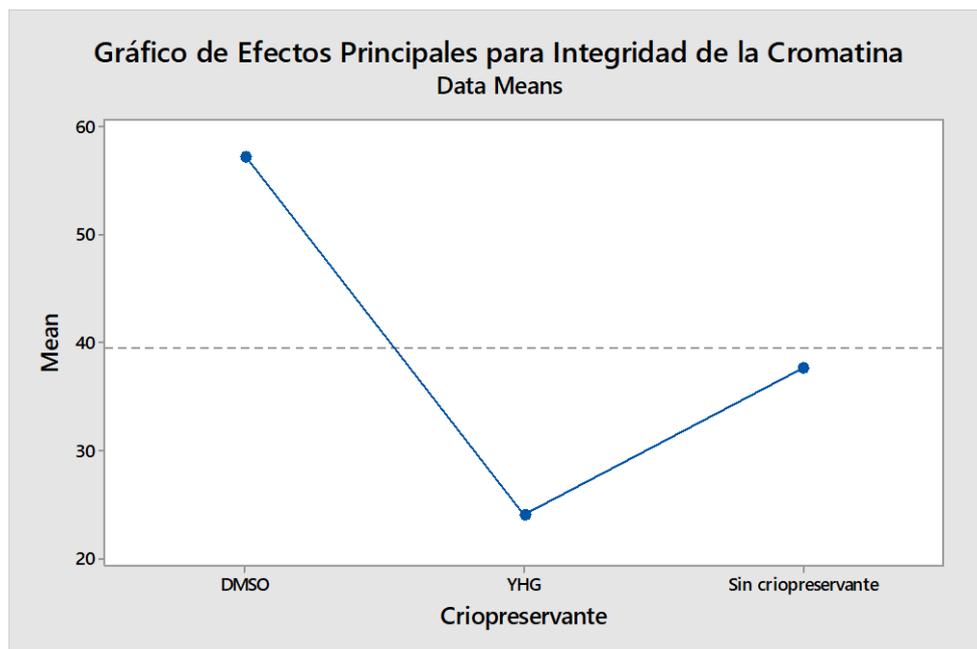


**Figura 10. Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento**

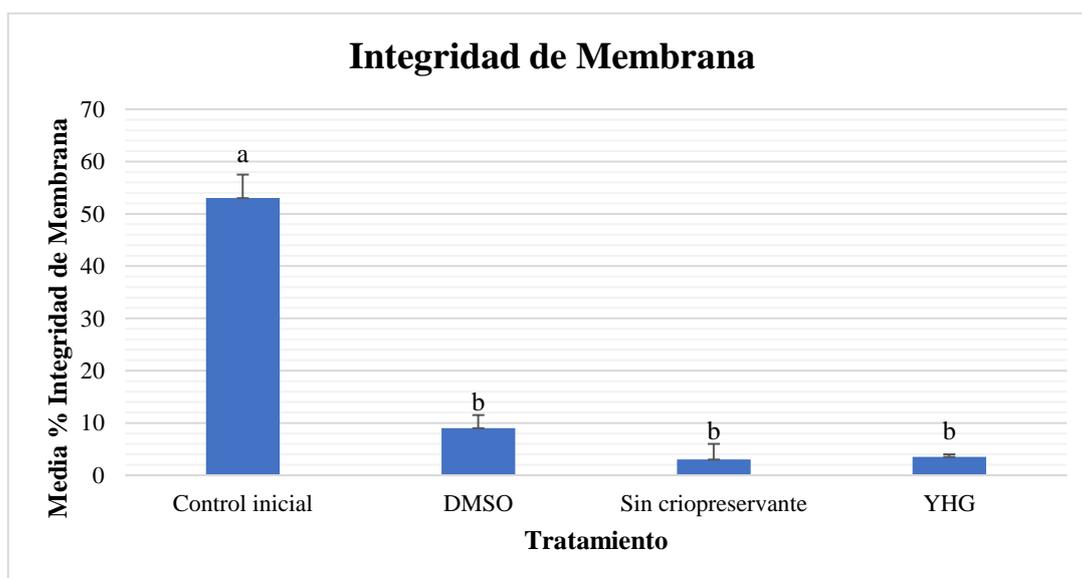
**usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



**Figura 11. Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido testicular almacenado a -196 °C mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

