

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Espermatogénesis *in vitro* en bovinos
Proyecto de investigación

Jezabel Alejandra Guevara Flores

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 13 de mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Espermatogénesis *in vitro* en bovinos

Jezabel Alejandra Guevara Flores

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

Pedro Manuel Aponte García, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 13 de mayo de 2019

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: Jezabel Alejandra Guevara Flores

Código: 00115219

Cédula de Identidad: 1720980752

Lugar y fecha: Quito, 13 de mayo de 2019

DEDICATORIA

El presente trabajo es una pequeña contribución al desarrollo de técnicas de cultivo para la inducción de la espermatogénesis *in vitro* en bovinos, y de esta manera buscar beneficios a los pequeños ganaderos para dinamizar la economía, y también a la conservación de especies de alto valor genético o en peligro de extinción.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano por ser mi soporte e inspiración. A Sary y Margarita por permitirme llegar hasta este momento. A mi tutor Pedro Aponte, por ser un gran mentor y compartir conmigo y el mundo todo su conocimiento, me brindó la oportunidad de valorar la importancia del desarrollo científico. A la USFQ por el gran nivel académico y humano que brindan a la sociedad. A mis queridos amigos y compañeros, por las grandes experiencias.

RESUMEN

Fundamentado en el conocimiento actual de la espermatogénesis este proyecto de investigación representa un aporte a la reproducción de bovinos, ya que implementó una técnica para desarrollar la espermatogénesis *in vitro* en estos animales a partir de muestras de tejido testicular. En el Ecuador la actividad ganadera es una de las más representativas y se constituye como una actividad de autoempleo en la mayor parte de la población que la realiza. El crecimiento productivo de los espacios ganaderos, sean grandes o pequeños, depende en gran medida de la reproducción efectiva de sus ejemplares, razón por la cual esta investigación presenta una propuesta innovadora de reproducción *in vitro*, que permite fortalecer a la ganadería y aportar al crecimiento de la rentabilidad económica y la preservación de razas. La espermatogénesis es un proceso complejo que se caracteriza por tener dos fases: la proliferación y la diferenciación, por medio de estas fases se obtienen gametos masculinos a partir de células madres espermatogoniales. Este procedimiento varía dependiendo de la especie y en el caso de los bovinos consta de 14 etapas. La espermatogénesis *in vitro*, por su parte, se cumple cuando las condiciones del laboratorio son óptimas y se plantea como una alternativa a la criopreservación o la fecundación *in vitro* cuando esta no se puede concretar. La espermatogénesis *in vitro* busca como resultado la generación de gametos masculinos y es un procedimiento que se puede utilizar en animales con fertilidad reducida, infértiles o que han sido sometidos a algún tipo de tratamiento químico o radioactivo que ha afectado sus gametos. Es así que el objetivo de este trabajo fue implementar una técnica para desarrollar la espermatogénesis *in vitro* en bovinos. Para ello se cultivó dos tipos de cortes de tejido testicular (pequeño 0,25 cm³ y 0,5 cm³ grande) de 6 bovinos, 3 prepuberales y 3 adultos en una interface líquido-gas, utilizando como soporte cubos de agar. El experimento prepuberal tuvo una duración de 82 días y en el caso del tejido adulto 17 días. El medio de cultivo estaba conformado principalmente por MEM y FBS (10%). En el caso de los animales prepuberales se evaluó parámetros como: el diámetro de los túbulos seminíferos, área del tejido testicular, viabilidad de gonocitos al día 82. Se encontró diferencias estadísticamente significativas con un $p=0,00$ en el diámetro de los túbulos seminíferos (comparación día 0 y 82 días). Además, en el área del tejido en el corte pequeño y grande se consiguió un $p=0,035$ y $p=0,0$ respectivamente es decir se dieron cambios significativos. Además, se obtuvo una supervivencia aproximada del 6,12% de gonocitos y aproximada 28,19% en células somáticas después de 82 días *in vitro*. No obstante, no se logró culminar con éxito la inducción de espermatogénesis. Por su parte en el caso del tejido adulto se evaluó morfología, diámetro tubular y viabilidad espermática. Dentro de la morfología al día 17 se encontró presencia de células de Sertoli, Leydig y peritubulares al igual que espermatozoides. En cuanto a la variación del diámetro de tubular, se encontró en el corte pequeño, con un valor p de 0,27, que la variación no fue significativa. Igual resultado se encontró en el cultivo del corte grande con p de 0,52 con variación no significativa. Finalmente, se encontró que el porcentaje de viabilidad no cayó hasta el día 13 con un valor p 0,13. De esta manera, en el día 13 se obtuvo cerca de 60% de viabilidad para el corte pequeño alrededor de 58% % de viabilidad para el corte grande.

Palabras clave: Reproducción, bovinos, espermatogénesis, proliferación, diferenciación, in vitro, criopreservación, gametos, infertilidad.

ABSTRACT

Based on the current knowledge of spermatogenesis, this research project represents a contribution to the bovine reproduction since it implemented a technique to develop *in vitro* spermatogenesis in these animals from testicular tissue samples. In Ecuador, livestock activity is one of the most representative and constitutes a self-employment activity in most of the population that performs it. The productive growth of livestock areas, whether large or small, depends to a large extent on the effective reproduction of their specimens, which is why this research presents an innovative proposal of *in vitro* reproduction, which allows strengthening livestock and contributing to the growth of economic profitability and the preservation of livestock breeds. Spermatogenesis is a complex process characterized by having two phases: proliferation and differentiation, by means of these phases male gametes are obtained from spermatogonial stem cells. This procedure varies depending on the species and in the case of bovines, it consists of 14 stages. *In vitro* spermatogenesis, on the other hand, is fulfilled when laboratory conditions are optimal, and it is considered as an alternative to cryopreservation or *in vitro* fertilization when the latter cannot be determined. *In vitro* spermatogenesis results in the generation of male gametes and is a procedure that can be used in animals with reduced fertility, infertile or that have been subjected to some type of chemo or radioactive treatment that has affected their gametes. Thus, the objective of this research work was to implement a technique to develop *in vitro* spermatogenesis in cattle. For this, two types of testicular tissue cuts (small-0.25 cm³ and large-0.5 cm³) were cultured from 6 bovines, 3 prepubertal and 3 adults, in a liquid-gas interface, using agar cubes as support. While the prepubertal experiment lasted 82 days, the adult tissue lasted 17 days. The culture medium consisted mainly of MEM and FBS. In the case of the prepubertal ones, parameters such as the diameter of the seminiferous tubules, testicular tissue area, and viability of day 82 gonocytes were evaluated. Statistically significant differences were found with a value of $p = 0.00$ in the diameter of the seminiferous tubules (comparison days 0 and 82). In addition, a value of $p = 0.035$ and $p = 0.0$ were obtained in the area of the tissue in the small and large cut, respectively. That is to say, significant changes were obtained. Moreover, an approximate survival of 6.12% in gonocytes and 28.19% in somatic cells was obtained after 82 days *in vitro*. However, the induction of spermatogenesis was not carried out successfully.

On the other hand, in the case of adult tissue, morphology, tubular diameter and sperm viability were evaluated. Within the morphology, Sertoli, Leydig and peritubular cells were found as well as spermatozoa in 17 days. Regarding the variation of tubular diameter, it was found in the small cut with a p-value of 0.27, which variation was not significant. The same result was found in the culture of the large cut with a p-value of 0.52 (no significant variation). Finally, it was found that the viability percentage did not decline until day 13 with a p-value of 0.13. In this way, on day 13, about 60% viability was obtained for the small cut and around 58% viability for the large cut.

Key words: Reproduction, bovines, spermatogenesis, proliferation, differentiation, in vitro, cryopreservation, gametes, infertility.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	12
1.1. Generalidades.....	12
1.1.1. Bovinos.....	12
1.1.2. Importancia de los bovinos en el Mundo.....	12
1.1.3. Importancia de los bovinos en el Ecuador.....	12
1.1.4. Ganado cárnico y leche en el Ecuador.....	13
1.2. Reproducción sexual.....	13
1.2.1. Gónadas masculinas.....	13
1.3. Espermatogénesis.....	14
1.3.1. Espermatogénesis en mamíferos.....	14
1.3.2. Espermatogénesis en bovinos.....	15
1.3.3. Células madre espermatogoniales.....	17
1.4. Espermatogénesis <i>in vitro</i>	18
2. Objetivos.....	19
2.1. Objetivo general.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Área de estudio	20
4. Justificación.....	21
5. Materiales	22
5.1. Procesamiento del material.....	22
5.2. Cultivo <i>in vitro</i> tejido testicular.....	22
5.3. Viabilidad espermatozoides (tejido testicular adulto).....	23
5.4. Análisis histológico.....	23
5.5. Análisis estadístico de resultados.....	24
6. Métodos	24
6.1. Recolección y procesamiento del material.....	24
6.2. Diseño experimental.....	25
6.2.1. Fijadores.....	25
6.2.2. Tamaño.....	25
6.3. Cultivo <i>in vitro</i>	25
6.4. Análisis histológico tejido testicular adulto.....	26
6.5. Tinción hematoxilina tejido testicular adulto.....	27
6.6. Análisis de Resultados tejido testicular prepuberal.....	28
6.7. Análisis de Resultados tejido testicular adulto.....	28
6.8. Viabilidad espermatozoides tejido testicular adulto.....	28
7. Resultados	29
7.1. Análisis de tejido testicular prepuberal.....	29
7.1.1. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular prepuberal día 0 vs 82. Tejidos pequeños y grandes.....	29
7.1.2. Análisis área tejido testicular prepuberal.....	29
7.2. Análisis de tejido testicular adulto.....	30
7.2.1. Análisis Morfológico de tejido testicular adulto.....	30
7.2.2. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño pequeño.....	31
7.2.3. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño grande.....	31
7.2.4. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto por día.....	31

