

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Criopreservación de tejido testicular de ovinos pre-puberales  
y evaluación de la viabilidad de células espermáticas pre y  
post-congelación.**

**Andrea Christina Álvarez Gutiérrez**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la  
obtención del título de Pregrado en Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de diciembre de 2019

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Criopreservación de tejido testicular de ovinos pre-puberales y  
evaluación de la viabilidad de células espermáticas pre y post-  
congelación.**

**Andrea Christina Álvarez Gutiérrez**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, título académico:**

María José Pozo Andrade, M.B.S.

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 04 de diciembre 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: Andrea Christina Álvarez Gutiérrez

Código: 00127756

Cédula de identidad: 0202170213

Lugar y fecha: Quito, 4 de diciembre de 2019

## RESUMEN

La ultracongelación consiste en emplear temperaturas bajo cero como un mecanismo para la conservación de células, tejidos y órganos. Este método tiene como objetivo principal prolongar la vida del material biológico y mantener lo más intacto posible el metabolismo celular. La criopreservación de células germinales en animales domésticos es un tipo de biotecnología reproductiva que permite almacenar material genético valioso para su futura propagación, a través de la reproducción asistida para la preservación de las especies o almacenamiento de gametos con genes de interés. Por tal motivo, este mecanismo resulta adecuado combinado con técnicas de reproducción como la inseminación artificial, fecundación in vitro o inyección intracitoplasmática de espermatozoides, con el fin de realizar un mejoramiento genético para aumentar la producción y calidad de los productos.

Con el propósito de comparar la viabilidad espermática en el material biológico, antes y después de emplear bajas temperaturas, el desarrollo del proyecto se llevó a cabo con cortes de tejidos del epidídimo y de las gónadas de tres ovinos machos prepuberales mestizos de Corriedale (3-4 meses de edad) sometidos a  $-196^{\circ}\text{C}$  con una solución criopreservante (DMSO + sacarosa). La evaluación microscópica de la viabilidad espermática antes y después de la ultracongelación se realizó empleando una tinción con azul tripán. Los resultados obtenidos, por un lado, reflejaron que estadísticamente no hubo diferencia significativa entre los tejidos empleados (epidídimo y gónada). Por otro lado, los tejidos presentaron porcentajes superiores de viabilidad de células espermáticas pre-congelación ( $> 80\%$ ). Por lo tanto, a pesar de que con el método de criopreservación desarrollado la viabilidad espermática disminuyó en un 50%, los porcentajes obtenidos son comparables con aquellos de semen comercial, pudiendo entonces ser empleado para la preservación espermática de esta especie. No obstante, se recomienda aumentar el número de ejemplares empleados para obtener resultados más contundentes.

**Palabras clave:** criopreservación, ovinos, testículos, gónada, epidídimo, espermatozoides, prepuberal, criopreservantes.

## ABSTRACT

Cryopreservation or deep freezing consists in using temperatures below zero as a method to keep cells, tissues and organs alive and healthy. Previous research has shown that cryopreservation of germ cells in domestic animals is a type of reproductive biotechnology that allows the storage of valuable genetic material for future propagation, in order to be used in assisted reproduction for the preservation of species or storage of gametes with genes of interest. This mechanism is suitable combined with assisted reproduction programs such as artificial insemination, in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection, in order to perform genetic improvement to increase the production and quality of products.

With the purpose to evaluate sperm viability contained in the biological material, before and after cryopreservation, the development of the project was carried out with tissue fragments from the epididymis and the gonads of three pre-pubertal lambs (crossbreed Corriedale) at  $-196^{\circ}\text{C}$  with a cryoprotectant solution (DMSO + sucrose). Microscopic evaluation of sperm viability before and after deep freezing was carried out with trypan blue staining. There were no significant difference between the tissues used (epididymis and gonads) regarding viability. On the other hand, fresh pre-freezing tissues showed higher percentages of viability of sperm cells ( $> 80\%$ ). Therefore, although with the cryopreservation method used sperm viability decreased by 50%, the percentages obtained are comparable with previously reported work, and can be used for sperm preservation of this species. However, it is recommended to increase the number of specimen used to obtain more reliable conclusive results.