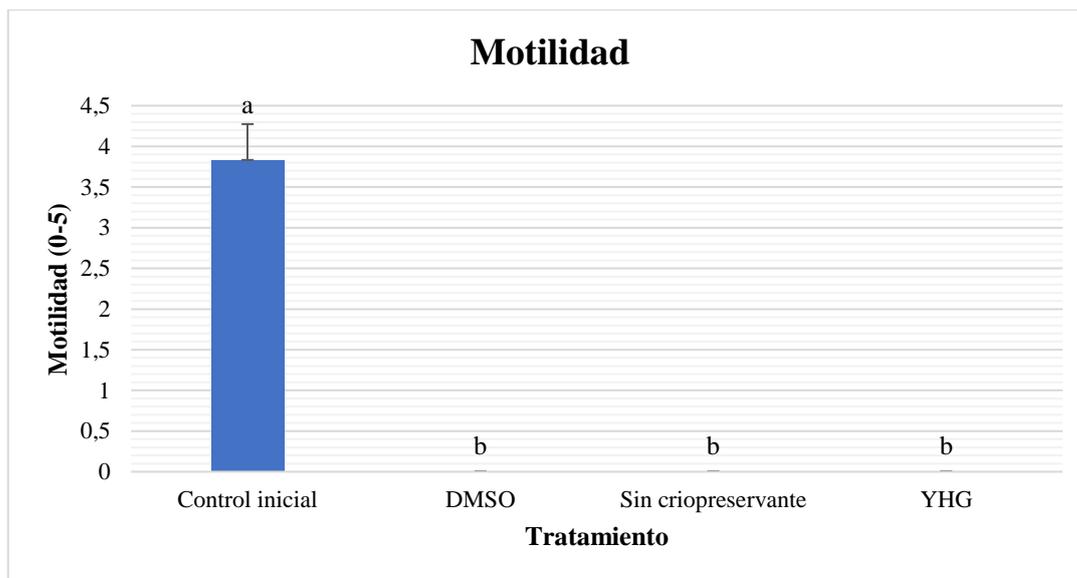


**Figura 12.** Gráfico de efectos principales de los criopreservantes usados sobre la integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de tejido testicular almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento. El factor criopreservante fue significativo ( $P < 0,01$ ). DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante.

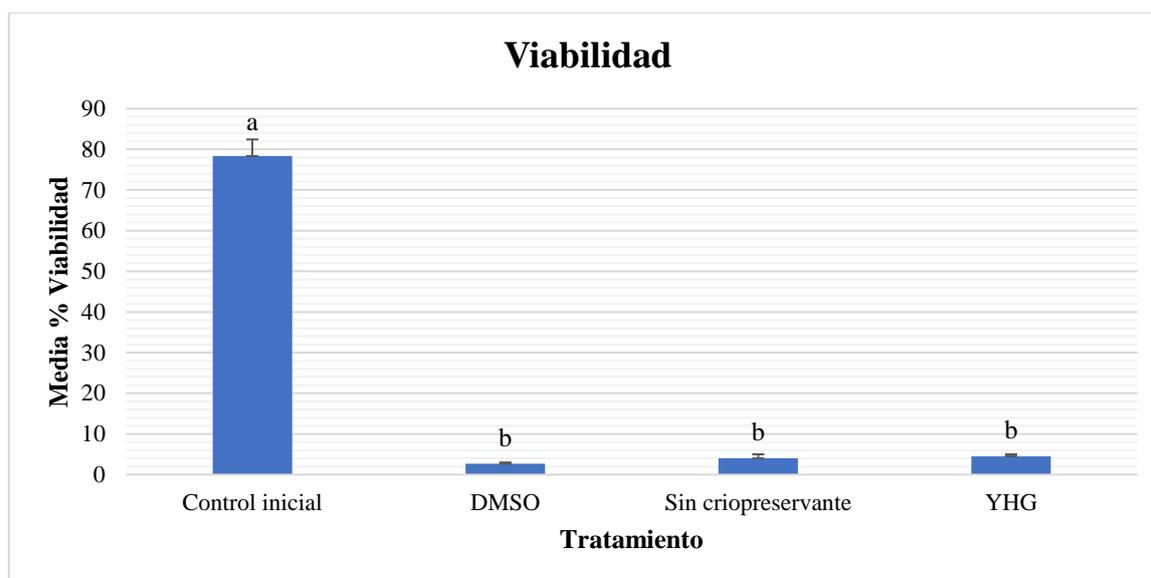


**Figura 13.** Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante

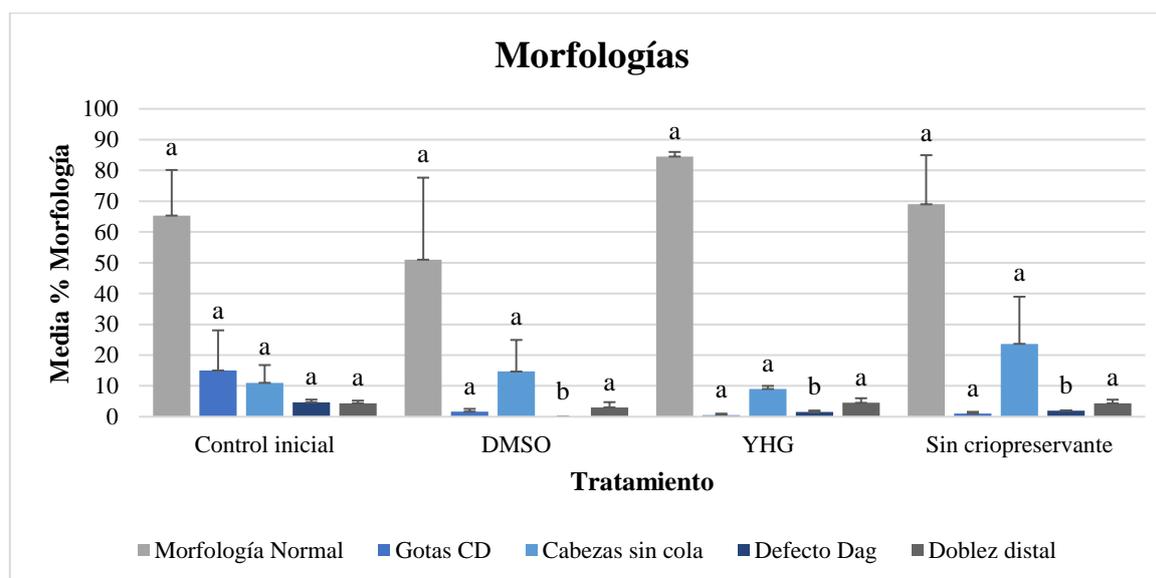
**congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