7.2.5.	Análisis viabilidad tejido testicular adulto tamaño grande.	32
7.2.6.	Análisis viabilidad tejido testicular adulto tamaño grande.	32
8.	Discusión	33
8.1.	Tejido testicular.	33
8.2.	Análisis de tejido testicular prepuberal.....	34
8.3.	Análisis de tejido testicular adulto.	38
9.	Conclusiones	39
10.	Recomendaciones	40
11.	Referencias bibliográficas	42
12.	Tablas	45
13.	Figuras	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados comparación de diámetros de los túbulos seminíferos de los tres animales, en cada tratamiento para el día 0 y 82 del cultivo <i>in vitro</i> de tejido testicular prepuberal.....	45
Tabla 2: Resultados viabilidad de células somáticas y gonocitos 82 del cultivo <i>in vitro</i> de tejido testicular prepuberal.	45
Tabla 3: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño pequeño.	46
Tabla 4: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño grande.	46
Tabla 5: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, comparación por día de los dos cortes.	46
Tabla 6: Resultados de la viabilidad de los espermatozoides en función del tiempo en el tejido testicular adulto, corte pequeño.....	47
Tabla 7: Resultados de la viabilidad de los espermatozoides en función del tiempo en el tejido testicular adulto, corte grande.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Variación del diámetro de los túbulos seminíferos del tejido testicular prepuberal, corte pequeño y grande en los días 0 y 82 de cultivo <i>in vitro</i> . En orden día 0, corte pequeño y corte grande.	48
Figura 2: Variación del área del tejido testicular prepuberal, corte pequeño desde el día 0 al 43 del cultivo <i>in vitro</i>	48
Figura 3: Variación del área del tejido testicular prepuberal, corte grande desde el día 0 al 43 del cultivo <i>in vitro</i>	49
Figura 4: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 1 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	49
Figura 5: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 2 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	50
Figura 6: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 3 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	50
Figura 7: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 1 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	51
Figura 8: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 2 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	51
Figura 9: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 3 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.	52
Figura 10: Variación del diámetro de los túbulos seminíferos vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) figura azul corte pequeño 0,25 cm ³ y figura roja grande 0,5 cm ³ de tejido testicular adulto de los tres animales.	52
Figura 11: Variación del porcentaje de viabilidad de los espermatozoides vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) en el corte pequeño 0,25 cm ³ de tejido testicular adulto correspondiente a los tres animales.	53
Figura 12: Variación del porcentaje de viabilidad de los espermatozoides vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) en el corte grande 0,5 cm ³ de tejido testicular adulto correspondiente a los tres animales.	53

1. Introducción

1.1. Generalidades

1.1.1. Bovinos.

Los bovinos son mamíferos rumiantes, alimentándose principalmente de forraje, clave para su desarrollo. Estos animales se encuentran dentro de la subfamilia de los bóvidos y entre los más famosos están los *Bos primigenius taurus*, grupo constituyente a las vacas y toros (Gasque, 2008). La actividad ganadera ha sido una de las más importantes y significativas que genera el producto interno bruto en latino américa (Marizancén & Artunduaga, 2017). Además, los bovinos pueden clasificarse según el fin productivo que se le dé al animal siendo 3 las categorías; carne, leche y mixto (INATEC, 2016).

1.1.2. Importancia de los bovinos en el Mundo.

La ganadería a nivel mundial constituye un eje sumamente importante en el sector alimenticio. Según la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) el cuarenta por ciento (40%) de la producción mundial agrícola corresponde al sector bovino, lo cual representa un aporte para más de mil millones de personas en el mundo. Los datos anteriores evidencian las exigencias en producción que existen en este sector agrícola, por lo que es un mercado en constante crecimiento y que amerita innovación apresurada en todos los ámbitos, desde la reproducción de los animales hasta su comercialización (FAO, 2018). En cuanto al ganado lechero, en 2017 la FAO indicó que la producción de leche a nivel mundial podría llegar a los 833,5 millones de toneladas. Este consumo se realizará principalmente en los continentes asiático y americano (2017).

1.1.3. Importancia de los bovinos en el Ecuador.

En el Ecuador la ganadería es considerada una fuente de autoempleo para las familias que habitan las zonas rurales del país, además de las grandes empresas dedicadas a estas actividades. No obstante, ocupa el 68% del suelo agrícola y solo contribuye en un 11% al PIB

del país; por lo tanto resulta una actividad ineficiente (Zambrano, 2018). Se debe recalcar que esta actividad está vinculada a las tres regiones del Ecuador (costa, sierra y oriente) (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2017). Y genera productos (carne, leche y derivados) que satisfacen necesidades alimenticias de primera línea, estos productos junto a los huevos son el 34% de la proteína consumida a nivel mundial (FAO, 2018).

1.1.4. Ganado cárnico y leche en el Ecuador.

Es así que en el 2017 el MAGAP, proclamó al Ecuador como país autosuficiente en cuanto a la producción de carne, llegando en ese año a 200 mil toneladas métricas de carne (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2017). Además, el ganado lechero generan cerca de 5,3 millones de litros por día, dato para el 2018 (Centro de la Industria Lactea del Ecuador, 2018).

1.2. Reproducción sexual.

Los bovinos utilizan como mecanismo para la producción de descendencia la reproducción sexual. Dentro de este procedimiento participan dos tipos de órganos sexuales conocidos como gónadas. La masculina se la denomina testículo y la femenina ovario (Hernandez, 2018). El éxito de la reproducción, su eficiencia y efectividad son claves para un aporte significativo a la economía de las granjas o espacios ganaderos, ya sean pequeños o grandes, por consiguiente, es necesario el aporte de la ciencia con metodologías innovadoras.

1.2.1. Gónadas masculinas.

El testículo corresponde a las gónadas masculinas, se caracteriza por ser glándulas con dos funciones: endócrina y citogénica. En estos órganos se producen las células sexuales denominados espermatozoides y las hormonas masculinas como la testosterona y en pequeñas cantidades estrógenos. Los testículos están cubiertos por una capa fina de piel llamada escroto, que cumple la función de protección y tiene glándulas sudoríparas. Por debajo del escroto, se encuentra la túnica dartos, equivalente del tejido subcutáneo y que gracias a las fibras

musculares que la componen reacciona a los cambios de temperatura moviendo el testículo dentro de la cavidad escrotal de arriba hacia abajo (Hernandez, 2018).

En la parte externa del testículo se encuentran la túnica albugínea que cubre a los túbulos seminíferos, los cuales se conectan a una red testicular. Y a su vez, esta desemboca en la cabeza del epidídimo, directamente al segmento inicial del conducto del epidídimo. El epidídimo conducto del epidídimo se divide en tres zonas: cabeza, cuerpo y cola, su función es primordial ya que es en este lugar en el cual los espermatozoides maduran (Hernandez, 2018).

1.3. Espermatogénesis.

La espermatogénesis es un proceso complejo en el cual participan células madres espermatogoniales en un estado poco diferenciado y que través de la proliferación y diferenciación se convierten en gametos masculinos, los espermatozoides (Agarwal & Sharma, 2013).

La renovación de las células madres y la posterior mitosis de las espermatogonias se establecen como las dos etapas proliferativas de la espermatogénesis, a las que se suman luego la meiosis y espermiogénesis (Takahashi & Yamanaka, 2006). En esta última etapa de la espermatogénesis se convierten las espermátidas haploides en espermatozoides (Zini & Agarwal, 2014).

Los espermatozoides tienen como característica principal ser una célula con capacidad fértil para la transferencia génica a futuras generaciones, por lo que forma parte de la línea germinal. Existen varios factores y células que resultan ser claves dentro del proceso de la espermatogénesis; entre las más importantes están las células madre espermatogoniales, células de Leydig, células de Sertoli, hormonas entre otras (Griswold, 2016).

1.3.1. Espermatogénesis en mamíferos.

La producción de gametos (gametogénesis) se da en cada especie animal de formas diversas, ya que este depende de varios factores específicos. En el caso de los mamíferos la

producción de gametos se da a la par de la apoptosis de células gametogénicas defectuosas, consiguiendo un equilibrio perfecto entre estos dos procesos. Para que este proceso se mantenga en equilibrio se encuentra como reguladoras del ciclo celular las quinasas dependientes de ciclina (Cdks) y el centrosoma. Cuando se presentan cambios en estas proteínas automáticamente el ciclo celular se detendrá, además se promoverá la apoptosis al disminuir la protección del p53 (Joachim, Stukenborg, & Luetjens, 2007).

La espermatogénesis en los mamíferos está constituida por tres fases principales. La primera parte es conocida como mitosis, en la cual las células entran en un proceso de división. Posteriormente, las células entran a un proceso de reducción del número de cromosomas en las fases de meiosis I y II y de esta manera se consiguen espermátidas haploides. Para finalizar en la tercera fase, las espermátidas entran a la espermiogénesis en la cual se diferenciarán hasta llegar a espermatozoides, proceso el cual es guiado por vías autocrinas, endócrinas, paracrina, y juxtacrinas (Chocu, Calvel, D Rolland, & Pineau, 2012).

1.3.2. Espermatogénesis en bovinos.

Gran parte del testículo está conformada por los túbulos seminíferos, en estos se ubican espermatozoides y células espermatogoniales en diferentes estadios de maduración y proliferación. De esta manera, las células con un estadio de diferenciación terminal (espermatozoides) se encuentran cerca de la luz del túbulo mientras que las células con menor diferenciación se encuentran hacia la lámina basal (Agarwal & Sharma, 2013).

A medida que las células espermatogoniales van diferenciándose, a fin de poder distinguirlas en sus diferentes estadios se les ha colocado una nueva nomenclatura. Por lo tanto, se inicia con espermatogonia fetal esta pasará a ser una espermatogonia postnatal de transición (gonocitos), y posteriormente una tipo A. Las espermatogonias tipo A, estas células aún tiene características de células madre y son las que entraran al proceso de mitosis allí se generarán

las espermatogonias tipo B y posteriormente los espermatocitos primarios, secundarios, espermáticas y espermatozoides (Agarwal & Sharma, 2013).

En bovinos el ciclo de la espermatogénesis dura alrededor de 61 días, dividiéndose en tres fases principales la espermatocitogénesis o fase proliferativa con una duración de 21 días, la meiosis que dura alrededor de 23 días y finalmente espermiogénesis con 17 días (Staub & Johnson, 2018).

En la primera fase se la proliferación de espermatogonias, existen tres tipos de células: las células madres, espermatogonias en proceso de diferenciación y espermatogonias en proliferación. Las primeras células son la línea base germinal para el proceso y se caracterizan por tener la capacidad de repoblar epitelio seminífero en caso de daños.

1.3.2.1. Mitosis.

La primera división celular se da con la espermatogonia A_0 (en los toros), la cual se divide y genera dos células hijas conocidas como espermatogonias A_1 , una de las células permanecerá como célula madre mientras que la otra continuará el proceso de diferenciación. Esta célula continúa con la división mitótica originando a las espermatogonias A_2 . La división continúa formando la espermatogonias A_3 , intermedias, B_1 y B_2 sucesivamente. Estas células se ubican en la lámina basal del túbulo seminífero. Las células espermatogoniales B_2 que se encuentre en un estado mayor de diferenciación se dividirán dando origen a los espermatocitos preleptoténicos, los cuales duplican su ADN sin dividirse (de 23 a 46 pares de cromosomas), (De Rooij & Griswold, 2012).

1.3.2.2. Meiosis.

Los espermatocitos primarios entran a la meiosis I con 46 pares de cromosomas, en esta fase se da una reducción cromosómica obteniendo dos células hijas con 23 pares de cromosomas. Estas células resultantes se las denomina espermatocitos secundarios. Estas

células entran a la meiosis II dividiéndose y cada una genera dos espermatidas redondas haploides (Griswold, 2016).

