

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Cultivo de células germinales ovinas en andamiajes de tejido testicular descelularizado bovino**

**Mauricio Alejandro Chavez Bravo**

**Ingeniería en Biotecnología**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 20 de diciembre de 2023

# **UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

## **HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Cultivo de células germinales ovinas en andamiajes de tejido  
testicular descelularizado bovino**

**Mauricio Alejandro Chavez Bravo**

**Nombre del profesor, Título académico**

Pedro Manuel Aponte, MV, PhD

Quito, 20 de diciembre de 2023

## © 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 la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Mauricio Alejandro Chavez Bravo

Código: 00207290

Cédula de identidad: 1724061559

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2023

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La importancia de los rumiantes para la alimentación humana es innegable. El énfasis contemporáneo hacia la sostenibilidad y la seguridad alimentaria han elevado la importancia de abordar los desafíos asociados a la cría convencional de ganado, el uso intensivo de recursos naturales, la presión sobre la tierra cultivable. De igual manera en términos de eficiencia se busca enfrentar a condiciones que afectan la calidad y cantidad de los espermatozoides en el semen. El desarrollo de un sistema de espermatogénesis in vitro a través del cultivo de células germinales en andamiajes descelularizados representa una alternativa prometedora para aliviar estas problemáticas. Este método para la descelularización del tejido testicular bovino para crear andamiajes ha demostrado una eficaz eliminación de células y preservación de la matriz extracelular, proporcionando un entorno tridimensional que mimetiza las condiciones naturales del tejido testicular.

**Palabras clave:** espermatogénesis in vitro, células germinales, andamiajes tridimensionales, tejido testicular

## ABSTRACT

The importance of ruminants for food production is undeniable. The contemporary emphasis on sustainability and food security has raised the importance of addressing the challenges associated with conventional livestock farming, like intensive use of natural resources, and pressure on arable land. Similarly, in terms of efficiency, it seeks to address conditions that affect the quality and quantity of spermatozoa in semen. The development of an in vitro spermatogenesis system through germ cell culture in decellularized scaffolds represents a promising alternative to alleviate these problems. This method for decellularization of bovine testicular tissue aiming to create scaffolds has demonstrated efficient cell removal and preservation of the extracellular matrix, providing a three-dimensional environment that mimics the natural conditions of testicular tissue.

**Keywords:** in vitro spermatogenesis, germ cells, three-dimensional scaffolds, testicular tissue

**TABLA DE CONTENIDO**

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>23</b>
<b>FIGURAS.....</b>	<b>24</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>28</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>31</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1. Analisis del tejido testicular descelularizado mediante microscopia de barrido electrónico.....	24
Figura #2. Box plot del tamaño de los poros en diferentes muestras después de su descelularización .....	25
Figura #3. Analisis del cultivo celular mediante cortes histológicos y tinción de hematoxilina y eosina .....	26
Figura #4. Gráfico comparativo del número de clusters de células germinales identificadas.....	27



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo #1 Mix enzimático para aislamiento celular.....	31
Anexo #2 Medio MEM 1X.....	31
Anexo #3 Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	32

## INTRODUCCIÓN

La industria ganadera desempeña uno de los roles más importantes cuando se habla de alimentación. Principalmente en la producción de productos cárnicos y lácteos siendo estos los principales en la dieta a nivel global. Estos alimentos proporcionan una fuente valiosa de proteínas, grasas y otros nutrientes esenciales, contribuyendo a la salud y el bienestar de la población. Sin embargo, la cría tradicional de ganado plantea desafíos significativos en términos de sostenibilidad, eficiencia e impacto ambiental (USDA, 2021).

La importancia de los rumiantes, como bovinos, ovinos y caprinos, para la alimentación humana es innegable. No obstante, el énfasis contemporáneo hacia la sostenibilidad, la eficiencia y la seguridad alimentaria han elevado la importancia de abordar los desafíos asociados a la cría convencional de ganado, como el uso intensivo de recursos naturales, la generación de gases de efecto invernadero y la presión sobre la tierra cultivable. El crecimiento acelerado de la población mundial ha obligado a la producción ganadera a seguir su ritmo. Por lo que, en los próximos 40 años las emisiones resultantes de esta industria aumentaran en un 60% para lograr una distribución alimenticia adecuada en cantidad y calidad (FAO, 2021).

De igual manera la reproducción de animales, como los rumiantes, ha enfrentado desafíos críticos que afectan su eficiencia y rentabilidad. Problemas como la oligospermia, teratozoospermia y astenospermia las cuales son condiciones relacionadas con la calidad y cantidad de los espermatozoides en el semen, por lo que están ligados al proceso de espermatogénesis, presentan una reducción considerable en la eficiencia reproductiva afectando directamente la tasa de crecimiento y producción.

En este contexto, la búsqueda de soluciones a los desafíos inherentes de la producción ganadera convencional se entrelaza con alternativas innovadoras y sostenibles como el

desarrollo de un sistema de espermatogénesis in vitro. Esto se traduce no solo en una aceleración del proceso de reproducción, sino también en la posibilidad de seleccionar individuos con características genéticas deseables. La capacidad de aislar, cultivar y manipular células germinales ofrece un control sin precedentes sobre la transmisión de rasgos genéticos específicos, mejorando así la eficiencia reproductivas. De igual manera este método busca superar las limitaciones asociadas con la cría convencional de animales, como la necesidad de grandes extensiones de tierra y la emisión significativa de gases de efecto invernadero (Song & Wilkinson, 2012).