**Figura 14. Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

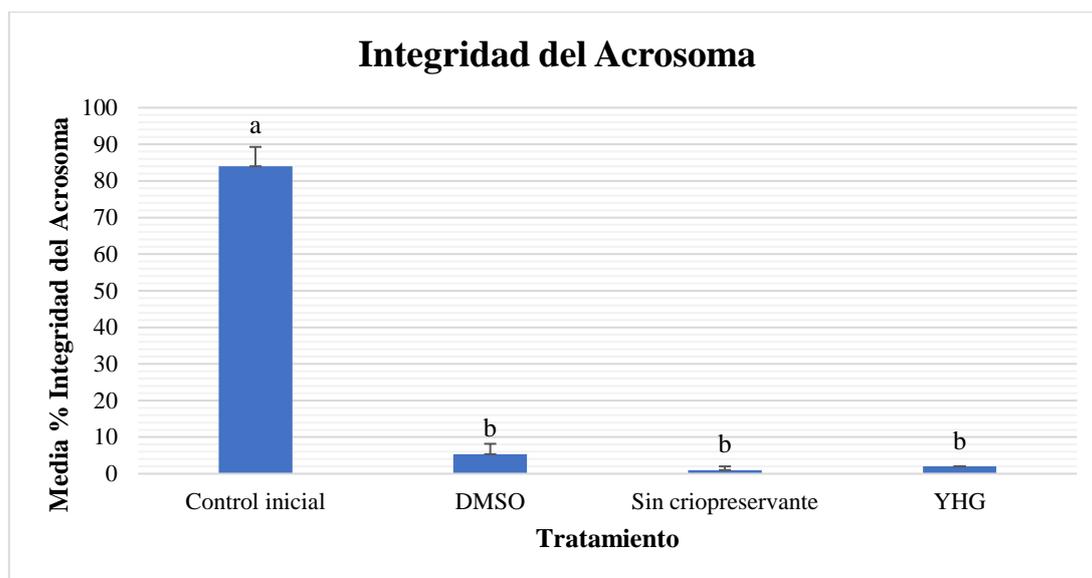


**Figura 15. Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.

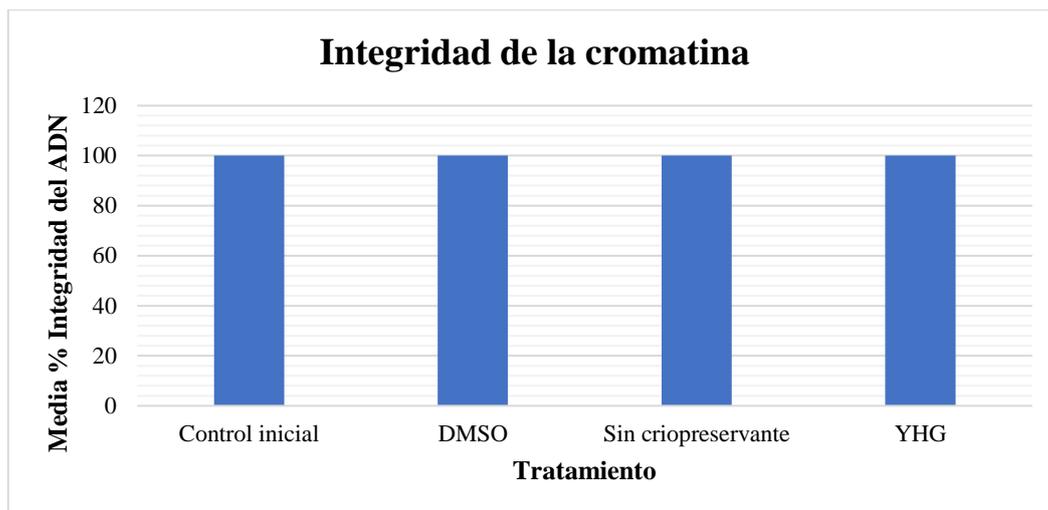


**Figura 16. Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento**

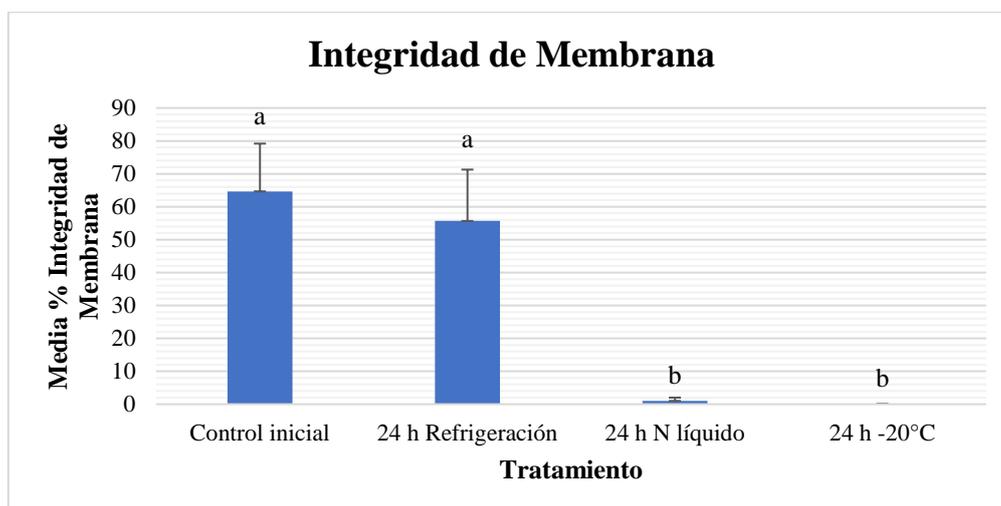
**usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Se distinguieron cinco morfologías. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



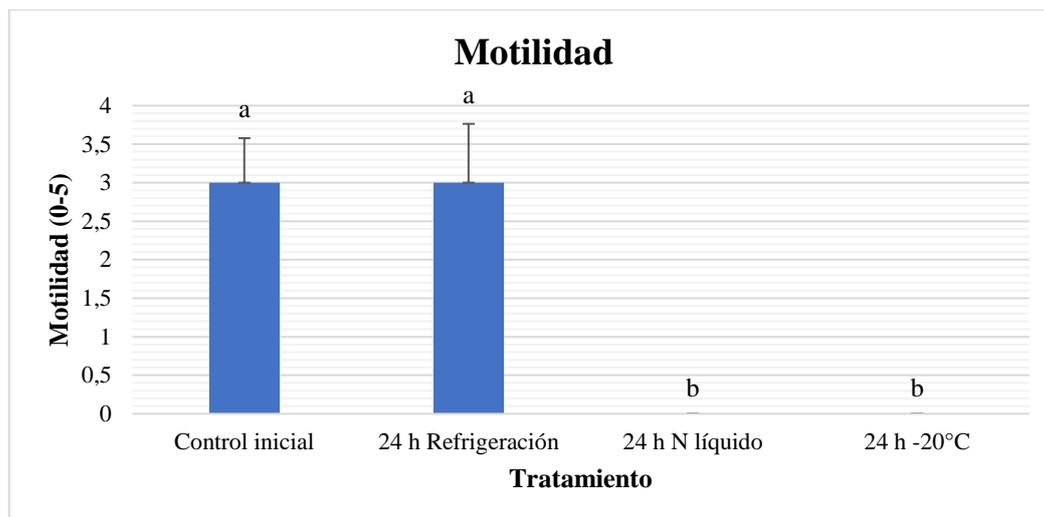
**Figura 17. Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes.** Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. Las barras indican el error estándar de la media (SEM). Letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



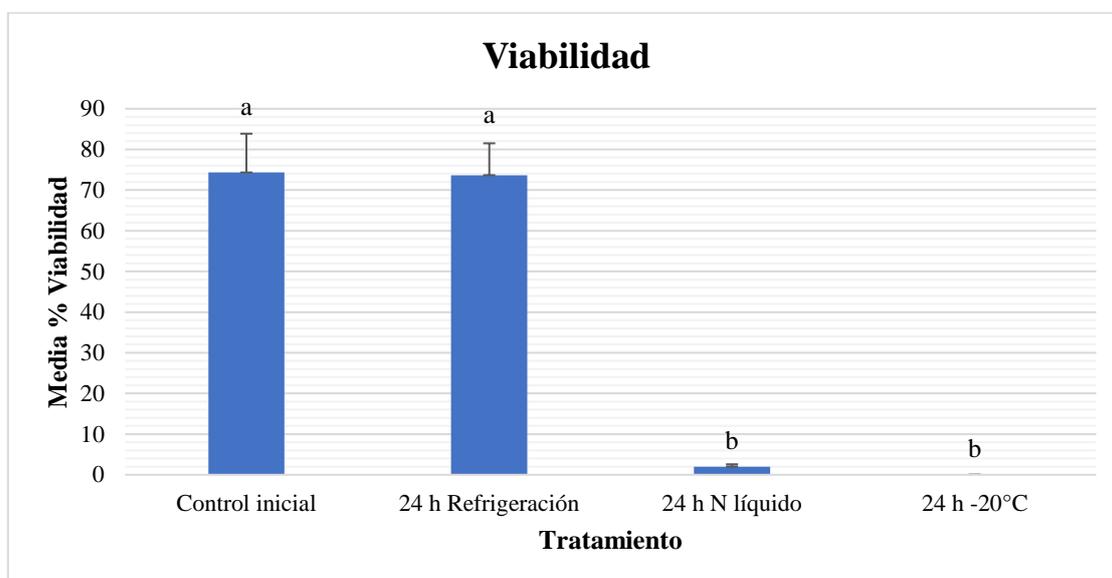
**Figura 18.** Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo almacenado a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  mediante congelamiento lento usando criopreservantes. Control inicial: antes del congelamiento, DMSO: criopreservante basado en DMSO y sacarosa, YHG: criopreservante basado en yema de huevo y glicerol, Sin criopreservante: control interno congelado sin criopreservante. No se muestran barras de error debido a que los resultados fueron iguales para los diferentes tratamientos (SEM = 0).