1.3.2.3. Espermiogénesis.

En esta fase las espermatidas sufren un proceso de transformación hasta convertirse en espermatozoides pasando por 4 etapas: la fase de Golgi, la de capuchón, la acrosomal y la de maduración. En la fase de Golgi, este organelo se acerca al núcleo y cambia hasta transformarse en la vesícula acrosomal del espermatozoide. En la siguiente fase (del capuchón) el núcleo se compacta y la vesícula acrosomal recubre al núcleo en forma de capucha, además se detiene la replicación y transcripción ya que las histonas son sustituidas por protaminas. En la tercera fase, las mitocondrias se agrupan cerca del núcleo y forma la parte media y la morfología del espermatozoide queda definida. En la última fase, la de maduración, la cabeza del espermatozoide toma la forma característica de cada especie y finalmente los espermatozoides son liberados a la luz de los túbulos seminíferos (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006).

1.3.3. Células madre espermatogoniales.

La capacidad de autoproliferación y diferenciación son características de las células madre, y en el caso del epitelio germinal, las células madre espermatogoniales (SSC), la única célula con la capacidad de transmitir información a través de las generaciones, en animales de sexo masculino. Estas células son la base del proceso de la espermatogénesis con una capacidad pluripotencial (De Rooij & Griswold, 2012).

Con el avance de la ciencia se ha encontrado que este tipo celular tiene la capacidad de generar las tres capas embrionarias a nivel de laboratorio, esto aportaría en gran medida a los avances dentro de la medicina regenerativa. A nivel ético al ser consideradas células adultas no presentan ninguna implicación, no obstante, su uso debe ser controlado ya que existen factores epigenéticos asociados.

1.4. Espermatogénesis *in vitro*.

La espermatogénesis *in vitro* nace como una herramienta que busca satisfacer las necesidades que por alguna razón el uso de otras herramientas como la criopreservación y la fecundación *in vitro* no son suficientes. La espermatogénesis *in vitro* es una técnica nueva utilizada principalmente cuando los animales han sufrido daños a nivel de su sistema reproductor lo cual ha ocasionado que sus gametos estén dañados o no puedan producirse. Estos problemas se dan cuando los animales han sido expuestos a procesos de radiación, químicos, se encuentran en periodo prepuberal o tienen problemas de fertilidad.

Esta técnica tiene como fundamento utilizar como línea base a las células madres espermatogoniales y su propiedad de autoproliferación y diferenciación. Estas en condiciones adecuadas *in vitro* semejantes a las naturales generan espermatozoides (Kanatsu-Shinohara, Takehashi, & Shinohara, 2008). Factores que influyen en el cultivo a largo plazo de células espermatogoniales bovinas.

Dentro del cultivo *in vitro* de células madre espermatogoniales existen factores que influyen en su crecimiento. Uno de los factores es la poli-L-lisina que promueve el crecimiento células germinales e inhibe la proliferación de células somáticas. Este factor de crecimiento en cuanto a rendimiento es superior al encontrado en otros compuestos como *Dolichos biflorus* aglutinin (DBA), colágeno, la gelatina, o aglutininas (Sahare, y otros, 2015).

Adicionalmente, es necesario que el medio de cultivo contenga suplementos con el fin de aumentar los índices de supervivencia, uno de ellos es el (KSR) ideal para el mantenimiento de gonocitos (Sahare, y otros, 2015).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general.

Implementar una técnica para desarrollar la espermatogénesis *in vitro* en bovinos.

2.2. Objetivos específicos.

- Probar un sistema de interface aire-líquido para el desarrollo de la espermatogénesis *in vitro* en bovinos
- Evaluar el efecto del tamaño de tejido testicular en el desarrollo de la espermatogénesis *in vitro* en bovinos.
- Evaluar el grado de respuesta espermatogénica durante el cultivo *in vitro* a través de técnicas histológicas y estereológicas.

3. Área de estudio

Para el presente proyecto se utilizó 3 pares de testículos de bovinos jóvenes donados de la finca Paluguillo km 13 vía a Papallacta, en la cual se utiliza las castraciones dentro del manejo rutinario de los animales. Al trabajar con material animal y castración testicular se obtuvo la aprobación del Comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la USFQ. Además, se obtuvo 3 pares de testículos de bovinos adultos, provenientes de la Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito.

En los dos casos (testículos de bovinos prepuberales y adultos), una vez recolectado el material se colocó de forma inmediata en hielo y se lo transportó a las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito. Dentro de las instalaciones del laboratorio de biotecnología animal y siguiendo todos los protocolos de bioseguridad se procedió a lavar y limpiar los testículos. Posteriormente se obtuvo trozos grandes de testículos los cuales se los llevó al cuarto de cultivo del instituto de microbiología. Allí siguiendo el protocolo de cultivo *in vitro* se procedió a obtener los trozos de tejido testicular definitivos que serían utilizados para el cultivo. Posteriormente, se realizó un procesamiento histológico a los tejidos obtenidos del cultivo *in vitro* en los laboratorios de Biotecnología Animal de la USFQ y Patología del área de Sanidad Animal en Agrocalidad, ubicado en Tumbaco.

4. Justificación

La creciente demanda de productos de origen ganadero en los últimos años ha impulsado a la ciencia a buscar nuevas herramientas tecnológicas y biotecnológicas que permiten cubrir estos requerimientos (FAO, 2018); (Paiva, McManus, & Blackburn, 2016) . De esta manera, técnicas como la inseminación artificial y la criopreservación buscan conservar el material genético de animales con alto valor o de razas de ganado en peligro de extinción (Devi & Goel, 2016). Sin embargo, existen ocasiones en las que los animales se ven expuestos a factores internos o externos que pueden provocar grandes cambios en su sistema reproductor, destruyendo sus gametos; en estos las técnicas mencionadas anteriormente resultan obsoletas.

Por esta razón, la espermatogénesis *in vitro* es una nueva alternativa para animales prepuberales, con problemas de fertilidad, que sufren muerte repentina o aquellos que han sufrido tratamientos con radiación o quimioterapias (Onofre, Baert, Faes, & Goossens, 2016). Mediante este procedimiento se pretende realizar la diferenciación de células madre espermatogoniales *in vitro* hasta conseguir gametos masculinos con la capacidad de transmitir información a generaciones futuras (Zini & Agarwal, 2014). Además, se utilizó tejido testicular de bovinos adultos, evaluando la viabilidad de los espermatozoides con el paso del tiempo bajo condiciones *in vitro*. Este punto es importante ya que permite encontrar nuevas técnicas de supervivencia y proliferación del material genético y con esto es posible el desarrollo de modelos de conservación y reproducción eficiente (Strand et al., 2016).

5. Materiales

5.1. Procesamiento del material.

- 3 pares de testículos de toros adultos
- 3 pares de testículos de bovinos prepuberales
- Cooler
- Cajas Petri
- Pinzas y bisturí
- Bandeja de disección
- Balanza
- Pinzas y bisturí estériles

5.2. Cultivo *in vitro* tejido testicular.

- Trozos de tejido testicular adulto 0,25 cm³ y 0,5 cm³
- Trozos de tejido testicular prepuberal 0,25 cm³ y 0,5 cm³
- 9 Placas de 12 pocillos
- Pinzas estériles
- Pipetas
- 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/Estreptomina
 - 3% HEPES buffer
 - 0.4% Gentamicina (10 mg/mL)

- Fungizone (anfotericina B)
- Suero Fetal Bovino
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora de CO₂

5.3. Viabilidad espermatozoides (tejido testicular adulto).

- Trozos de tejido testicular adulto corte pequeño y grande (cultivados *in vitro*).
- Caja Petri
- Pinzas estériles
- Bisturí
- Pipetas
- Tubos Eppendorf
- PBS
- Azul tripán
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Microscopio electrónico

5.4. Análisis histológico.

- Alcohol (etanol) de 100%, 95% y 70%
- Tubos Falcon de 15 mL
- Xilol
- Xilol: Paraplast (1:1)
- Xilol: Paraplast (1:2)
- Paraplast (Parafina 100%)
- Solución de Bouin:
 - o 70% Ácido pícrico saturado
 - o 25% Formaldehído

- 5% Ácido acético glacial
- Moldes para inclusión en parafina
- Micrótopo
- Pincel
- Pinzas
- Baño maría
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Hematoxilina de Harris
- Medio para montaje

5.5. Análisis estadístico de resultados.

- Programa ImageJ
- Programa Estadístico SPSS
- Minitab
- Excel

6. Métodos

6.1. Recolección y procesamiento del material.

Se utilizó 3 pares de testículos de bovinos prepuberales donados de la finca Paluguillo y 3 pares testículos de bovinos adultos obtenidos de la Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito. Se transportó los testículos en un cooler con hielo a 4 °C a las instalaciones de la Universidad San Francisco de Quito. En el laboratorio de Biotecnología Animal se procedió a lavarlos utilizando agua común y con la ayuda de las pinzas y el bisturí se retiró el escroto, la túnica vaginal parietal, capas externas del testículo y el epidídimo. Una vez limpios se procedió a pesar cada uno de los testículos. Posteriormente se realizó cortes con las pinzas y bisturí estériles para obtener trozos grandes de testículo y se los colocó en cajas Petri para ser transportados al laboratorio de cultivo celular del Instituto de Microbiología.

6.2. Diseño experimental.

6.2.1. Fijadores.

Se utilizó dos tipos de soluciones; Bouin. Para el experimento con tejido testicular adulto se fijó las muestras desde el día 0 hasta el 82 con intervalos de 3-4 días aproximadamente. De igual manera, se realizó el mismo procedimiento para las muestras del tejido testicular adulto desde el día 0 hasta el día 17 con intervalos de 3-4 días aproximadamente. En cada oportunidad, los tejidos permanecieron 48 horas en fijador y se colocaron en etanol al 70% v/v a 4°C hasta el momento del procesamiento histológico.

6.2.2. Tamaño.

Se utilizó dos tamaños de trozos testiculares 0,25 cm³ y 0,5 cm³ en lo sucesivo denominados tamaño pequeño y grande respectivamente. De esta manera, se buscó encontrar la diferencia entre la captación de nutrientes en relación a la superficie de contacto del tejido. Cada tipo de trozo se cultivó *in vitro* en el caso del tejido testicular prepuberal por 82 días y en el tejido testicular adulto por 17 días.

6.3. Cultivo *in vitro*.

En el laboratorio de cultivo celular del Instituto de Microbiología dentro de una cámara de flujo laminar se procedió a cortar trozos testiculares de aproximadamente 0,25 cm³ y 0,5 cm³ del tejido testicular adulto y prepuberal. Se colocó cada trozo de cada animal y tipo de corte y origen del testículo (adulto o prepuberal) en un tubo falcon de 15ml con medio MEM, dejando las muestras en reposo. Se identificó con marcador cada uno de los tubos, nombrándoles por número de animal (1, 2, 3), corte (pequeño y grande) y testículo (adulto y prepuberal). Adicionalmente, se preparó bloques de agar (con autoclavado previo) de 1 cm² de superficie y 3-5 mm de altura, en los que se colocaron el material tisular de cultivo. Una vez que se dejó reposar, se cultivó los trozos de tejido en 9 placas con 12 pocillos.