**Keywords:** cryopreservation, sheep, testis, gonad, epididymis, sperm, prepubertal, cryopreservant.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
1.1	Criopreservación.....	10
1.1.1.	Inconvenientes de la criopreservación.....	10
1.1.2.	Compuestos crioprotectores. ....	11
1.1.3.	Criopreservación del tejido testicular. ....	12
1.1.4.	Criopreservación de germoplasma animal masculino. ....	12
1.2.	Anatomía del testículo .....	13
1.3.	Biotecnología reproductiva.....	13
1.3.1.	Reproducción asistida.....	13
1.3.2.	Inseminación artificial. ....	14
1.3.3.	Fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). ....	14
<b>2.</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
2.1.	Obtención del material biológico .....	16
2.2.	Procesamiento del material biológico.....	16
2.3.	Congelación tisular .....	16
2.4.	Descongelación tisular.....	16
2.5.	Obtención de suspensión celular .....	17
2.6.	Evaluación microscópica de la viabilidad espermática .....	17
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>17</b>

3.1.	Evaluación de viabilidad de células espermáticas de diferentes tejidos testiculares (epidídimo, testis corte 1mm <sup>3</sup> y testis corte 0.5 mm <sup>3</sup> ).....	17
3.2.	Evaluación de viabilidad de células espermáticas pre y post-congelación ....	18
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>6.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>23</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXO A: TABLAS</b> .....	<b>29</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO B: FIGURAS</b> .....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Porcentajes de supervivencia de células espermáticas pre y post criopreservación.....	29
<b>Tabla 2.</b> Composición de medio de criopreservación.....	29



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Porcentaje de viabilidad de células espermáticas pre-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p&gt;0,05).....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células espermáticas post-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p&gt;0,05).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 3. Porcentaje de viabilidad general de células espermáticas pre y post-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p&lt; 0,05).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. Tinción con azul tripán de células espermáticas en suspensión celular de tejido testicular de borrego joven. ....</b>	<b>32</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

El almacenamiento de material biológico ha resultado adecuado para el desarrollo de diferentes campos de la ciencia, como la medicina, biología, biotecnología y la agricultura, entre otras. Estos procedimientos han permitido desde la creación de reservas de células, tejidos e incluso órganos para trasplantes, hasta obtener bancos de germoplasma destinados a la investigación, preservación y reproducción de especies (Day & Stacey, 2007). Es así que la biotecnología reproductiva junto con la criobiología han desarrollado técnicas para la conservación de material genético valioso de animales de interés, con el fin de aumentar su producción y a su vez, a partir del mejoramiento genético, obtener productos de calidad (Quinones, Ma, Zhang, Barnes & Podgoreanu, 2014).

### 1.1 Criopreservación

La criopreservación se fundamenta en emplear temperaturas bajas para la conservación de células, tejidos y otros elementos biológicos para mantener la viabilidad y funcionabilidad de los sistemas celulares por largos periodos de tiempo, a partir de disminuir el metabolismo celular (Portillo et al., 2006). La criopreservación puede ser realizada, tanto en células y tejidos, como en órganos completos, sin embargo, los resultados dependerán del tipo de material biológico y su habilidad para tolerar el estrés causado por cambios físicos y químicos a los que se someten durante el proceso, así como su rango de congelación y calentamiento (Maffei et al., 2013).

#### 1.1.1. Inconvenientes de la criopreservación.

Durante la criopreservación existen periodos críticos en los que las células, al ser sometidas a bajas temperaturas y luego descongeladas, experimentan variaciones físicas

y químicas dañinas como: la deshidratación, toxicidad del crioprotector, reorganización de macromoléculas en las membranas celulares y la formación extra e intracelular de cristales de hielo. Estas alteraciones bioquímicas causan daños oxidativos y osmóticos en las membranas, las proteínas e incluso el ADN de las células espermáticas, afectando el metabolismo celular (Portillo et al., 2006). Por tal motivo, los protocolos para la crioconservación han ido avanzando para reducir al máximo los efectos negativos mencionados, tal como el empleo de soluciones con crioprotectores.