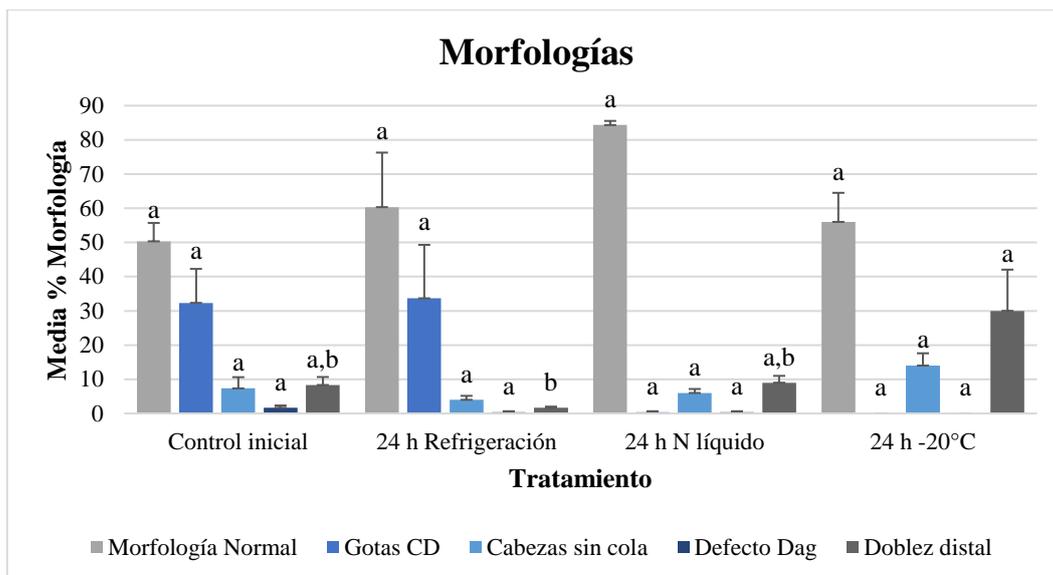
**Figura 19.** Comparación de integridad de membrana en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



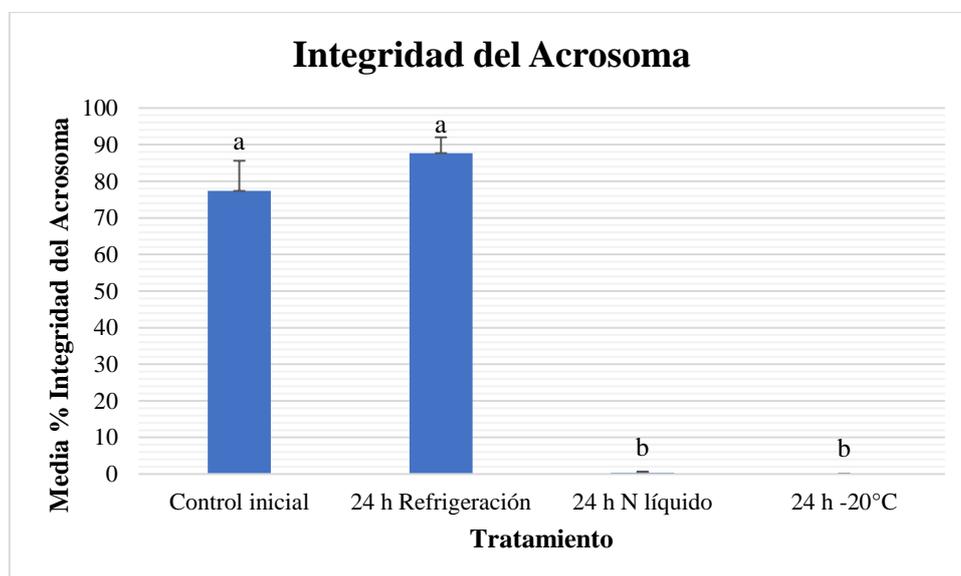
**Figura 20.** Comparación de motilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