Para preparar el sistema agar-tejidos se realizó una limpieza a la cámara de flujo laminar utilizando alcohol al 100%. Se introdujo a la cámara el material necesario para el cultivo (pinzas estériles, medio MEM, suero fetal bovino, Fungizone, tubos falcon vacíos, tubos con las muestras y las placas para el cultivo) desinfectándolo previamente en sus partes externas con etanol al 70% v/v. Después se preparó el medio de cultivo en un tubo falcon (10% suero fetal bovino en MEM y 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de Fungizone). Una vez preparado el medio, se abrió una por una las placas de 12 pocillos para el cultivo y se les colocó en el centro de cada pocillo un bloque de agar. Se colocó 5 mL de medio de cultivo en cada pocillo, sin que este llegue a cubrir el bloque de agar. Con la ayuda de las pinzas estériles se fue colocando una muestra (de cada tratamiento) sobre cada bloque de agar/pocillo. Se identificó las placas y los pocillos con el nombre de cada tratamiento. Finalmente, cada tres o cuatro días de cultivo se renovó el medio de los pocillos y se retiró del cultivo una muestra de tejido de 0,25 cm^3 y una de 0,5 cm^3 para ser fijadas (solución de Bouin).

6.4. Análisis histológico tejido testicular adulto.

Cada tres o cuatro días se tomó una muestra de tejido correspondiente a cada tipo de corte, y se las fijó en solución de Bouin, en tubos Falcon de 15 mL; evitando el contacto con la luz por 48 horas. Después se realizó el procedimiento para la inclusión en parafina. Para ello se pasó las muestras que se encontraban en Bouin a etanol al 70% v/v por al menos 1 hora a 4 °C, tratando de remover la solución fijadora. Posteriormente se colocó los tejidos en alcohol al 70% por 15 minutos. Se sacó las muestras y se las colocó en etanol al 95% por un lapso de 20 minutos repitiendo el procedimiento 3 veces. Una vez transcurrido ese tiempo se las colocó en alcohol al 100% por 20 minutos realizando este procedimiento por triplicado. Se retiró el alcohol y se colocó por 10 minutos una solución de xilol, posteriormente se colocó en una nueva solución de xilol esta vez por 5 minutos repitiendo el procedimiento 2 veces. A continuación, se retiró la solución y se colocó una de xilol: Paraplast (1:1) durante 45 minutos

(a 60 °C a partir de este paso). Al terminar este paso se colocó los tejidos en una solución de xilol:Paraplast (1:2) por 45 minutos. Transcurrido ese tiempo se movió las muestras a una solución 100% de parafina (Paraplast) por una media hora repitiendo 2 veces el procedimiento. Para finalizar se colocó la muestra en moldes de acero y se formaron los bloques con el cassette histológico utilizando parafina derretida y dejando solidificar a temperatura ambiente. Se mantuvo los cubos en refrigeración hasta el momento del corte.

En el laboratorio de Agrocalidad con la ayuda de un micrótopo semi-automático se realizó cortes del tejido de 5 µm de grosor. Con la ayuda de un pincel se colocó el corte en un baño de flotación a 40°C. Allí se mantuvo el corte hasta ser recolectado con un portaobjetos (limpios y previamente cubiertos de polilisina).

Una vez que se obtuvo los cortes con el micrótopo, se procedió a retirar la parafina del corte. Para ello se inició con una solución de xilol por tres minutos por triplicado. Posteriormente, se colocó los portaobjetos en alcohol al 100% por 1 minuto. Transcurrido ese tiempo se cambió a alcohol al 95% de igual manera por 1 minuto. Finalmente se hidrató el tejido utilizando agua destilada por 2 minutos, repitiendo el procedimiento por 3.

6.5. Tinción hematoxilina tejido testicular adulto.

A las placas que han sido retiradas el exceso de parafina e hidratadas se les colocó una gota de hematoxilina de Harris por un periodo de aproximadamente 15 segundos. Posteriormente se lavó las placas con agua destilada para retirar el excedente de colorante y se llevó a una tina con agua común para que el colorante reaccione con los elementos del agua y cambie su coloración.

Se lavaron las láminas con agua destilada y se mantuvieron en agua. Se lavó las placas con agua destilada y se colocó en alcohol al 95% por un minuto repitiendo el proceso por duplicado. Paso ese tiempo se colocó en alcohol al 100% por 1 minuto repitiendo el proceso agua destilada. Después se realizó por triplicado la adicción de xilol a las muestras. Al finalizar se

colocó una gota de medio de montaje y un cubreobjetos, dejándose secar toda la noche. Se observó al microscopio transcurrido el tiempo de secado.

6.6. Análisis de Resultados tejido testicular prepuberal.

Se revisó los cultivos semanalmente para ver evidencia de la espermatogénesis *in vitro*. De igual manera, se revisó el diámetro en los cultivos. Finalmente, con los datos arrojados por el programa SPSS se realizó graficas en Excel y Minitab.

6.7. Análisis de Resultados tejido testicular adulto.

Una vez que se obtuvo las placas con tinción hematoxilina se las observó en el microscopio utilizando aumentos de 4x, 10x y 40x. Se tomó foto en cada uno de los aumentos y se observó el estado de los túbulos seminíferos y las células presentes para una descripción futura. Además, analizó las fotografías tomadas en 10x utilizando el programa ImageJ para obtener los datos del diámetro de los tubos en cada muestra, se utilizó como referencia cuadrícula de microscopio (10x). Se ordenó los datos y se utilizó el programa SPSS, la opción One-Way ANOVA con el fin de analizar si los factores del tratamiento fueron significativos. Finalmente, con los datos arrojados por el programa SPSS se realizó graficas en Minitab y Excel.

6.8. Viabilidad espermatozoides tejido testicular adulto y día 82 tejido testicular prepuberal.

Cada tres o cuatro días se sacó una muestra correspondiente a cada tratamiento. Esta muestra se la colocó en tubos falcon con medio MEM para ser transportados desde el laboratorio de cultivo celular al laboratorio de biotecnología animal. Se colocó cada una de las muestras en cajas petri y se agregó una gota de PBS. Con la ayuda de pinzas y bisturí se realizó una maceración hasta conseguir un líquido blanco/amarillo. Posteriormente se colocó en tubos eppendorf el líquido blanco/amarillo y se añadió 15 uL de azul tripán mezclándolos bien. Después, se colocó una gota de esta solución en un portaobjeto, se colocó el cubreobjeto y se

observó en el microscopio. Se observó en un aumento de 10x y se buscó en varios campos ópticos al azar, contando alrededor de 150 espermatozoides entre vivos y muertos.

7. Resultados

7.1. Análisis de tejido testicular prepuberal.

Se revisó semanalmente los tejidos cultivados para ver evidencia de la espermatogénesis *in vitro*. Se encontró que del día 0 al 30 la cito arquitectura permaneció constante y a partir del día 30 se empezó a deteriorar el tejido hasta el día 82. Con el paso del tiempo los túbulos seminíferos fueron variando su diámetro y perdiendo luz. Además, se evaluó el diámetro de los túbulos seminíferos.

7.1.1. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular prepuberal día 0 vs 82. Tejidos pequeños y grandes.

Se midió el diámetro de los túbulos seminíferos correspondientes a cada uno de los tratamientos del tejido testicular prepuberal. Se realizó la comparación entre el día 0 y el día 82 de los dos tratamientos (cortes pequeños y grandes, Figura 1). Se utilizó la prueba estadística utilizando ANOVA, se encontró que no existe diferencia significativa entre cortes. No obstante, al comparar cada corte del día 82 con el inicial se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa con un $p = 0,00$ ($p < 0.05$) (tabla1). Se empleó Tukey para comparar los diferentes días y ver como el promedio va bajando; Es decir el diámetro de los túbulos seminíferos con el paso del tiempo fue decreciendo en tamaño de forma significativa. En el día 0 el diámetro de los túbulos seminíferos tenía un promedio de $376 \pm 120,13 \mu m$, mientras que el día 82 en el corte pequeño fue de $101 \pm 9,64 \mu m$ y en el corte grande de $99,49 \pm 19,67 \mu m$.

7.1.2. Análisis área tejido testicular prepuberal.

Se midió el área del tejido de cada uno de los tratamientos cada 3-5 días, desde el día 0 al 43. Al comparar el área del tejido correspondiente al corte pequeño desde el día 0 al 43 se

encontró con un valor de $p=0,035$ ($p < 0.05$) que los cambios en el área del tejido son estadísticamente significativos. De igual manera, al realizar la comparación de los tejidos grande en el tiempo se observó que el área del tejido tiene una variación estadísticamente significativa con un $p = 0,00$ ($p < 0.05$). Al realizar el método Tukey se observó que existe diferencia entre el día 9 con los días (3, 6, 12, 15, 31 y 43) y el día 37 con los días (3, 12 y 15) Figura 2.

7.1.3. Análisis viabilidad tejido testicular prepuberal día 82.

Se realizó el conteo de los gonocitos y células somáticas vivas y muestras en el día 82, para demostrar que se pudo mantener en cultivo *in vitro*. Se encontró una supervivencia aproximada del 6,12% de gonocitos y aproximada 28,19% en células somáticas y una mortalidad aproximada del 4,63% de gonocitos y aproximada 61,06% en células somáticas (tabla 2).

7.2. Análisis de tejido testicular adulto.

A partir de las placas obtenidas de la tinción con hematoxilina, se realizó una comparación en el tiempo (día 3, 6, 10, 13 y 17) de todos tratamientos (animales (1, 2, 3) y corte (pequeño y grande). Se buscó diferencias significativas en cuanto a cambios morfológicos en el tiempo y con respecto al tipo de corte. Además, se evaluó el diámetro de los túbulos seminíferos de cada muestra con el paso del tiempo. Finalmente, se analizó el comportamiento de la viabilidad de los espermatozoides hasta el día 17.

7.2.1. Análisis Morfológico de tejido testicular adulto.

Se observó la morfología de cada uno de los túbulos de las muestras, el estado de las células presentes y la presencia o no de espermatozoides. En este se observó que en el transcurso del tiempo la arquitectura de los túbulos seminíferos fue cambiando. Una característica particular en los túbulos fue la pérdida de luz. No obstante, se mantenía la presencia de células somáticas entre ellas Sertoli, unas pocas de Leyding, peritubulares en algunos casos y espermatozoides

hasta el día 17. Esto se puede observar en los diferentes Figuras de la 3 a la 8, que ilustran los tratamientos y el paso del tiempo del día 0 al 17 con intervalos de 3 a 4 días.

7.2.2. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño pequeño.

Se analizó la variación en el diámetro de los túbulos seminíferos de cada una de las diferentes muestras del tejido testicular adulto con un tamaño de $0,25 \text{ cm}^3$ de los tres animales. Al realizar la prueba t de Student se encontró un valor p de 0,27 ($p > 0.05$), por lo tanto, ratifica que la variación del diámetro de los túbulos seminíferos en el tiempo no es estadísticamente significativa (tabla 3). Con los datos obtenidos es posible observar en la figura 10 no presentaron variación en el diámetro promedio de los túbulos seminíferos a lo largo del tiempo (días 3, 6, 10 y 13).