### **1.1.2. Compuestos crioprotectores.**

Durante el proceso de criocongelación se generan variaciones extremas de las propiedades químicas, térmicas y eléctricas del material biológico causando alteraciones en las membranas celulares, organelos y en la interacción célula – célula (Portillo et al., 2006). Es así que es importante escoger el medio idóneo para criopreservar, el mismo que debe tener la composición más adecuada en base a los requerimientos del material biológico. En programas de medicina regenerativa, uno de los criopreservantes más empleados es el dimetilsulfóxido (DMSO), debido a que las tasas de viabilidad post congelación han expuesto un óptimo rendimiento (Pereira, González & Cavides, 2017). Para aumentar la eficiencia del procedimiento de preservación se ha empleado varios compuestos crioprotectores como el dimetilsulfóxido (DMSO) combinados con carbohidratos de bajo peso molecular como la sacarosa. El DMSO se caracteriza por su naturaleza neutra y de bajo peso molecular que le permite penetrar al interior de la célula y lograr su deshidratación, logrando la protección del citoplasma a partir de la inhibición de la formación de cristales de hielo, y además, la disminución de la concentración de soluto intracelular que promueve la reducción del daño tisular en el momento del enfriamiento (Liu & Pan, 2016). Por otro lado, la sacarosa ayuda a

disminuir la toxicidad, es soluble en agua y no posee la capacidad de penetrar la membrana celular por lo que actúa extrayendo el agua del interior de la célula a partir de la diferencia en las presiones osmóticas. Este compuesto para efectuar la protección del tejido tiene la ventaja de disminuir la concentración de los electrolitos, resultando en un estado de súper enfriamiento de la solución (Elnahas, Alcolak, Abu, & Elnahas, 2010).

### **1.1.3. Criopreservación del tejido testicular.**

La criopreservación del tejido testicular representa una manera de conservar la fertilidad de animales prepúberes y así mantener la viabilidad indefinida del material genético de sus células espermáticas (Goossens et al., 2008). Posterior a la criopreservación es posible la recuperación de los espermatozoides a fin de emplearlos en programas de reproducción asistida o para el rescate de gametos cuando el individuo muere inesperadamente. Asimismo, este método permite la preservación de especies en peligro de extinción a través del establecimiento de bancos de germoplasma con el fin de mantener la biodiversidad (Dalman, Sadat, Gooneh, & Totonchi, 2017).

### **1.1.4. Criopreservación de germoplasma animal masculino.**

La conservación del germoplasma animal masculino se refiere al almacenamiento de tejido testicular y semen. Dentro de la criobiología, la conservación de semen en frío ha sido una tecnología muy empleada en los sistemas agrícolas sostenibles y agropecuarios, influenciando directamente en la economía mundial. Es así que debido a la rapidez y eficiencia de las técnicas de criopreservación, estas resultan de interés para la conservación del material genético de animales domésticos o silvestres con alto valor genético o en peligro de extinción (Aponte, 2015).

## **1.2. Anatomía del testículo**

Los testículos son las gónadas masculinas que en base a su morfología se fraccionan para su estudio en una zona tubular y otra intertubular. Dentro de los testículos existen diversos grupos de células con varias funciones, tales como, células germinales, células de Sertoli y células de Leydig que están relacionadas con la generación de espermatozoides y hormonas. La zona tubular contiene los túbulos seminíferos y es donde las células madre espermatogoniales adaptan su estructura y función para la generación de espermatozoides. En la zona intertubular es donde se conservan las células esteroideogénicas (células de Leydig) que producen las hormonas andrógenas (Cruvinel & Machado, 2017). Los espermatozoides inmaduros salen de las gónadas y terminan su maduración y capacitación en el epidídimo, en donde se encuentran las reservas de espermatozoides viables en la mayoría de mamíferos (Vallecino, Camacho & Delgado, 2011).

## **1.3. Biotecnología reproductiva**

### **1.3.1. Reproducción asistida.**

La biotecnología en el campo de la reproducción animal se ha convertido en una herramienta provechosa en la optimización del potencial reproductivo y productivo de las especies. La gran ventaja es que promueve el mejoramiento genético, disminuye el riesgo de transmisión de enfermedades y aumenta la cantidad de crías obtenidas con genotipos y fenotipos de interés (Córdova, Ruiz, Campos, Córdova, & Córdova, 2011). Estas técnicas modernas han sido empleadas para recuperar la variabilidad genética que ha ido disminuyendo por aumento de la consanguinidad en las especies animales de producción debido al uso de pocas líneas genéticas en su reproducción. Asimismo, se ha intentado lograr su recuperación de las razas en peligro de extinción. En programas de mejoramiento genético la biotecnología reproductiva ha permitido, tener el control de

genes valiosos y transmitirlos a descendencia para aumentar la producción y calidad de productos de interés (Ugalde, 2014).