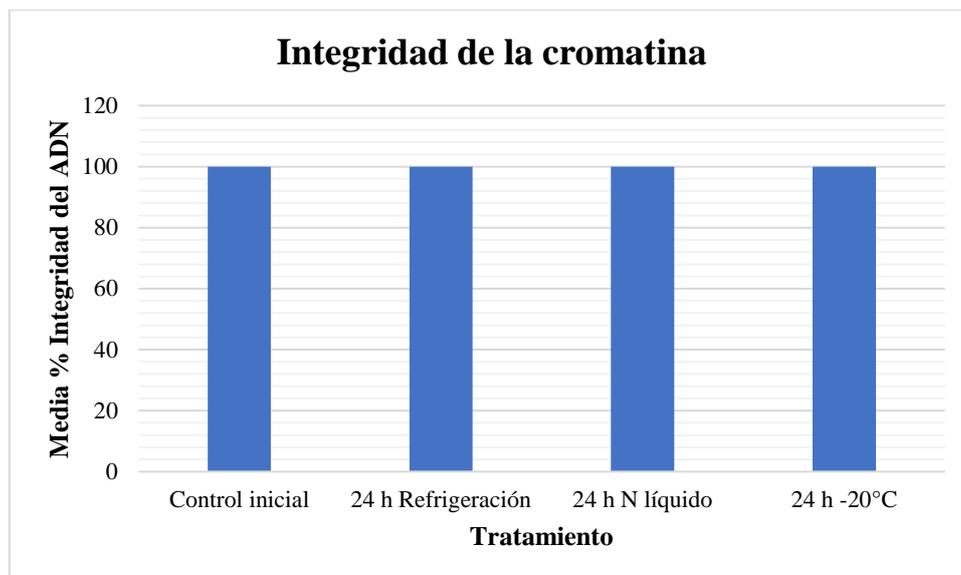
**Figura 21.** Comparación de viabilidad en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



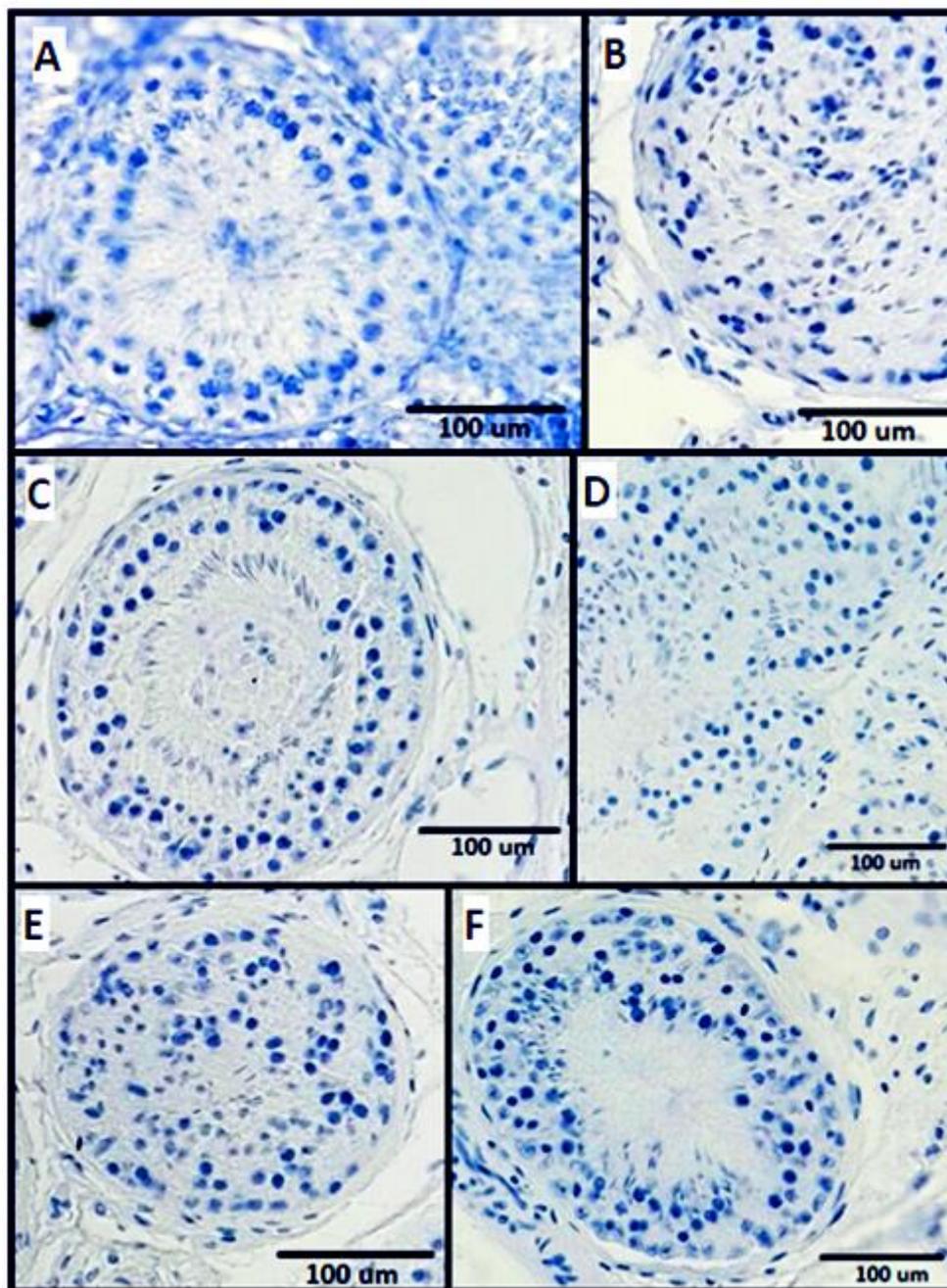
**Figura 22. Comparación de morfologías en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas.** Se distinguieron cinco morfologías. Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