La espermatogénesis in vitro es una técnica avanzada de reproducción asistida que busca simular y regular el proceso de generación de espermatozoides a partir de células germinales masculinas fuera del entorno biológico natural del testículo (Kulibin & Малолина, 2023). Este proceso inicia mediante la manipulación y el cultivo de células germinales para inducir su diferenciación y maduración. Las espermatogonias ya diferenciadas a su vez pasan por procesos de meiosis, siendo este el punto central de espermatogénesis, la meiosis es un tipo de división celular que reduce el número de cromosomas a la mitad y mediante procesos de recombinación y división reductiva celular resulta en la formación de células sexuales haploides, es decir, con la mitad del material genético de las células madre. Este es un paso fundamental para la formación células germinales y un desafío considerable para la espermatogénesis in vitro. En mamíferos este proceso se da dentro de los túbulos seminíferos del testículo y es apoyado por las células somáticas de la gónada, como las células de Sertoli, células intersticiales y las células peritubulares del mioide (Delessard et al., 2022).

El nicho de células germinales en el tejido testicular es un microambiente altamente especializado que proporciona un soporte físico, químico y celular óptimo para el desarrollo y

la diferenciación de las células germinales, incluyendo las células madre germinales. Este nicho tridimensional es esencial para mantener la homeostasis y la autorrenovación de las células germinales, siendo procesos críticos para la producción continua de gametos funcionales. La estructura tridimensional del nicho de células germinales en el tejido testicular va más allá de simplemente proporcionar un entorno físico de soporte. La arquitectura compleja y altamente organizada del tejido testicular contribuye a la regulación espacial y temporal de la espermatogénesis. La interacción íntima entre las células germinales, las células de Sertoli y las células intersticiales crea un entorno dinámico que influye en la diferenciación y la función de las células germinales (De Kretser et al., 2016).

Varios elementos como factores de crecimiento, citoquinas, nutrientes y hormonas afectan el proceso de espermatogénesis. Actualmente, varios factores y elementos aún no han sido caracterizados debido a que actúan de manera indirecta a través de las células somáticas presentes en el testículo, lo que ha impedido una correcta replicación del proceso espermatogénesis a nivel *in vitro* en su totalidad. No obstante, varios avances científicos actuales proponen modelos con el potencial de simular dicho sistema de espermatogénesis.

Para lograr superar estas limitaciones y desarrollar un sistema de espermatogénesis *in vitro*, existen varios elementos que deben ser considerados. El primero elemento radica en el diseño e implementación de estructuras celulares tridimensionales (3D) buscando de esta manera recrear la complejidad anatómica y funcional al proporcionar un andamiaje que permita la interacción celular tridimensional. La importancia de estas estructuras radica en su capacidad para replicar las condiciones naturales del tejido testicular de manera eficiente que los modelos bidimensionales (Salem et al., 2023). La presencia de esta arquitectura 3D permite la formación de microambientes específicos que favorecen la comunicación celular, la liberación de factores de crecimiento y la expresión génica de manera más similar a las condiciones *in vivo* (Baert et al., 2019).

El siguiente elemento importante es el desarrollo de un sistema para el cultivo de las células germinales. Se requiere de un sistema de cultivo que sea dinámico y adaptable, con capacidad capaz de modular factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes en respuesta a las necesidades específicas de cada etapa del proceso. El sistema debe ser capaz de generar un equilibrio entre la provisión de los elementos esenciales para el crecimiento celular y la reproducción de eventos moleculares clave involucrados en la espermatogénesis. Además, la dinámica del sistema de cultivo debe permitir simular de manera precisa las interacciones celulares que se dan en las condiciones in vivo (Huleihel et al., 2007).

Por esta razón se presenta como una alternativa prometedora el desarrollo de andamiajes de tejido testicular descelularizado bovino. La descelularización implica la eliminación cuidadosa de las células presentes en el tejido, preservando la arquitectura tridimensional y la matriz extracelular que son esenciales para el desarrollo de las células germinales. Al utilizar tejido bovino descelularizado como andamiaje, se logra recrear un entorno tridimensional que mimetiza las condiciones naturales del tejido testicular (Neishabouri et al., 2022).

El tejido testicular descelularizado bovino presenta beneficios significativos para la espermatogénesis in vitro. La descelularización preserva la estructura tridimensional del tejido, sirviendo como andamiaje crucial para la diferenciación de las células germinales. Este proceso conserva la matriz extracelular y las señales moleculares, facilitando una interacción precisa entre células germinales y somáticas. En conjunto, estas características hacen del tejido testicular descelularizado bovino una herramienta útil para la simulación condiciones naturales del tejido testicular. Por lo tanto, el presente trabajo se propone como objetivo la descelularización de tejido testicular bovino y su uso como andamiajes para el cultivo de células germinales.

## MÉTODOS

### **Descelularización del tejido testicular bovino**

Para el proceso de descelularización se obtuvieron muestras testiculares bovinas provenientes del camal de la ciudad de Quito (Empresa Pública Metropolitana de Rastro). Se procedió con el lavado de estas para evitar contaminación y se congeló a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se realizó cortes alargados de 1.5 cm de grosor y mediante el uso de un sacabocados se obtuvieron discos de 2 cm de diámetro. Posteriormente, se colocó los discos en un frasco de vidrio Borosilicato de 250 ml para ser sometidos a diferentes lavados en agitación constante. Se inició con 2 lavados en PBS por 15 minutos respectivamente, a continuación, se colocó los discos en Tritón X al 1% durante un periodo de 4 horas, después se lo sumergió en SDS al 1% durante 24 horas, se realizó otros dos lavados en PBS de 15 minutos. Finalmente, todos los discos fueron colocados en placas con pocillos y se los sometió a un proceso de liofilización durante 24 horas.