7.2.3. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño grande.

Para cada muestra del tejido testicular adulto con un tamaño de $0,5 \text{ cm}^3$ de los tres animales. Se analizó la variación en el diámetro de los túbulos seminíferos en el tiempo. Al realizar la prueba t de student se encontró un valor p de 0,52 ($p > 0.05$), por lo tanto, ratifica que la variación de la viabilidad de espermatozoides en el tiempo no es estadísticamente significativa. Con los datos obtenidos es posible observar en la figura 10 no presentó variación en el diámetro promedio de los túbulos seminíferos a lo largo del tiempo (días 3, 6, 10 y 13) tabla 4).

7.2.4. Análisis diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto por día.

Se realizó una comparación entre la variación del diámetro de los túbulos seminíferos de los dos cortes por cada día. Al realizar el Anova comparando entre cortes por cada día, se obtuvo que solo en el día 3 fue estadísticamente significativo con un valor p de 0,008, es decir ($p < 0.05$). En los días 6, 10,13 y 17 los valores p fueron de (0,065; 0,141; 0,997; 0, 396) es

decir ($p > 0.05$), por lo tanto, no hubo una variación estadísticamente significativa en esos días tabla 5.

En la figura 11 se puede observar que el diámetro promedio de los túbulos seminíferos del corte pequeño en el día 3 con un valor de $131,66 \mu m \pm 6,78$ es menor al diámetro promedio del corte grande con un valor de $153,6 \mu m \pm 5,85$. No obstante, en el día 13 los valores se revierten ya que el corte pequeño termina con un diámetro promedio de $156,33 \mu m \pm 8,91$ y el corte grande con un valor de $148,00 \mu m \pm 4,67$.

7.2.5. Análisis viabilidad tejido testicular adulto tamaño pequeño.

Las diferentes muestras del tejido testicular adulto de tamaño pequeño no presentaron variación en los porcentajes de viabilidad de los espermatozoides a lo largo del tiempo. Al realizar la prueba t de Student se encontró un valor p de 0,41 ($p > 0.05$), por lo tanto, ratifica que la variación de la viabilidad de espermatozoides en el tiempo no es estadísticamente significativa (tabla 6). En el día 3 se encontró el mayor número de espermatozoides vivos con un porcentaje de viabilidad del $78,06\% \pm 13,59$ y el día 13 con un porcentaje de viabilidad del $60,7\% \pm 1,44$ con el menor número de espermatozoides vivos (Figura 12).

7.2.6. Análisis viabilidad tejido testicular adulto tamaño grande.

Al analizar cada una de las muestras del tejido testicular adulto de tamaño grande se observó que no existe variación en los porcentajes de viabilidad de los espermatozoides a lo largo del tiempo (días 3, 6, 10 y 13). Al realizar la prueba t de student se encontró un valor p de 0,13 ($p > 0.05$), por lo tanto, ratifica que la variación de la viabilidad de espermatozoides en el tiempo no es estadísticamente significativa (tabla 7).

En el día 6 se encontró el mayor número de espermatozoides vivos con un porcentaje de viabilidad del $63,74\% \pm 3,37$ y el día 3 con un porcentaje de viabilidad del $53,22\% \pm 4,35$ con el menor número de espermatozoides vivos (Figura 13).

8. Discusión

Al cultivar tejido testicular prepuberal por 82 días monitoreando diferentes parámetros, se encontró que el medio y el ambiente de cultivo fueron idóneos para mantener gonocitos presentes en animales pre-puberales. No obstante, no se logró culminar con éxito el proceso de diferenciación de las células madre espermatogoniales hasta conseguir espermatozoides. Así mismo, al probar las mismas condiciones de cultivo con tejido testicular adulto, se encontró que durante 17 días no hubo una variación estadísticamente significativa en la viabilidad de los espermatozoides presentes en los tejidos, demostrando que es un ambiente propicio para estas células. Sin embargo, ratifica que hubo una carencia de factores que permitan desencadenar el proceso de diferenciación, en el experimento con tejido testicular proveniente de animales prepuberales.

8.1. Tejido testicular.

Uno de los retos más grandes dentro de la biotecnología de la reproducción ha sido entender el mecanismo de la proliferación y posterior diferenciación que engloba a las células madre espermatogoniales (SSC) y su desarrollo a nivel de laboratorio. Al ser un procedimiento que se encuentra asociado a varios factores externos e internos que lo hacen aún más complicado para que se dé *in vitro*. Además, si a esto se le suma la necesidad de las células en formar agrupaciones entre ellas constituyendo nichos específicos de crecimiento, la complejidad del procedimiento aumenta (Hunter, Schumann, Anand-Ivell, & Ivell, 2012).

Por esta razón en este proyecto se utilizó tejido testicular, con el objetivo de que el desarrollo de los espermatozoides se dé en un ambiente similar al que se encuentra en los testículos. Es indispensable, que se cree un sistema equilibrado entre SSC y células somáticas. Al trabajar con tejido testicular se encontrarán células somáticas que aporten a la espermatogénesis; entre ellas están las células de Sertoli que son claves ya que apoyan el desarrollo de las células germinales proporcionando nutrientes, apoyo físico y señales

hormonales (Kim, y otros, 2015). De igual manera las células de Sertoli son las reguladoras del proceso de la espermatogénesis ya que por vía de la acción de la FSH, estas células secretan glicoproteínas (inhibina, transferrina y ceruloplasmina) implicadas en el proceso (Barrios, 2002).

Además, se utilizó un método de cultivo con una interface líquido- gas, en el cual los trozos de tejido fueron colocados en la parte superior de un bloque de agar, y se llenó las placas con medio de cultivo sin que este rebasa el cubo de agar. Esta metodología fue escogida con el objetivo de que se dé una transmisión eficiente de los nutrientes y el oxígeno a los tejidos. Otra ventaja al trabajar con tejido testicular, es que en este, a diferencia del cultivo celular, no es necesario la utilización de enzimas para la disociación tisular (Kim, y otros, 2015).

Para el tejido testicular prepuberal se cultivó por 82 días, ya que la espermatogénesis en bovinos *in vivo* dura 60 días, al no estar en el ambiente natural esperábamos que este proceso se demore más de lo habitual. Además, en este trabajo se utilizó células provenientes de bovinos menores a 3 meses, por lo tanto, el estadio de diferenciación de las células madres espermatogoniales no estaba presente.

8.2. Análisis de tejido testicular prepuberal.

Los resultados arrojados, independientemente del tratamiento utilizado, demostraron que no se culminó con éxito el proceso de espermatogénesis al utilizar tejido testicular prepuberal en estadio de gonocitos. Para el cultivo se empleó un medio formado en gran parte por MEM medio esencial mínimo, se optó por utilizar este medio ya que existen investigaciones que validan su uso como por ejemplo en el cultivo de tejido testicular en ratas (Reda, Kjartansdóttir, Svechnikov, Söder, & Stukenborg, 2014). En los cuales se ha demostrado que ha sido de gran contribución para el desarrollo de las células de Sertoli y Leydig; las mismas que apoyan el desarrollo de la espermatogénesis *in vitro*. Además, es utilizado para cultivos de células

embrionarias en suspensión y células adherentes de mamíferos, ya que contiene aminoácidos (Arora, 2017).

Además, se utilizó suero fetal bovino el cual tiene el potencial de ayudar a la proliferación y diferenciación de células germinales y somáticas. En otro trabajo de investigación se realizaron pruebas sobre el porcentaje de concentración del suero fetal bovino vs la concentración de células germinales y se encontró que no existe una diferencia significativa al variar las concentraciones de FCS (Erazo, 2017), que usualmente se usa en concentraciones de 10 a 20%.

Para la evaluación del progreso de la espermatogénesis *in vitro* se sacó una muestra del cultivo cada 3 a 4 días y se observó la arquitectura de los túbulos seminíferos y la presencia de células. Desde el día 0 al 82 únicamente se logró divisar gonocitos y células somáticas (Sertoli Leydig, entre otras) es decir se mantuvieron en el tiempo sin presentar cambios en su estadio de diferenciación. Sin embargo, se dio un cambio en el diámetro de los túbulos seminíferos dándose una reducción. Según, la literatura en algunas ocasiones factores termodinámicos provocan la degeneración testicular y con ello la afectación de los túbulos seminíferos y por consiguiente se ve afectada la espermatogénesis (Sierra, Universidad Cooperativa de Colombia). Por su parte en otro trabajo indican que un aumento en la temperatura puede provocar que los túbulos seminíferos pierdan luz. (Huanca, Coronado, & Galloway, 2015). En este experimento la temperatura fue constante por lo que no pudo ser el factor causante de que los túbulos hayan perdido luz con el paso del tiempo.

Además, se evaluó el área del tejido testicular prepuberal de todos los tratamientos con el paso del tiempo. Al igual de lo ocurrido con el diámetro de los túbulos seminíferos, el área del tejido disminuyó considerablemente con los días, esta variación se pudo dar por factores del microambiente como la temperatura o falta de nutrientes que obligaron al tejido a reducir su tamaño con el fin de que las células madres espermatogoniales y las somáticas puedan

sobrevivir. Otro factor que se pudo dar es la muerte celular quizás por apoptosis o necrosis, recordando que la espermatogénesis es un proceso dinámico y equilibrado entre la proliferación, diferenciación y muerte celular, esta última actúa como mecanismo para controlar el número de células germinales y eliminar a las que se encuentran dañadas. Además, es necesario recalcar que cuando se da el proceso de diferenciación de los gonocitos a espermatozoides existe una etapa en la que se produce apoptosis y muchas células mueren, al inicio de la primera ola espermática (López-Trinidad, y otros, 2016).

En otro experimento realizado en el 2015 con tejido testicular neonatal de ratón a los que se les cultivo *in vitro*, se les indujo a la espermatogénesis positivamente y se consiguió descendencia con los espermatozoides obtenidos. En este tejido había la presencia de gonocitos. Al igual que en este trabajo se utilizó una interface gas-líquido para el cultivo celular y se utilizó como soporte cubos de agarosa a los que se les colocó el tejido en la parte superior. Así mismo, el periodo de observación de los cultivos coincide con nuestra metodología que fue de 3 a 4 días, con la diferencia en que se utilizó un estereomicroscopio equipado con una luz de excitación para GFP (proteína verde fluorescente), exámenes histológicos e inmunohistológicos. Además, en el experimento mencionado se utilizó medio MEM, FBS dos de los factores que fueron parte del medio de cultivo para este trabajo. Sin embargo, otros elementos que utilizaron y no estuvieron presentes en esta tesis fueron: Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, Activina A, hormona estimulante del folículo (FSH) de pituitaria humana, testosterona, BMP-4 humana recombinante, BMP-7 humana recombinante y extracto de pituitaria bovina (Sato, y otros, 2011). Varios de estos factores utilizados cumplen funciones estimulantes y hormonales para las células germinales y somáticas ayudando a que se dé la espermatogénesis, al no estar presentes en el medio de cultivo utilizado en esta tesis, se convierte probablemente en uno de los factores para que no se haya logrado obtener los espermatozoides.