### **1.3.2. Inseminación artificial.**

Para programas de biotecnología reproductiva la calidad de los gametos empleados es un factor crucial, no obstante, hay ciertos parámetros que varían en base al método empleado. Una de las técnicas es la inseminación artificial (IA) en la que el semen es recolectado, procesado, almacenado y luego introducido manualmente en el tracto reproductor de la hembra (Foote, 2002). Este método se ha empleado para animales de granja como ganado vacuno, equino y ovino, y en otras especies como perros, cabras, ciervos y búfalos (Gibbons, Fernandez, Bruno, Spinelli & Cueto, 2009). La IA se ha considerado como un medio para mejoramiento genético en animales ya que unos pocos machos altamente seleccionados producen suficientes espermatozoides para inseminar a potenciales miles de hembras por año (Patel et al., 2017). Para aplicar la IA la criopreservación del semen resulta ideal. Las células espermáticas son mezcladas con lipoproteínas, azúcares y crioprotectores que protegen la integridad de las membranas durante la congelación y descongelación. Sin embargo, la eficiencia del proceso depende de mantener la motilidad de los espermatozoides para que estos sean capaces de llegar hasta el ovocito y fecundarlo. En ganado, el semen es almacenado en pajuelas en nitrógeno líquido que contienen típicamente 15 millones de espermatozoides móviles (Leboeuf, Restall & Salamon, 2000). En equinos la dosis empleada con semen criopreservado es de 400 a 800 millones de espermatozoides, no obstante, dicho valores dependen de la calidad del semen empleado (Angel & Bran, 2010).

### **1.3.3. Fecundación in vitro (FIV) e inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI).**

En especies animales de interés, la muerte súbita de ejemplares valiosos puede generar grandes pérdidas económicas. Para ello la IA no es un método efectivo, pues una vez muerto el individuo la recuperación de semen con altas concentraciones de espermatozoides móviles no es posible. Es aquí donde entra en juego la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI).

La FIV se refiere a la penetración directa de espermatozoides capacitados en ovocitos maduros, en condiciones de laboratorio. Para esta técnica las células espermáticas son capacitadas *in vitro* empleando los medios de cultivo necesarios y los ovocitos son extraídos ya maduros o pueden ser madurados *in vitro*. Luego del cocultivo, en el que se produce la interacción *in vitro* de los gametos, se realiza una evaluación de la eficiencia de la penetración espermática y el cultivo de los cigotos producidos que finalmente son transferidos a una hembra receptora que cumpla con las características fisiológicas necesarias para el desarrollo del embrión (Angel & Bran, 2010). El número de espermatozoides necesario para estas técnicas es relativamente bajo, en comparación con la IA. Es así que estudios realizados en porcinos reportaron haber empleado 100 microlitros (entre 1000 y 2000 espermatozoides) por ovocito y un tiempo de cocultivo de 2-4 horas (Ruiz, 2009).

La ICSI, se trata de una variación de la FIV tradicional. La técnica ha revolucionado la reproducción asistida ya que se realiza una micropipeta a través de un micromanipulador para llevar a cabo la microinyección del espermatozoide dentro del ovocito maduro para que se produzca un cigoto. La ventaja de esta variación es que requiere un número muy reducido de espermatozoides y no se necesita de espermatozoides con motilidad, lo cual mejora la tasa de fertilización (Bisioli, 2018). Esta última técnica es empleada en reproducción de animales con bajo conteo espermático o individuos que han fallecido inesperadamente, por lo que se recupera sus

células espermáticas del tejido del testículo o epidídimo. Es así que a partir de recuperar el germoplasma post-mortem posibilita la transmisión de características zoogenéticas de interés (Ruiz et al., 2013).