### **Aislamiento celular**

Para este proceso se usó una muestra testicular la cual no presenta desarrollo de espermatozoides, esta muestra corresponde a un testículo ovino joven de 4 meses de edad. Mediante material de disección estéril se removió la túnica vaginal del testículo ovino e inmediatamente se procedió con el lavado del testículo en agua corriente para remover el excedente de sangre. A continuación, dentro de una cámara de flujo laminar, se realizó un corte del testículo de aproximadamente 20 g, el cual se vuelve a cortar en dos segmentos de 10 g para ser colocado en 2 cajas Petri estériles. Posteriormente, se colocó 12.5 ml de MEM+DNase en cada una de las cajas Petri a partir de una mezcla inicial de 50 ml MEM 1x + 100  $\mu\text{l}$  de DNase. Se procedió a la remoción de la túnica albugínea mediante el uso de una pinza y bisturí

estériles. De igual manera, se removió el tejido conectivo mediante el raspado de la muestra hasta su completo fraccionamiento. Una vez fraccionadas se colocó ambas muestras en tubos Falcon de 50 ml y se añadió 12.5 ml del mix enzimático I (Anexo 1) a cada una. Posteriormente, se cerró y selló los tubos con Parafilm para ser sumergidos en agua a una temperatura de 37 °C por un periodo de 60 minutos en agitación constante, al finalizar se centrifugó ambos tubos durante 3 minutos a 300 rpm. Una vez finalizado el proceso de centrifugación se retiró el sobrenadante. Se procedió a realizar una segunda digestión enzimática, para esto se añadió 12.5 ml de MEM+DNase y 12.5 ml del mix enzimático II (Anexo 1), nuevamente se cerró y selló los tubos con Parafilm y se los sumergió por segunda vez en agua a una temperatura de 37 °C por un periodo de 45 minutos en agitación constante, una vez concluido el periodo de agitación se centrifugó ambos tubos por 2 minutos a 400 rpm. Se procedió a recolectar el sobrenadante mediante filtros de Nylon de 50 y 100 µm, para una posterior centrifugación a 900 rpm por 5 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 4 ml de una mezcla MEM+DNase+BSA, a partir de una mezcla de 9 ml de MEM + 1 ml de BSA + 10 µl de DNase. A continuación, se preparó 50 ml de suspensión celular de Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% en MEM 1X, 41 ml de MEM + 5 ml SFB + 4 ml de suspensión celular. Después, se usó 4 matraces Fisher de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> en los que se colocó 12.5 ml de la mezcla de suspensión celular respectivamente, se agitó suavemente cada uno de los matraces esparciendo las células de manera uniforme y se incubaron a 37 °C por 24 horas. Una vez transcurrido el periodo de incubación se recolectó las células de los matraces y transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Finalmente, se determinó la concentración celular mediante el uso de una cámara de conteo Neubauer.

### **Cultivo celular**

Para este método se requirió de 4 cajas Petri con pocillos, se utilizó tres de estas cajas para cultivo celular y una caja de control negativo. En las cajas de cultivo celular se realizó dos diferentes métodos, el método de cultivo simple y el método de cultivo doble. Para el primer método, se colocó un solo biomaterial descelularizado en el pocillo junto con 400 ul medio de cultivo MEM+SFB+Fungizona y 2 ul de células, mientras que para el cultivo doble se colocó dos biomateriales por pocillo, uno encima del otro, junto con 400 ul de medio MEM+SFB+Fungizona y 2 ul de células. Mientras que en la placa de control negativo se colocó un biomaterial por pocillo y 400 ul de medio MEM+SFB+Fungizona. Se sometió todas las placas a incubación y se reemplazó el medio de cultivo de cada una en periodos de 3 días. Se removió de la incubadora las 3 placas de cultivo celular a los 3, 7 y 10 días de cultivo respectivamente. Una vez removidas de la incubadora se sometió a los biomateriales a paraformaldehído para su fijación

### **Histología**

Se realizó cortes verticales en los biomateriales descelularizados de los días 3, 7, 10 y de control y se los coloco en cassette histológicos, para su posterior inclusión en parafina. Para esto se usó una maquina procesadora de tejidos, la cual deshidrato las muestras con etanol en concentraciones de 70, 90 y 100%, luego las sometió a NeoClear y finalmente a parafina. Una vez concluido el proceso de inclusión, se formó bloques histológicos mediante moldes metálicos. Mediante el uso de un microtomo Leica se realizó 3 cortes a cada uno de los bloques en secciones de 5  $\mu$ m. Posteriormente, se colocó los cortes de cada una de las muestras en placas previamente cubiertas con polilisina y se procedió a su tinción con Hematoxilina y Eosina (Anexo 3). Finalmente se colocó un medio de montaje para su preservación seguidas de cubreobjetos. Se visualizo estas placas en el microscopio con lentes de aumento de 10X y 40X.



## RESULTADOS

### Caracterización del biomaterial descelularizado

El tejido testicular fue sometido a un proceso de descelularización, basado en su exposición a detergentes como Tritón X al 1% y SDS en agitación constante. Los resultados de este proceso fueron evaluados mediante microscopia de barrido electrónico para determinar su eficacia, así como las características morfológicas del andamiaje resultante.

Como podemos observar en la figura 1.A la presencia de fibras alrededor del tejido denota una densidad celular escasa, asegurando así una remoción efectiva de células del tejido. De igual manera, esta figura constata una correcta preservación de la matriz extracelular con una estructura tridimensional siendo esencial para el mantenimiento del nicho de células germinales.

Adicionalmente, en la figura 1.B podemos identificar la una característica predominante en la morfología del tejido descelularizado y es su porosidad. Se evidencia una distribución y tamaño uniforme de los poros presentes lo que un indicaría una baja variabilidad de los resultados obtenidos. De las muestras analizadas en el microscopio de barrido electrónico, se escogieron 4 de manera aleatoria para analizar el tamaño de los poros presentes, la mediciones fueron realizadas con ImageJ y estas se encuentran en la tabla 1.

Podemos determinar que los promedios de cada una de las muestras son similares y no presenta mucha variación.

De igual manera estos valores fueron analizados mediante una gráfica de caja y bigotes (figura 2), en esta figura podemos identificar varios valores importantes. Los valores de las medianas, así como de los cuartiles son similares en cada una de las muestras. Finalmente, se observan rangos intercuartílicos uniformes y pocos valores atípicos.

## **Cultivo celular**

Mediante el uso de cámara de conteo Neubauer, se determinó que la concentración resultante del aislamiento fue de  $70 \times 10^6$  células a partir de la muestra de tejido testicular.