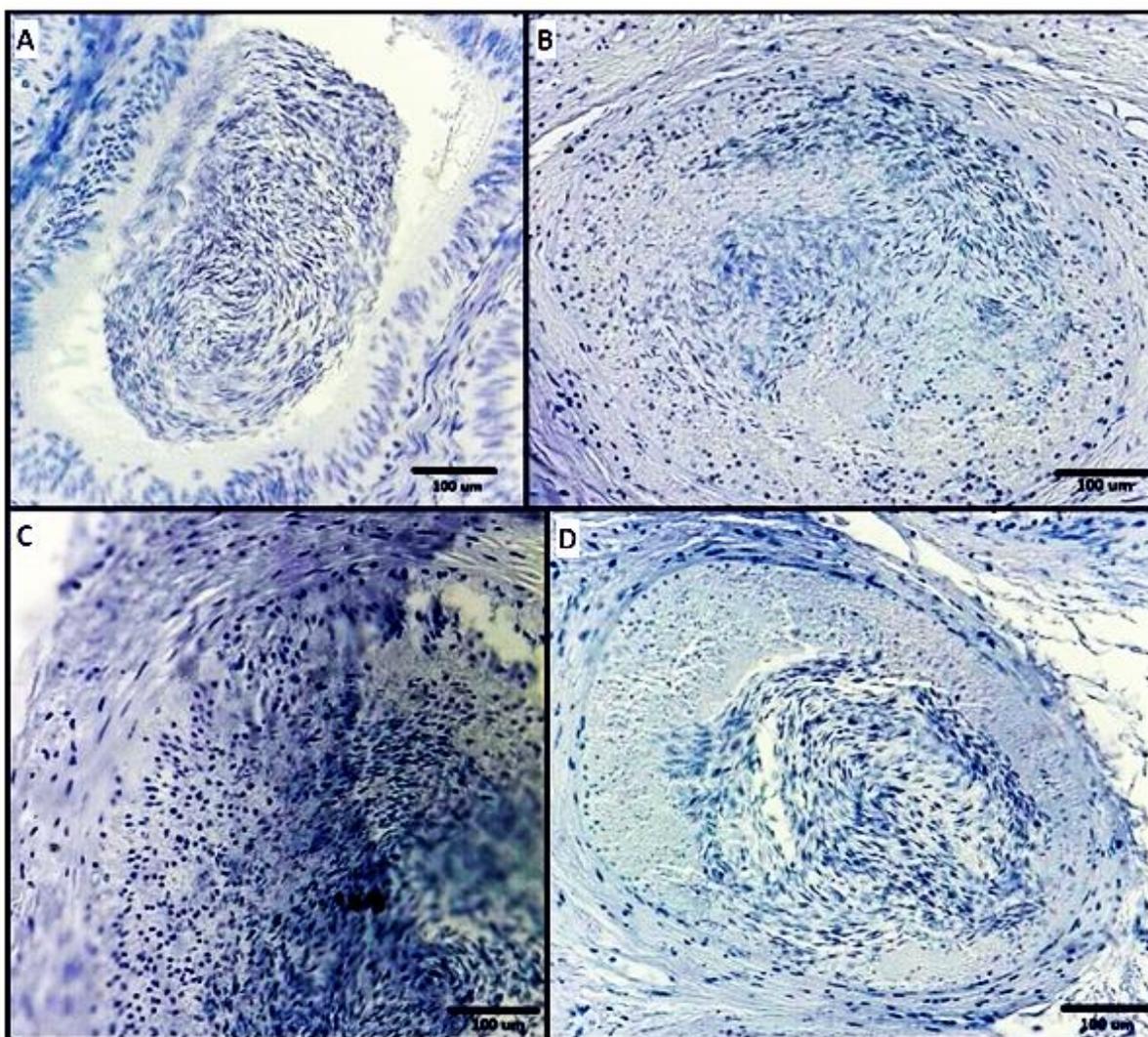
**Figura 23. Comparación de integridad del acrosoma en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas.** Las barras indican el error estándar de la media (SEM) y las letras diferentes en los tratamientos indican medias significativamente diferentes.