De igual manera, según otros autores, factores como la vitamina A, específicamente su metabolito ácido retinoico es esencial para que las espermatogonias entre a la profase de la meiosis celular y posteriormente se dé la maduración de dichas células. Este factor fue probado en roedores para analizar los efectos negativos de su ausencia. En estos se encontró que en ausencia de vitamina A, en estos animales se da una falla en la expresión del gen *Stra8*, frenando el inicio de la meiosis y la ola espermática (Ramírez & Prada, 2015). Esto puede concordar con los resultados que se obtuvo, ya que el medio de cultivo utilizado no fue suplementado con vitamina A y quizás este fue uno de los factores que impidió el desarrollo germinal. De igual manera, en otro experimento se utilizó como factor la deficiencia de vitamina A, para inducir a ratones adulto a que cese la espermatogénesis, confirmando que este es un factor importante. En este experimento se consiguió con éxito el proceso de espermatogénesis *in vitro* y además se demostró que la inducción de espermatogénesis es significativamente mayor utilizando donantes jóvenes que adultos. Cabe recalcar que en este experimento, a diferencia del nuestro se agregó un factor de células madre del animal (ligando Kit) (R&D Systems) y el factor 1 estimulante de colonias humanas (CSF-1) (R&D Systems) (Sato, y otros, 2015).

En otro experimento en el que se realizó cultivo *in vitro* con trozos de tejido testicular prepuberal en ratones, en el cual obtuvieron resultados favorables en la inducción de la espermatogénesis. En este se comparó las edades de los donantes, los ratones demasiado jóvenes (13 días) presentaban problemas para la inducción de la espermatogénesis, los autores atribuían que los testículos de estos animales no se encontraban preparados para afrontar el proceso de la espermatogénesis. Sin embargo, en los ratones de 14,5 días la espermatogénesis se dio con mayor normalidad debido a que ese es el tiempo mínimo en el que se completa la formación del túbulo seminífero y se logra asociaciones entre células somáticas (Sertoli, Leydig y peritubulares) y germinales (Kojima, Sato, Naruse, & Ogawa, 2016). Esto

demostraría que el factor edad del donante es importante para que el proceso de la espermatogénesis *in vitro* se desarrolle. En este caso se debería optar por utilizar bovinos de al menos 5 meses de edad, ya que según la bibliografía los túbulos seminíferos contienen en su gran mayoría se puede obtener espermatogonias tipo A, ayudando a que el proceso de diferenciación sea más factible (Izadyar, Spierenberg, Creemers, den Ouden, & de Rooij, 2002).

8.3. Análisis de tejido testicular adulto.

Con el fin de demostrar las condiciones de cultivo *in vitro* como idóneas para la supervivencia de espermatozoides de bovinos adultos, se realizó el cultivo testicular de tres muestras de toros. Este cultivo se lo realizó por 17 días, en este se evidenció que la citoarquitectura de los túbulos se mantuvo en el tiempo. Células de Sertoli, Leydig y peritubulares estuvieron presentes, las cuales aportaron al mantenimiento del túbulo y de los espermatozoides presentes. En la literatura se reporta que es crucial una interacción y co-cultivo entre células germinales y somáticas lo cual aporta en gran medida a la diferenciación, proliferación y mantenimiento de los espermatozoides en el cultivo (Komeya, Sato, & Oqawa, 2018). De allí que al mantener estas condiciones utilizando tejido testicular, fue posible mantener los espermatozoides. Aparentemente el mantenimiento de células terminalmente diferenciadas como los espermatozoides es suficiente con los aportes del medio de cultivo y la contribución de las células somáticas de su microambiente.

Además, en los experimentos realizados independientemente de las variables tamaño del tejido o animal, los resultados de diámetro tubular y viabilidad espermática se mantuvieron prácticamente estables, sin una variabilidad estadísticamente representativa hasta al menos el día 13 en cultivo.

Además, los valores arrojados de los diámetros demuestran que se encuentran dentro del margen fisiológico de lo que debería tener un túbulo seminífero. Animales maduros

sexualmente y con un plano nutricional adecuado deben tener un diámetro tubular de entre 200 a $250\mu\text{m}$ (Fosslund y Schultze, 1961). Según estos mismos autores, toros púberes jóvenes deben tener promedios de diámetros tubulares de $150\mu\text{m}$ lo cual corresponde con el promedio obtenido en el presente trabajo (desde el día 0 al final de los experimentos, aproximadamente $151\mu\text{m}$). Además al no presentar una reducción del túbulo seminífero, es posible concluir que no hubo una afectación por factores termodinámicos al momento del cultivo (Huanca, Coronado, & Galloway, 2015).

Finalmente, al evaluar la viabilidad de los espermatozoides de los dos tratamientos desde el día 0 al 13 se encontró que con el paso del tiempo no presenta una reducción significativamente estadística. De esta manera, en el día 13 se obtuvo cerca de 60% de viabilidad para el corte pequeño alrededor de 58% de viabilidad para el corte grande. Si se compara estos porcentajes con los resultados obtenidos por otras técnicas de conservación como la criopreservación post-congelación, se observa que estos apenas llegan al 9, 33% de viabilidad basando en DMSO utilizando tejido testicular de corte pequeño (Chicaiza, 2018). En otros trabajo se reportaron valores 40% de viabilidad de los espermatozoides obtenidos del epidídimo y hasta un 60% de viabilidad para espermatozoides eyaculados (Curry, 2007). Es necesario recalcar que a pesar de que la viabilidad de los espermatozoides del epidídimo es alta, la ventaja con los espermatozoides que fueron cultivados en este experimento provienen del testículo y estos se caracterizan por tener un contenido óptimo de lípidos y colesterol. Esta característica permite que los espermatozoides mantengan membranas tolerantes a bajas temperatura y menos permeables (Chicaiza, 2018).

9. Conclusiones

El cultivo *in vitro* de tejido testicular adulto es una técnica innovadora para la conservación de germoplasma, la cual supera el porcentaje de viabilidad de otras técnicas como la criopreservación post congelación y criopreservación de muestras obtenidas del epidídimo. La

principal limitación de esta técnica es que fue probada únicamente hasta los 17 días y no se conocen datos de la supervivencia de los espermatozoides más allá de esos días, lo cual podría ser una desventaja ya que en las técnicas de criopreservación el germoplasma puede ser conservado por mayor tiempo. Sin embargo, la proliferación *in vitro* de SSC, dado que se logre la diferenciación hacia espermatozoides, podría significar una amplificación de los gametos disponibles.

Se encontró que el cultivo de tejido testicular aportó en gran medida al mantenimiento de los espermatozoides, ya que proporcionó un nicho adecuado de desarrollo y mantenimiento conteniendo células somáticas y germinales. Además, la interface líquido- gas ayudó a una transición correcta de los nutrientes y oxígeno presentes en el medio de cultivo y atmósfera gaseosa presente.

En el cultivo *in vitro* de tejido testicular prepuberal no se consiguió culminar con éxito la espermatogénesis completa. No obstante, se consiguió mantener por 82 días gonocitos junto a células somáticas. Es posible que haya existido una falta de factores esenciales para que las células madres espermatogoniales logren diferenciarse.

10. Recomendaciones

-Se recomienda utilizar vitamina A en el cultivo *in vitro* de tejido testicular prepuberal ya que la investigación indica que es un posible elemento activador para el proceso de la espermatogénesis *in vitro*.

-Se recomienda bovinos de al menos 5 meses de edad para el cultivo *in vitro* de tejido testicular prepuberal etapa del animal en que tiene en los testículos espermatogonias tipo A, lo cual posiblemente facilitaría la espermatogénesis *in vitro*, por tratarse las espermatogonias tipo A de células mitóticamente activas y en un estado más avanzado de diferenciación.

-Se recomienda prolongar el cultivo *in vitro* de tejido testicular adulto para encontrar hasta qué lapso de tiempo los espermatozoides logran sobrevivir en estas condiciones y obtener los

porcentajes de viabilidad para ser comparados con los obtenidos en otras técnicas como la criopreservación.

-Se recomienda la evaluación de otros parámetros de calidad espermática y utilizar marcadores moleculares para identificar los tipos celulares específicos dentro de los túbulos seminíferos y el estado en el que se encuentran.

11. Referencias bibliográficas

- Agarwal, A., & Sharma, R. (2013). Spermatogenesis: An Overview. *Sperm Chromatin for the Researcher*, 127-160.
- Arora, M. (2017). Cell Culture Media: A Review. *researchgate*, 1- 29.
- Barrios, D. (2002). Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. *XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal*, 1-14.
- Centro de la Industria Lactea del Ecuador. (2018). *La producción de leche en el Ecuador*. Obtenido de <https://cilecuador.org/index.php/2018/04/08/produccionleche/>
- Chicaiza, N. (2018). Criopreservación de germoplasma masculino ex vivo en bovinos adultos. *Universidad San Francisco de Quito*, 1 - 77.
- Chocu, S., Calvel, P., D Rolland, A., & Pineau, C. (2012). Spermatogenesis in mammals: Proteomic insights. *NCBI*, 1-12. doi:10.3109/19396368.2012.691943
- Curry, M. (2007). Cryopreservation of Mammalian Semen. *Methods in Molecular Biology: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, 303- 311.
- De Rooij, D., & Griswold, M. (2012). Questions About Spermatogonia Posed and Answered Since 2000. *American Society of Andrology*, 1085-1096.
- Devi, L., & Goel, S. (2016). Fertility preservation through gonadal cryopreservation. *Reproductive Medicine and Biology*, 235-251. doi:<https://doi.org/10.1007/s12522-016-0240-1>
- Erazo, S. (2017). Aislamiento, cultivo e identificación molecular de células madres espermatogoniales en bovinos. *USFQ*, 1-55.
- FAO. (2018). *Animal production*. Obtenido de <http://www.fao.org/animal-production/en/>
- FAO. (2018). *Soluciones ganaderas para el cambio climático*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/i8098es/I8098ES.pdf>
- Gasque, R. (2008). *Enciclopedia Bovina UNAM*. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Griswold, M. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 7-17.
- Hernandez, R. (2018). Anatomía del aparato reproductor masculino bovino. *Revista Veterinari Argentina*, 1-7.
- Huanca, W., Coronado, L., & Galloway, D. (2015). Efecto de la Manipulación de la Temperatura Escrotal sobre las Características Clínicas, Seminales y Endocrinas en Carneros. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*, 604- 613.
- Hunter, D., Schumann, S., Anand-Ivell, R., & Ivell, R. (2012). Models of *in vitro* spermatogenesis. *PubMed*, 1-12.
- INATEC. (2016). *Manual del protagonista. Ganado mayor y menor*. Obtenido de https://www.jica.go.jp/project/nicaragua/007/materials/ku57pq0000224spz-att/Ganado_Mayor_y_Menor_Part1.pdf
- Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Creemers, L. B., den Ouden, K., & de Rooij, D. G. (2002). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 85-94.
- Joachim, W., Stukenborg, J., & Luetjens, M. (2007). Mammalian Spermatogenesis. *Global Science*, 99-117.
- Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., & Shinohara, T. (2008). Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 17-23.