Cada uno de los pocillos en las 4 diferentes placas fueron cultivados con la misma concentración celular y se colocaron en la incubadora a  $37^\circ\text{C}$ . Se debe recalcar que el medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días y se removieron las placas para ser analizadas a los 3, 7 y 10 días respectivamente.

Tanto su preparación histológica, así como la tinción hematoxilina y eosina de las muestras nos permitió obtener los siguientes resultados mediante su observación en el microscopio electrónico. Como podemos observar en la figura 3, se presentan placas de los tres diferentes días de cultivo (3,7 y 10) así como del control negativo.

En las figuras 3.A, 3.B y 3.C, mediante un análisis morfológico identificamos la presencia de células germinales en el tejido descelularizado. En estas muestras podemos observar como el tejido presenta una coloración rosa mientras que los núcleos y membranas de las células germinales presentan un coloración purpura. Mientras que en la figura 3.D, correspondiente al control negativo, existe una clara ausencia de células observando solo la coloración rosada de los tejidos.

Finalmente, se realizó un conteo de clusters de células germinales presentes en las muestras de cada uno de los diferentes días de cultivo en los dos métodos planteados. En figura 4 podemos observar un comparación de estos datos. Esta grafica nos permite observar que existe una diferencia la cantidad de células de presentes del día 3 y 7 en relación con el día 10. Sin embargo, no se evidencia variaciones entre el método simple y doble en cada uno de los diferentes días de cultivo

## DISCUSIÓN

La descelularización de tejidos se logra debido a su exposición a diferentes agentes químicos que promueven la lisis celular removiendo así las células presentes en el tejido y conservando la matriz extracelular ya que esta será el soporte principal para el desarrollo de las células germinales (Srokowski & Woodhouse, 2017). En este caso específico, el tratamiento proporcionado al tejido testicular se basó en su exposición a detergentes en agitación constante. Tanto el Tritón X al 1% así como el SDS son componentes esenciales para el éxito de este proceso ya que actúa de manera conjunta para romper las membranas celulares facilitando su eliminación. De igual manera, la agitación constante durante este proceso asegura una distribución uniforme de los detergentes en todo el tejido mejorando la eficiencia del tratamiento. Por lo que la observación de las fibras en el tejido de la figura 1.A nos permite determinar que la combinación de los detergentes con la agitación es una técnica factible para la eliminación eficiente de las células presentes en el tejido celular.

El factor más importante que se debe considerar para la validación de la funcionalidad del tejido descelularizado como andamiaje es su porosidad. Esta característica esencial no solo refleja la preservación de la estructura tridimensional del tejido, sino que también desempeña un papel clave en el suministro eficiente de nutrientes para apoyar la proliferación celular, contribuye a la creación de un entorno tridimensional que imita el nicho natural de las células germinales favoreciendo la comunicación celular y facilita el intercambio de gases como la entrada de oxígeno necesario para el metabolismo celular y la eliminación de dióxido de carbono (Kim et al., 2017). En base a los resultados en la figura 1.B, podemos observar un que el tejido descelularizado obtenido tiene una porosidad predominante y uniforme por lo que esto no solo respaldaría la viabilidad de las células germinales, sino que también influye en su comportamiento y funcionalidad in vitro.

Adicionalmente, se debe considerar los datos obtenidos mediante la gráfica de caja y bigotes presentados en la figura 2. En esta grafica observamos que cada una de las muestras presenta valores muy cercanos en sus medianas lo que es el un primer indicador de una baja variación en la tendencia central del tamaño de los poros en el biomaterial. De igual manera los valores de los cuartiles superiores e inferiores se encuentran en los mismos niveles por lo que no presentan un diferencia significativa en las medidas de los poros entre cada una de las muestras. Los rangos intercuartílicos se determinan en base a la dispersión de los valores centrales, es decir que entre más amplia sea su distancia mayor será la variabilidad de las medidas (Minitab, 2021). Sin embargo, en este caso podemos observar una distancia reducida por lo que al no ser significativa nos permite determinar que existe una baja variabilidad entre los poros de cada una de las muestras. Debido a que todas la muestras corresponden al mismo tratamiento podemos determinar que esta consistencia entre las mismas indica una estabilidad favorable en el proceso de descelularización planteado.

Si comparamos estos resultados con estudios previos como los presentados por Naeemi et al. (2021) podemos identificar que el tratamiento que se realizó para lograr la descelularización del tejido es más eficiente en términos de reproductibilidad ya que los resultados obtenidos son más consistentes y uniformes. Sin embargo, el promedio de los poros obtenidos con nuestro tratamiento es de 206,2  $\mu\text{m}$  lo que sería un valor ligeramente inferior en comparación. Como se mencionó antes la porosidad influye en varios factores para el desarrollo de las células germinales durante su cultivo por lo que su tamaño reducido podría tener repercusiones negativas durante este proceso, afectando directamente a la cantidad de células germinales obtenidas. Por lo que en el caso de replicar este tratamiento se debería considerar aumentar ligeramente el tiempo de exposición de los detergentes, el tiempo de congelación inicial, la velocidad de la agitación o inclusive el reducir el ancho de

los cortes en el tejido previo a su descelularización ya que podrían aportar a un aumento en el tamaño de los poros que se espera obtener (Loh & Choong, 2013).