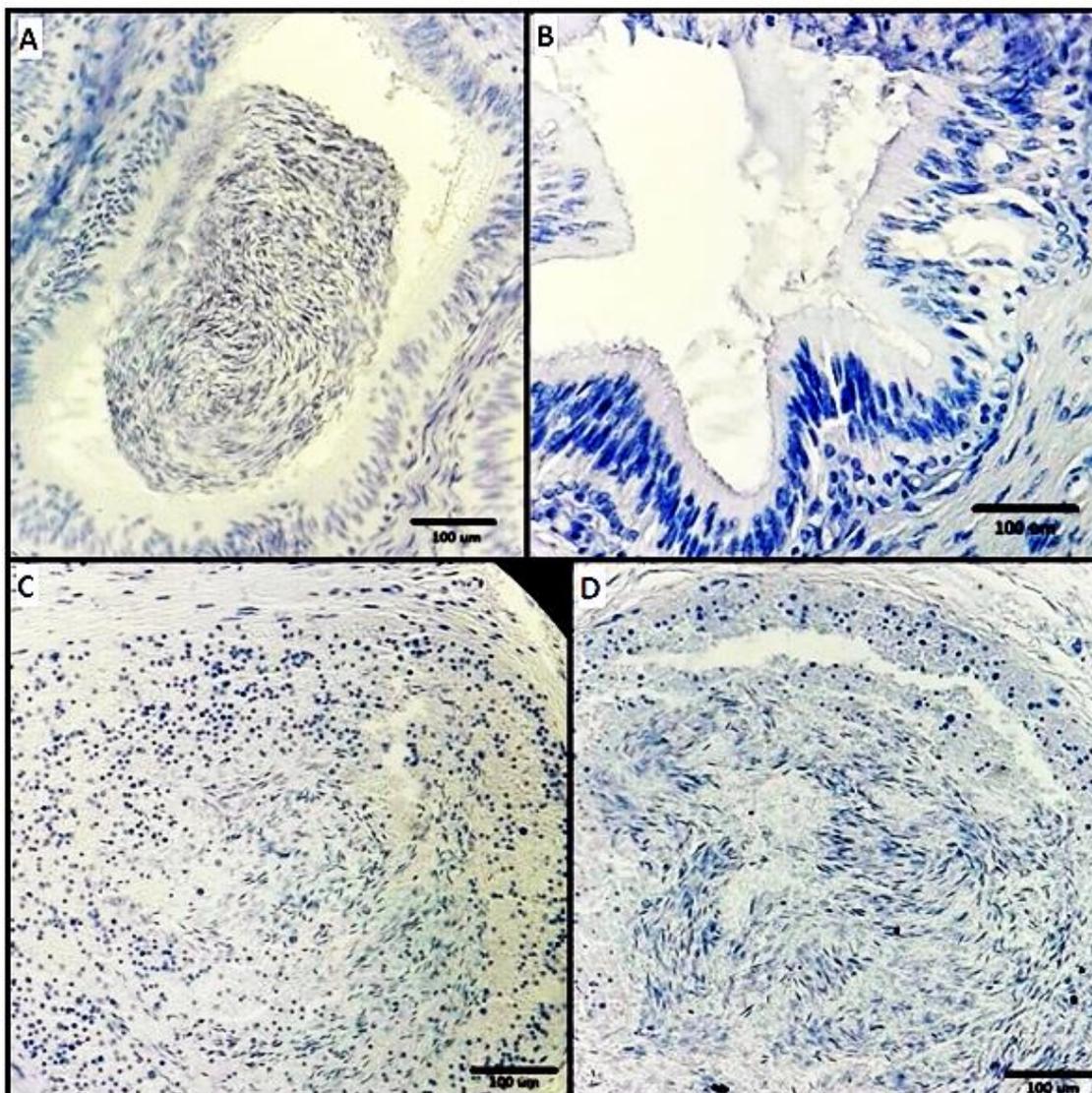
**Figura 24. Comparación de integridad de la cromatina en espermatozoides obtenidos de muestras de tejido de la cola del epidídimo procesadas a diferentes tiempos y congeladas en diferentes temperaturas. No se muestran barras de error debido a que los resultados fueron iguales para todos los tratamientos (SEM = 0).**



**Figura 25.** Sección microscópica de tejido testicular post-congelación bajo diferentes **tratamientos de criopreservación.** **A:** Control inicial (antes del congelamiento), **B:** Control interno (muestra congelada sin criopreservante), **C:** Trozo pequeño congelado con criopreservante basado en DMSO, **D:** Trozo grande congelado con criopreservante basado en DMSO, **E:** Trozo pequeño congelado con criopreservante basado en yema de huevo-glicerol, **F:** Trozo pequeño grande congelado con criopreservante basado en yema de huevo-glicerol.



**Figura 26.** Sección microscópica de tejido de la cola del epidídimo post-congelación bajo diferentes tratamientos de congelación usando criopreservantes. **A:** Control inicial (antes del congelamiento), **B:** Control interno (muestra congelada sin criopreservante), **C:** Tejido congelado con criopreservante basado en DMSO, **D:** Tejido congelado con criopreservante basado en yema de huevo-glicerol.



**Figura 27. Sección microscópica de tejido de la cola del epidídimo post- congelación bajo diferentes a diferentes tiempos de procesamiento y temperaturas de congelación. A:** Control inicial (antes del congelamiento), **B:** Tejido procesado después de estar 24 h en refrigeración, **C:** Tejido congelado en nitrógeno líquido después de estar 24 h en refrigeración, **D:** Tejido congelado a - 20 °C después de estar 24 h en refrigeración.