- Kim, K.-J., Kim, B.-G., Kim, Y.-H., Lee, Y.-A., Kim, B.-J., Jung, S.-E., & Ryu, B.-Y. (2015). *In vitro* Spermatogenesis Using Bovine Testis Tissue Culture Techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 314-3123.
- Kojima, K., Sato, T., Naruse, Y., & Ogawa, T. (2016). Spermatogenesis in Explanted Fetal Mouse Testis Tissues. *Biology of Reproduction*, 1-6.
- Komeya, M., Sato, T., & Ogawa, T. (2018). *In vitro* spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reproductive Medicine and Biology*, 1-14.
- López-Trinidad, B., Königsberg, M., Ávalos-Rodríguez, A., Rodríguez-Tobón, A., Rodríguez-Tobón, E., Retana, F., & Arenas-Ríos, E. (2016). Apoptosis en espermatozoides. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1-6.
- Marizancén, M., & Artunduaga, L. (2017). Genetic improvement in cattle through artificial insemination and artificial insemination at fixed time. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 247-259.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. (2017). *Ecuador es autosuficiente para cubrir demanda nacional de carne bovina*. Obtenido de <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-es-autosuficiente-para-cubrir-demanda-nacional-de-carne-bovina/#>
- Nathaly, C. (2018). Criopreservación de germoplasma masculino ex vivo en bovinos adultos. *Universidad San Francisco de Quito*, 1 - 77.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 426-436.
- 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*, 744-761. doi:<https://doi.org/10.1093/humupd/dmw029>
- Paiva, S. R., McManus, C. M., & Blackburn, H. (2016). Conservation of animal genetic resources – A new tact. *Livestock Science*, 32-38. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.09.010>
- Ramírez, L., & Prada, C. (2015). La vitamina A: reguladora de la espermatogénesis. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*. , 63-79.
- Reda, A. H., Kjartansdóttir, K. R., Svechnikov, K., Söder, O., & Stukenborg, J.-B. (2014). *In vitro* Spermatogenesis – Optimal Culture Conditions for Testicular Cell Survival, Germ Cell Differentiation, and Steroidogenesis in Rats. *Frontiers in Endocrinology*, 1- 11. doi:10.3389/fendo.2014.00021
- Sahare, M., Kim, S., Otomo, A., Komatsu, K., Minami, N., Yamada, M., & Imai, H. (2015). Factors supporting long-term culture of bovine male germ cells. *Reproduction, Fertility and Development* , 2039-2050.
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., . . . Ogawa, T. (2011). *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* , 504-507.
- Sato, T., Katagiri, K., Kojima, K., Komeya, M., Yao, M., & Ogawa, T. (2015). *In vitro* Spermatogenesis in Explanted Adult Mouse Testis Tissues. *PLoS ONE* . doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130171>
- Sierra, L. (Universidad Cooperativa de Colombia). Factores Nutricionales y Térmicos con efectos en la fertilidad de los machos bovinos. 2016, 1- 19.
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. *Animal*, 1-9.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 663-676.

Zambrano, L. (28 de Mayo de 2018). La ganadería, ante el reto de pesar en la economía.

Expreso.ec. Obtenido de <https://www.expreso.ec/economia/ganaderia-reses-economia-produccion-agricultura-EX2198170>

Zini, A., & Agarwal, A. (2014). Spermatogenesis: An Overview. *Springer Science+Business Media*, 19-44.

12.Tablas

Tabla 1: Resultados comparación de diámetros de los túbulos seminíferos de los tres animales, en cada tratamiento para el día 0 y 82 del cultivo *in vitro* de tejido testicular prepuberal.

Animal	Corte	Diámetro promedio por animal	Valor P	Tukey (Agrupaciones)	
Día 0			0,000	A	
1,00	Pequeño y grande	321,50			
2,00	Pequeño y grande	291,58			
3,00	Pequeño y grande	512,98			
Día 82					
1,00	Pequeño	89,96			
2,00	Pequeño	107,50			
3,00	Pequeño	105,66			
1,00	Grande	76,77	B		
2,00	Grande	110,72			
3,00	Grande	110,96			

Tabla 2: Resultados viabilidad de células somáticas y gonocitos 82 del cultivo *in vitro* de tejido testicular prepuberal.

Resultados espermatogénesis <i>in vitro</i> día 82									
Animal	Gonocitos vivos		Gonocitos muertos		Somáticas vivos		Somáticas muertas		Células Totales
	N	%	N	%	N	%	N	%	N Total
1P	11	6,59	7	4,19	25	14,97	124	74,25	167
2P	6	3,45	4	2,30	22	12,64	142	81,61	174
3P	11	7,59	11	7,59	36	24,83	87	60,00	145
1G	13	5,75	6	2,65	76	33,63	131	57,96	226
2G	18	10,78	12	7,19	67	40,12	70	41,92	167
3G	4	2,56	6	3,85	67	42,95	79	50,64	156
Promedio (%)	6,12		4,63		28,19		61,06		100

Tabla 3: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño pequeño.

Día	Tamaño	Mean	Std. Error	Valor P
1	1	131,67	6,78	0,27
2	1	153,00	5,85	
3	1	149,73	3,68	
4	1	153,50	9,74	
5	1	156,33	8,91	

Tabla 4: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, tamaño grande.

Día	Tamaño	Mean	Std. Error	Valor P
1	2	153,61	4,31	0,52
2	2	137,15	5,69	
3	2	169,41	13,77	
4	2	153,46	3,62	
5	2	148,00	4,67	

Tabla 5: Resultados del diámetro de los túbulos seminíferos tejido testicular adulto, comparación por día de los dos cortes.

Día	Tamaño	Mean	Std. Error	Valor p
1	1	131,67	6,78	0,008
1	2	153,61	4,31	
2	1	153,00	5,85	0,065
2	2	137,15	5,69	
3	1	149,73	3,67	0,141
3	2	169,42	13,77	
4	1	153,50	9,74	0,997
4	2	153,46	3,62	
5	1	156,33	8,90	0,396
5	2	148,00	4,66	

Tabla 6: Resultados de la viabilidad de los espermatozoides en función del tiempo en el tejido testicular adulto, corte pequeño.

Tiempo	% Viabilidad	SEM	Valor P
día 3	78,06	13,59	0,41
día 6	62,42	6,14	
día 10	65,60	1,97	
día 13	60,70	1,44	

Tabla 7: Resultados de la viabilidad de los espermatozoides en función del tiempo en el tejido testicular adulto, corte grande.

Tiempo	% Viabilidad	SEM	Valor P
día 3	53,22	4,35	0,13
día 6	63,74	3,37	
día 10	61,77	1,73	
día 13	57,99	1,01	

13. Figuras

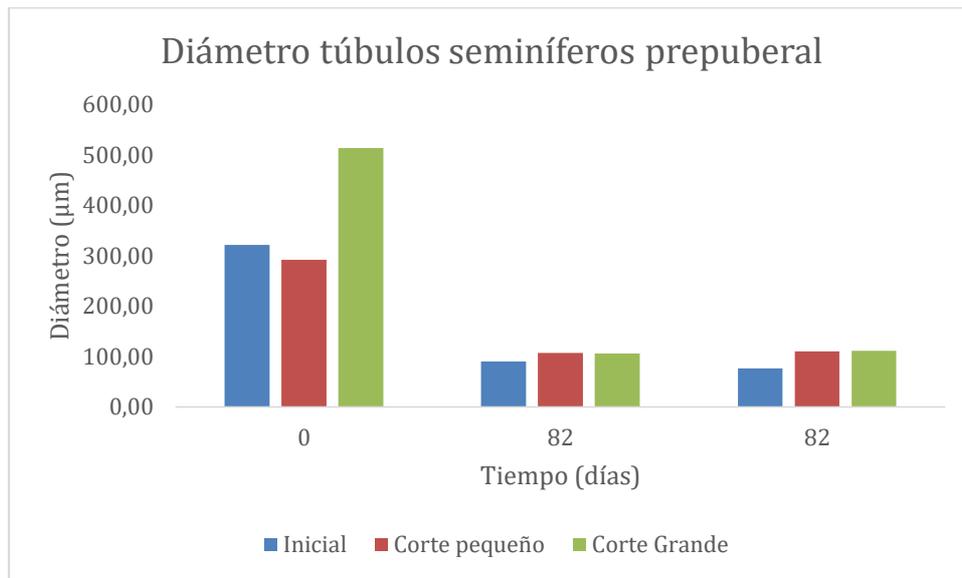


Figura 1: Variación del diámetro de los túbulos seminíferos del tejido testicular prepuberal, corte pequeño y grande en los días 0 y 82 de cultivo *in vitro*. En orden día 0, corte pequeño y corte grande.

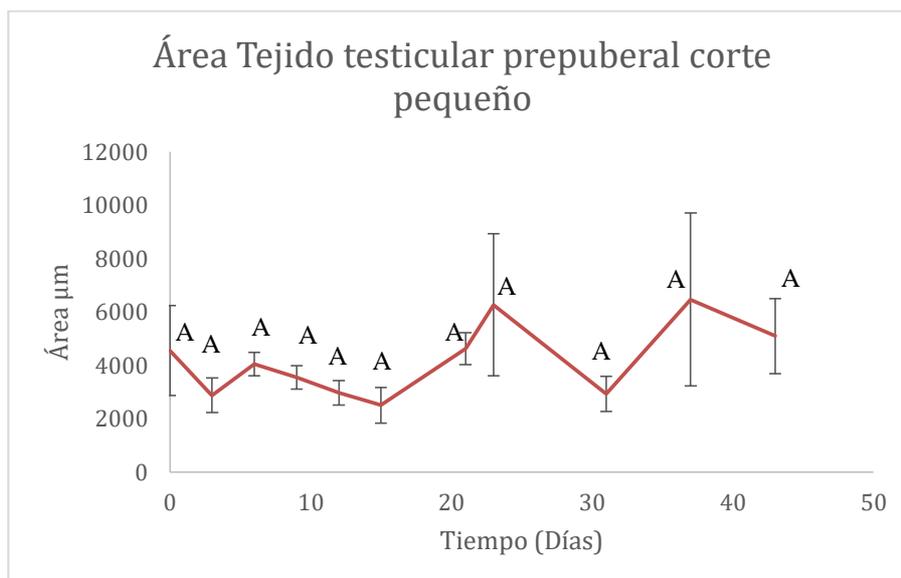


Figura 2: Variación del área del tejido testicular prepuberal, corte pequeño desde el día 0 al 43 del cultivo *in vitro*. Barra de error = SEM (Standard error of the mean).