La identificación morfológica de células germinales en el tejido testicular descelularizado es esencial para comprender cómo estos andamiajes simulan la organización in vivo tridimensional de los túbulos seminíferos. La histología, junto con la tinción de hematoxilina y eosina, proporcionan información valiosa sobre la viabilidad y la organización celular en estos andamiajes descelularizados. En este caso, la importancia de la histología radica en la capacidad de obtener cortes que permitan una mejor visualización de las zonas centrales del tejido descelularizado, lo que se dificultaría con otros métodos, como su análisis directo en el microscopio. Los resultados de la figura 3, al provenir de cortes centrales, nos indican como las células lograron ingresar en el tejido descelularizado, a travesando la superficie y aprovechando así la estructura tridimensional de los andamiajes. Mientras que, en el caso de la tinción de hematoxilina y eosina, su importancia se debe a su clasificación como tinción contrastante. Permitiendo diferenciar al tejido de las estructuras celulares. Las células germinales exhiben núcleos redondos y homogéneos. Por lo que, la identificación de núcleos con estas características morfológicas en secciones de tejido descelularizado sugiere la presencia e integridad de células germinales.

Este método de cultivo puede ser considerado optimo debido a la identificación de las células germinales en el tejido. Sin embargo, los resultados de la figura 3 no presentan células germinales avanzadas en el proceso de diferenciación hacia espermatozoides. Esto puede ser influenciado por varios factores como el tiempo o los métodos de cultivo aplicados. Como podemos observar en la figura 4, se presentan datos de diferentes muestras correspondientes a los días 3, 7 y 10 de cultivo de ambos métodos aplicados. En este grafico podemos determinar que no existe una diferencia entre el método de cultivo simple y el método de

cultivo en términos de la cantidad de células germinales presentes. Lo que sugiere que el biomaterial proporcionado en el método de cultivo simple es suficiente para respaldar el crecimiento celular, y agregar un segundo biomaterial no proporcione un beneficio adicional significativo.

Por el contrario, al observar los datos en base al tiempo de cultivo en la incubadora podemos identificar que existe una mayor concentración de células a los 3 y 7 días de cultivo lo que indicaría una respuesta inicial positiva al entorno tridimensional proporcionado por el biomaterial. Este período inicial puede estar asociado con la proliferación activa de células germinales que responden a las señales del entorno de cultivo, estableciendo las bases para el desarrollo posterior hasta alcanzar un densidad poblacional estable.

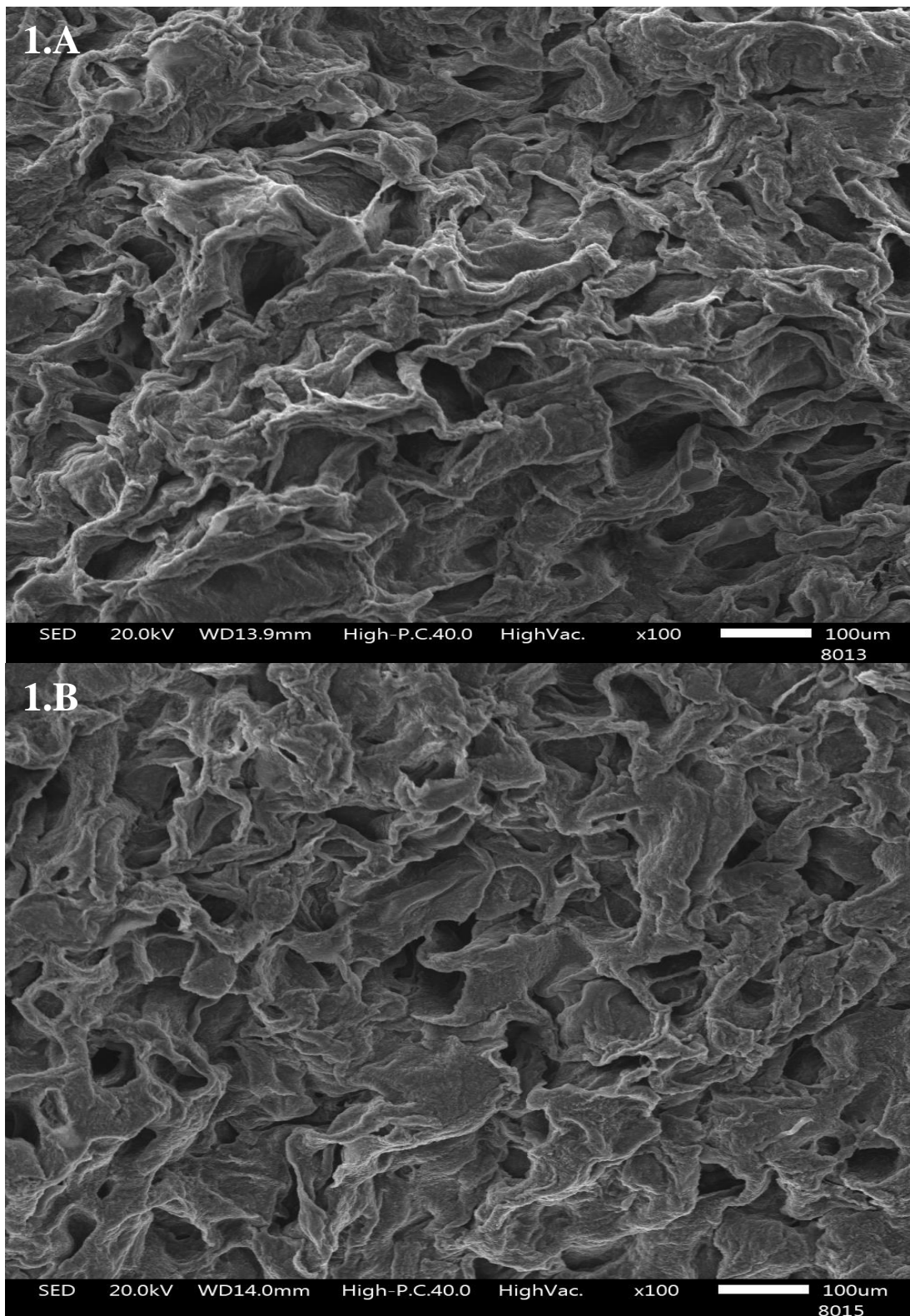
Adicionalmente, se observa un decrecimiento de dicha concentración celular en las muestras del día 10. Lo que podría deberse a la limitación de recursos en el medio de cultivo, como nutrientes esenciales y factores de crecimiento. A medida que el cultivo progresa, es posible que las células germinales experimenten una competencia por estos recursos, lo que lleva a un decrecimiento en su concentración. Debemos considerar que la falta de diferenciación de las células germinales podría estar vinculada a la disminución observada en el día 10 ya que la diferenciación celular necesita de varios factores como señales específicas y condiciones de cultivo adecuadas. Por lo que se debería analizar la composición del medio de cultivo y considerar la adición de factores de crecimiento que sean capaces de estimular la diferenciación. De lo contrario las células germinales podrían entrar en una fase de estancamiento o incluso experimentar un declive en la concentración (Kostereva & Hofmann, 2008).

## CONCLUSIONES

La industria ganadera desempeña uno de los roles más importantes cuando se habla de alimentación. Sin embargo, la cría tradicional de ganado plantea desafíos significativos en términos de sostenibilidad, eficiencia e impacto ambiental. La espermatogénesis in vitro es una técnica avanzada de reproducción asistida que busca simular y regular el proceso de generación de espermatozoides con potenciales implicaciones para la industria ganadera en términos de sostenibilidad y eficiencia en la reproducción de células germinales fuera del entorno natural. Basado en esto se busca el desarrollo un andamiaje tridimensional a través de la descelularización de tejido testicular bovino y evaluar su eficiencia para el cultivo de células germinales. Los resultados obtenidos permiten una caracterización exitosa del biomaterial descelularizado bovino revelando un sustrato prometedor para el cultivo de células germinales testiculares. Esto se debe a la combinación de varios factores durante el proceso de descelularización como la congelación, uso de detergentes y la agitación constante logrando una eliminación eficiente de células al igual que el desarrollo de una estructura porosa brindando un entorno propicio para el desarrollo de las células germinales.

El cultivo celular mostró una respuesta inicial positiva al entorno tridimensional proporcionado por el biomaterial, con una mayor concentración celular a los 3 y 7 días, pero se observó un decrecimiento a los 10 días, posiblemente debido a la limitación de recursos en el medio de cultivo. Se sugiere la adición de factores de crecimiento al medio de cultivo para estimular la diferenciación celular y evitar un estancamiento o declive en la concentración de células germinales.

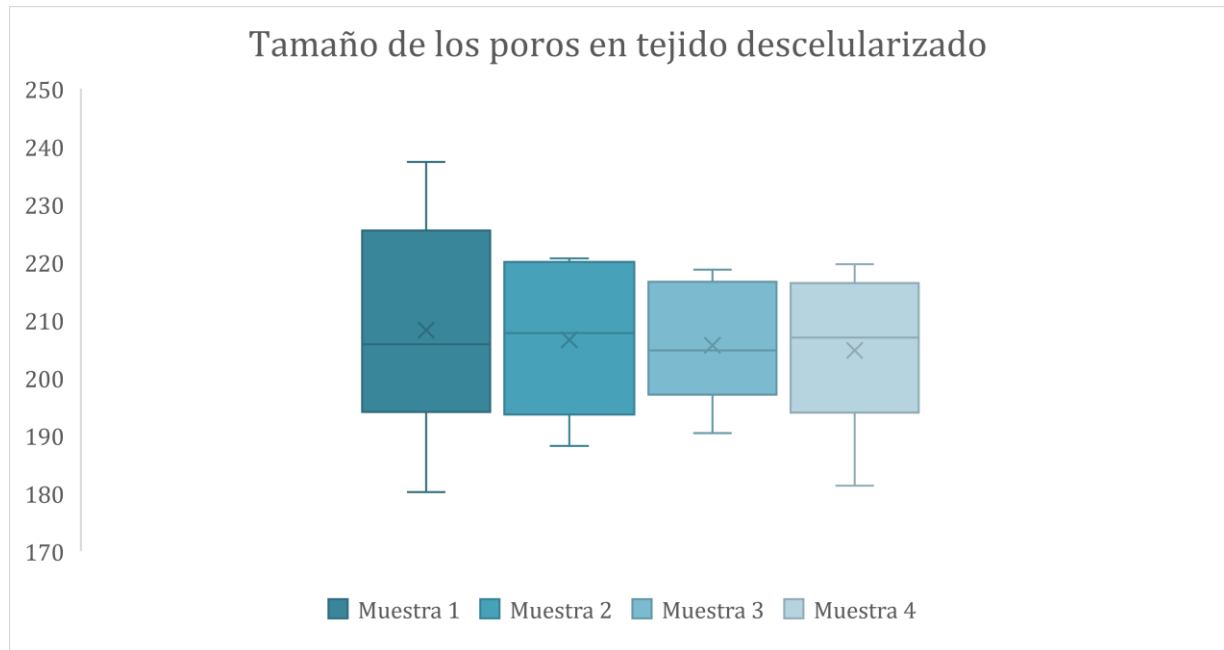
## FIGURAS



*Figura 1. Analisis del tejido testicular descelularizado mediante microscopia de barrido electrónico*