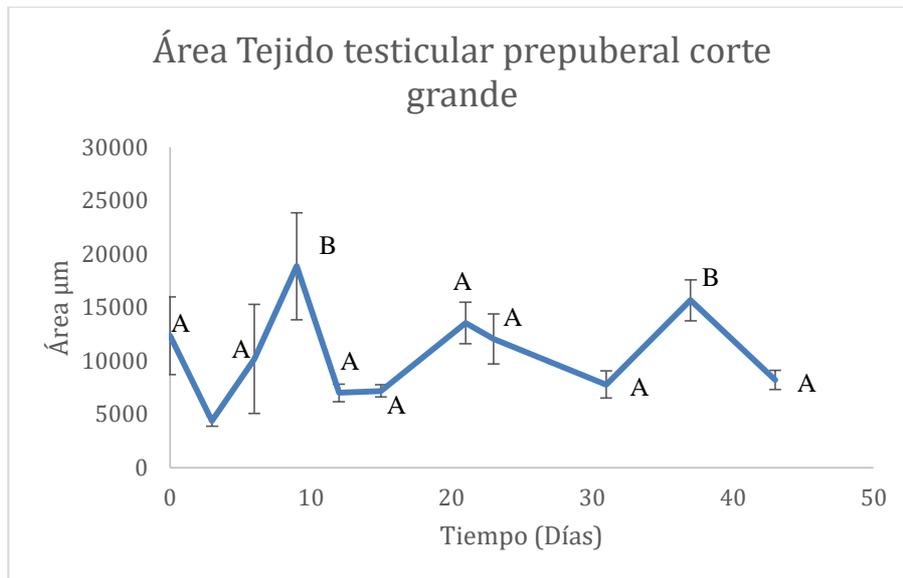


Figura 3: Variación del área del tejido testicular prepuberal, corte grande desde el día 0 al 43 del cultivo *in vitro*. Barra de error = SEM (Standard error of the mean)

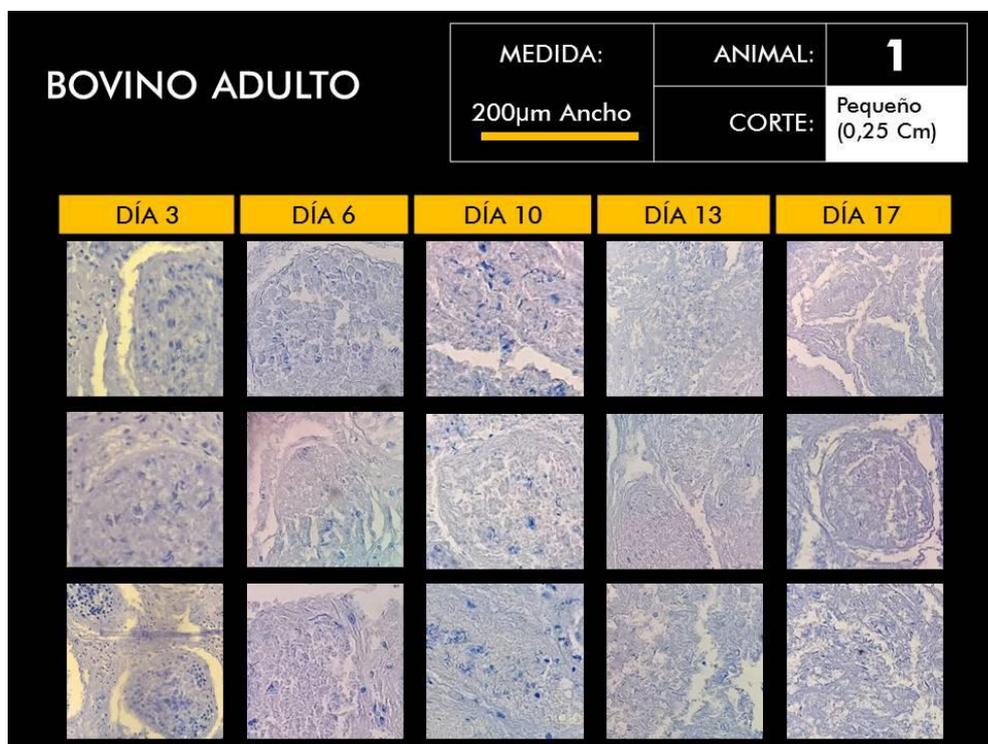


Figura 4: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 1 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.



Figura 5: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 2 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.



Figura 6: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 3 corte pequeño; a través del tiempo desde el día 0 al 17.



Figura 7: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 1 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.



Figura 8: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 2 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.



Figura 9: Evaluación morfológica de los túbulos seminíferos del tejido testicular adulto, animal 3 corte grande; a través del tiempo desde el día 0 al 17.

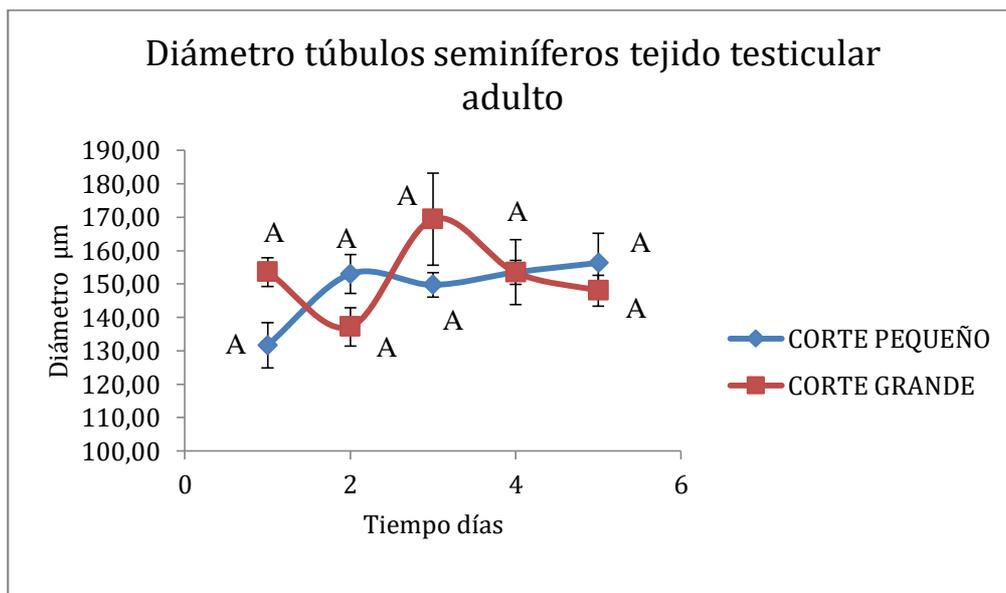


Figura 10: Variación del diámetro de los túbulos seminíferos vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) figura azul corte pequeño 0,25 cm³ y figura roja grande 0,5 cm³ de tejido testicular adulto de los tres animales. Barra de error = SEM (Standard error of the mean).

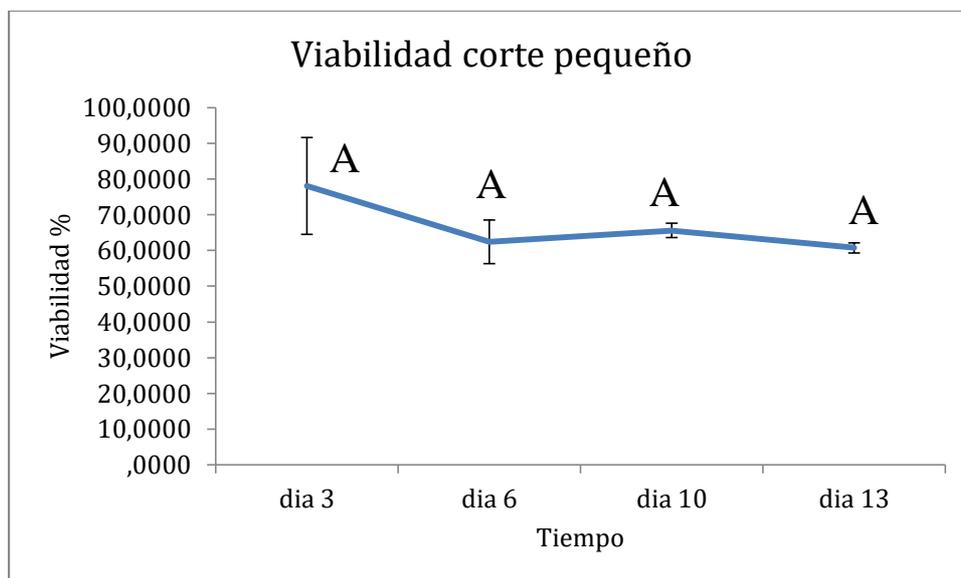


Figura 11: Variación del porcentaje de viabilidad de los espermatozoides vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) en el corte pequeño 0,25 cm³ de tejido testicular adulto correspondiente a los tres animales. Barra de error = SEM (Standard error of the mean).

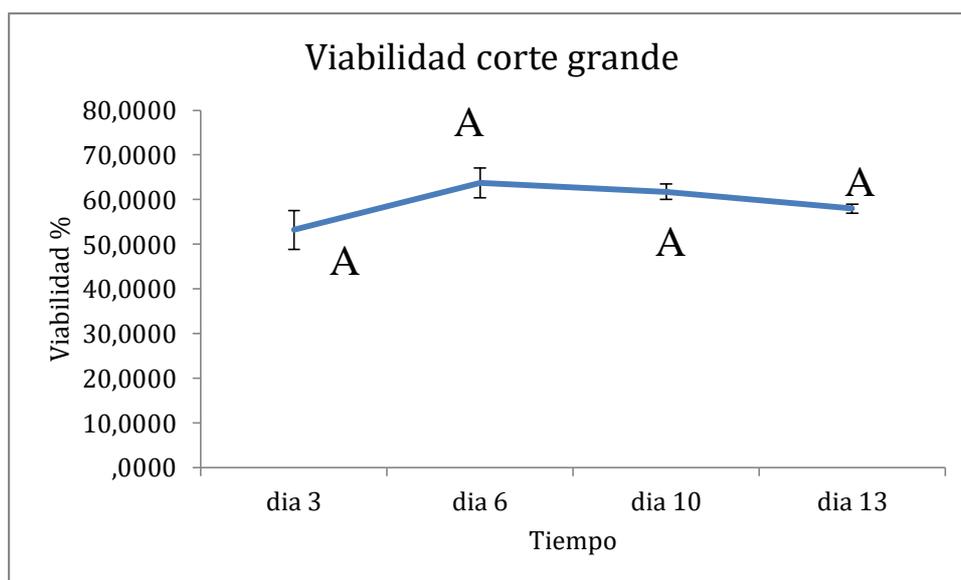


Figura 12: Variación del porcentaje de viabilidad de los espermatozoides vs el tiempo (días 3, 6, 10 y 13) en el corte grande 0,5 cm³ de tejido testicular adulto correspondiente a los tres animales. Barra de error = SEM (Standard error of the mean).