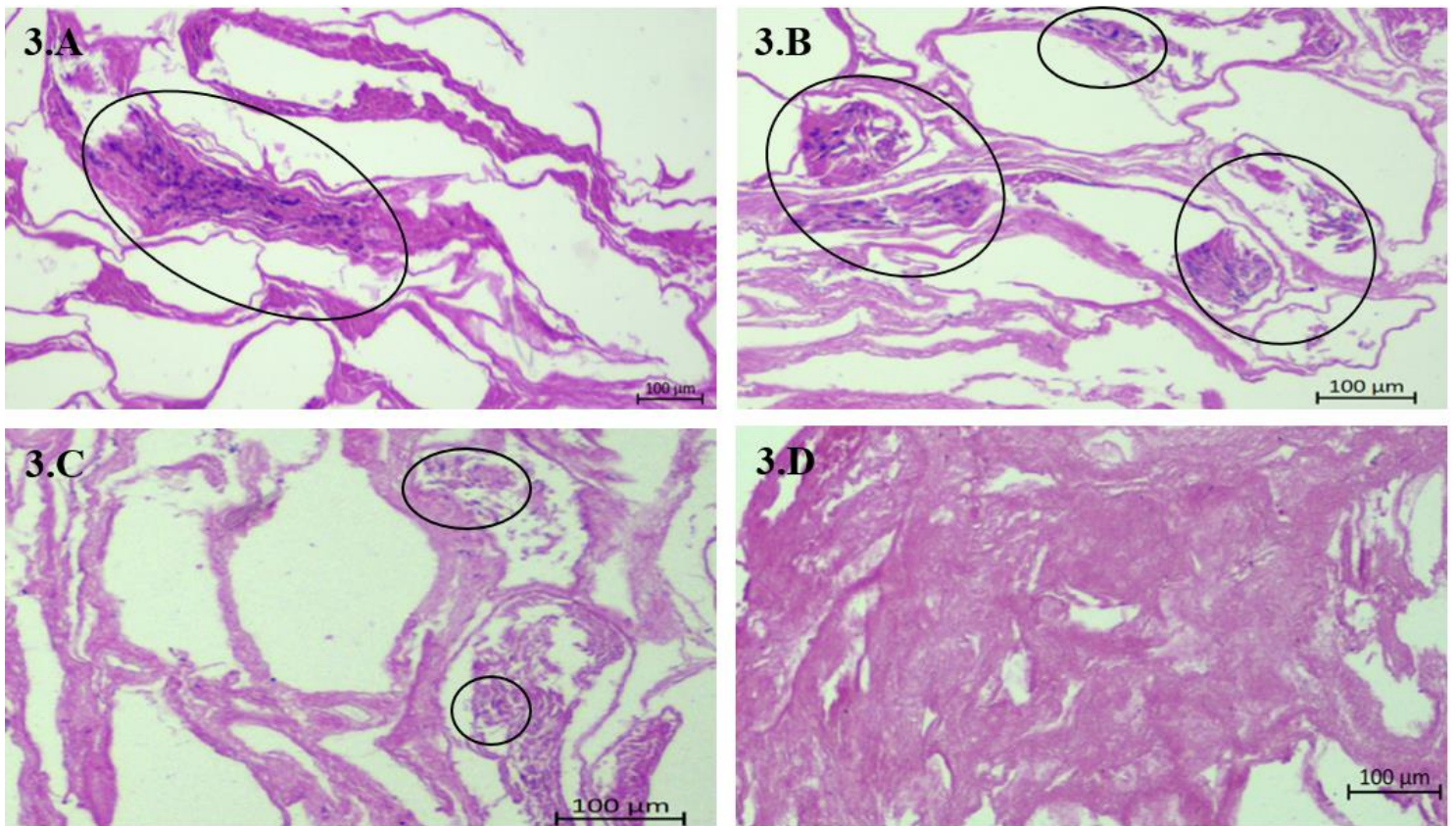


Descripción de la figura: A continuación, observamos los resultados del proceso de descelularización después de someter al tejido a detergentes en agitación constante. 1.A indica la presencia de fibras, así como de la conservación de la matriz extracelular. 1.B indica la porosidad como característica morfológica predominante



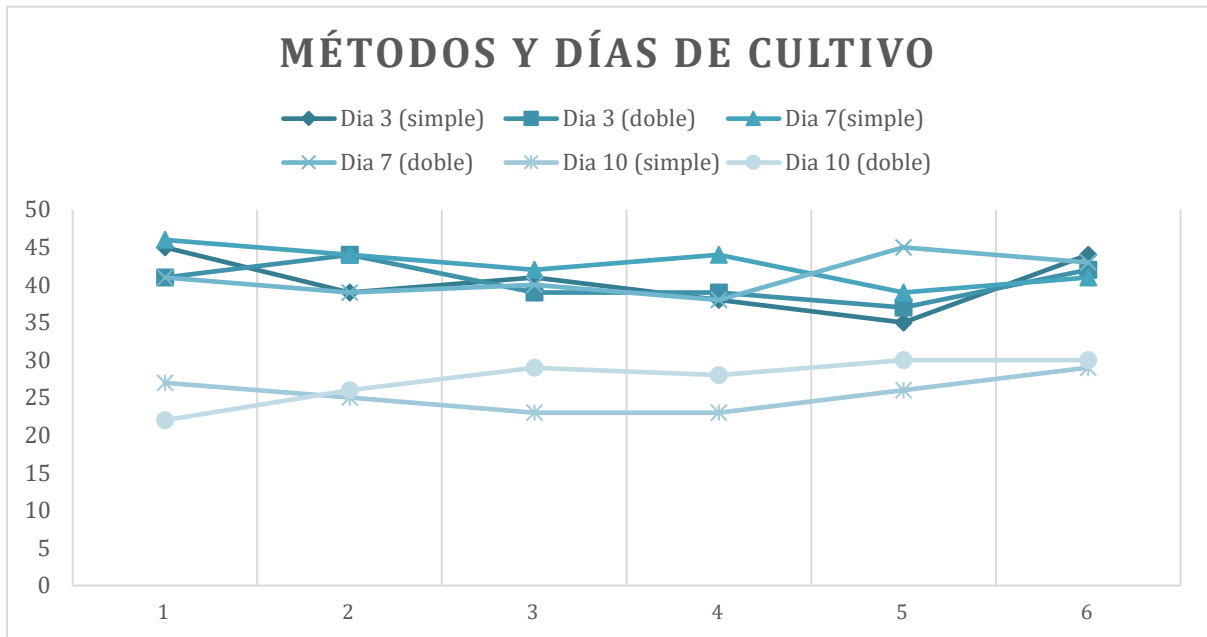
*Figura 2. Box plot del tamaño de los poros en diferentes muestras después de su descelularización*

Descripción de la figura: Se observa un gráfico de caja y bigotes a partir de 4 muestras aleatorias después del proceso de descelularización del tejido. En este se analizan diferentes medidas del tamaño en  $\mu\text{m}$  de los poros en cada una de las muestras.



*Figura 3. Analisis del cultivo celular mediante cortes histológicos y tinción de hematoxilina y eosina*

Descripción de la figura: Mediante análisis morfológico se observa la presencia de células germinales en tejido descelularizado. 3.A corresponde a la muestra a los 3 días de cultivo. 3.B corresponde al día 7 de cultivo. 3.C día 10 de cultivo celular y finalmente 3.D corresponde al control negativo.



*Figura 4. Gráfico comparativo del número de clusters de células germinales identificadas*

Descripción de la figura: En este line plot podemos observar la comparación de los datos tomados en base al número de clusters de células germinales presentes en las muestras tanto de los diferentes días, así como de los métodos de cultivo.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Baert, Y., Dvořáková-Hortová, K., Margaryan, H., & Goossens, E. (2019). Mouse in vitro spermatogenesis on alginate-based 3D bioprinted scaffolds. *Biofabrication*, 11(3), 035011. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab1452>
- De Kretser, D. M., Loveland, K. L., & O'Bryan, M. K. (2016). Spermatogenesis. In Elsevier eBooks (pp. 2325-2353.e9). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-18907-1.00136-0>
- Delessard, M., Stalin, L., Rives-Feraille, A., Moutard, L., Saulnier, J., Dumont, L., Rives, N., & Rondanino, C. (2022). Achievement of complete in vitro spermatogenesis in testicular tissues from prepubertal mice exposed to mono- or polychemotherapy. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11286-6>
- FAO. (2021). El estado de los recursos de tierras y aguas del mundo para la alimentación y la agricultura - Sistemas al límite. In FAO eBooks. <https://doi.org/10.4060/cb7654es>
- Huleihel, M., Abuelhija, M., & Lunenfeld, E. (2007). In vitro culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth Factors*, 25(4), 236–252. <https://doi.org/10.1080/08977190701783400>
- Kim, B., Ventura, R. D., & Lee, B. (2017). Functionalization of porous BCP scaffold by generating cell-derived extracellular matrix from rat bone marrow stem cells culture for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2). <https://doi.org/10.1002/term.2529>
- Kostereva, N., & Hofmann, M. (2008). Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Reproduction in Domestic Animals*, 386-392. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904914/>

- Kulibin, A. Y., & Малолина, Е. А. (2023). In vitro spermatogenesis: In search of fully defined conditions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1106111>
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Engineering Part B-reviews*, 19(6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>
- Minitab. (2021). Identificar valores atípicos. Obtenido de Minitab, LLC website:  
<https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/graphs/general-graph-options/graph-editing-basics/identifying-outliers/#:~:text=Un%20valor%20at%C3%ADpico%20es%20una,2%2C%203%2C%20y%2034>
- Naeemi, S., Eidi, A., Khanbabaee, R., Sadri-Ardekani, H., & Kajbafzadeh, A. (2021). Differentiation and proliferation of spermatogonial stem cells using a three-dimensional decellularized testicular scaffold: a new method to study the testicular microenvironment in vitro.
- Neishabouri, A., Khaboushan, A. S., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A., & Zolbin, M. M. (2022). Decellularization in tissue Engineering and Regenerative Medicine: evaluation, modification, and application methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>
- Salem, M., Khadivi, F., Javanbakht, P., Mojaverrostami, S., Abbasi, M., Feizollahi, N., Abbasi, Y., Heidarian, E., & Yazdi, F. R. (2023). Advances of three-dimensional (3D) culture systems for in vitro spermatogenesis. *Stem Cell Research & Therapy*, 14(1).  
<https://doi.org/10.1186/s13287-023-03466-6>

Song, H. C., & Wilkinson, M. (2012). In vitro spermatogenesis. *Spermatogenesis*, 2(4), 238–244. <https://doi.org/10.4161/spmg.22069>

Srokowski, E. M., & Woodhouse, K. A. (2017). 2.20 decellularized scaffolds. In Elsevier eBooks (pp. 452–470). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100691-7.00055-0>

USDA. (2021). Meat Animals Production, Disposition, and Income. National Agricultural Statistics Service, 0748–0318. <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/02870v85d/5999p013g/1257bn807/meatan21.pdf>

## ANEXOS

**Anexo 1: MIX ENZIMÁTICO PARA AISLAMIENTO CELULAR**

<b>Mix Enzimático I</b>	
<b>Enzima</b>	<b>Peso (mg)</b>
Colagenasa	50
Hialuronidasa	50
Tripsina	50
<b>Mix Enzimático II</b>	
<b>Enzima</b>	<b>Peso (mg)</b>
Colagenasa	50
Hialuronidasa	50

**Anexo 2: MEDIO MEM 1X**

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad (ml)</b>
Agua destilada	412
MEM 10X	50
Bicarbonato de sodio	8.5
Glutamina	10
Aminoácidos no esenciales	5
Gentamicina	0.25
Penicilina	5
Buffer HEPES	7.5

**Anexo 3: TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA**

1. 3x3 min en NeoClear para desparafinar
2. 2x1 min en etanol 100%
3. 1 min en etanol 95%
4. 1 min en etanol 70%
5. 1 min en H<sub>2</sub>O destilada
6. 1 min en Hematoxilina de Harris
7. 1 min en H<sub>2</sub>O destilada
8. 20 segundos en ácido acético 2%
9. 1 min en H<sub>2</sub>O destilada
10. 1 min de agua corriente
11. 1 min de H<sub>2</sub>O destilada
12. 1 min en etanol 70%
13. 1 min en Eosina
14. 1 min en etanol 95%
15. 3 min en etanol 100%
16. 3x1 min en etanol 100%
17. Aplicación de medio de montaje
18. Cubrir placas cubreobjetos y dejar secar antes de observar en el microscopio