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Obtención del material biológico**

Se obtuvieron 6 testículos de 3 ovinos prepuberales (3-4 meses de edad) de mestizos de Corriedale, donado por una finca en la que se realizan castraciones rutinarias como manejo zootécnico. Los testículos fueron conservados a 4°C y transportados hasta el laboratorio de Biotecnología Animal de la USFQ.

### **2.2. Procesamiento del material biológico**

Los testículos fueron lavados con agua destilada. Se retiró la túnica albugínea y se cortó la cola del epidídimo. De la cola del epidídimo se obtuvieron fragmentos de tejido de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>. Las gónadas se diseccionaron transversalmente y se tomó tejido de la periferia del testículo, se obtuvieron fragmentos de dos tamaños (1cm<sup>3</sup> y 0,5 cm<sup>3</sup>, aproximadamente). Los trozos de tejido fueron embebidos en medio de cultivo con criopreservante (tabla 1) distribuidos en tres tubos falcon (un tubo por cada tipo de tejido).

### **2.3. Congelación tisular**

Los tejidos se ultracongelaron en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C durante un periodo de 3 semanas.

### **2.4. Descongelación tisular**

Para la descongelación los tejidos fueron sometidos a baño maría a 40 °C por 3 minutos. Para eliminar restos de la solución criopreservante se lavó los tejidos con medio de cultivo MEM durante 10 minutos y luego se descartó el líquido. Tal procedimiento se repitió 2 veces. Para el enjuague final se empleó 45 mL de medio MEM más 10 mL de



suero fetal bovino al 10%, la solución se repartió en diferentes tubos falcon para los distintos tejidos y se los mantuvo durante 10 minutos antes de su evaluación.

### **2.5. Obtención de suspensión celular**

Cada tipo de tejido (cortes epidídimo, cortes grandes testis y cortes pequeños testis) se colocó en una caja Petri diferente. Se agregó 0,5 mL de solución amortiguadora (PBS) a (4°C) y con un bisturí se maceró los tejidos. Finalmente, con una pipeta se recolectó el líquido de suspensión celular de cada tejido en viales de 1,5 mL.

### **2.6. Evaluación microscópica de la viabilidad espermática**

La evaluación de viabilidad espermática se llevó a cabo empleando tinción con azul tripán. Se empleó 10 µL de la suspensión celular de cada tejido y 10 µL del colorante. De la mezcla se colocó 10 µL en una placa portaobjetos y se observó al microscopio de contraste de fase con objetivo de 40x. Se contaron 100 espermatozoides por placa (entre vivos y muertos). Los espermatozoides considerados como vivos no presentaron pigmentación, mientras que los muertos presentaron una coloración azul oscuro de su cabeza.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Evaluación de viabilidad de células espermáticas de diferentes tejidos**

#### **testiculares (epidídimo, testis corte 1mm<sup>3</sup> y testis corte 0.5 mm<sup>3</sup>)**

La Tabla 1 expone los resultados de la evaluación de la supervivencia de espermatozoides a partir de cortes de tejidos pre-congelados y post-congelados a -196°C durante 3 semanas. En la figura #1 y figura #2 se puede observar que en los tejidos del epidídimo pre-congelación el porcentaje de viabilidad espermática fue de 87,2% y post-congelación de 40,9%. Para los tejidos de las gónadas, por un lado, los cortes 1cm<sup>3</sup> presentaron porcentaje pre-congelación de 88,9% y post-congelación de 30,2%. Por otro lado, para los cortes de 0,5cm<sup>3</sup> los porcentajes fueron de 90,3% y 30,6% pre y post-

congelación, respectivamente. No obstante, no existe diferencia en la supervivencia de las células espermáticas cuando se comparan los diferentes tejidos empleados (epidídimo, testis corte 1mm<sup>3</sup> y testis corte 0.5 mm<sup>3</sup>), por lo que con un 95% de confianza es posible aseverar que no existe diferencia estadística significativa en la supervivencia de células espermáticas obtenidas de los diferentes tejidos evaluados ( $p>0.05$ ), tanto antes como después de la congelación.

### **3.2. Evaluación de viabilidad de células espermáticas pre y post-congelación**

Por otro lado, en la figura #3 se observa que los espermatozoides pre-congelados expusieron una supervivencia superior (88,8%), mientras que en los tejidos post-congelados existió un descenso del porcentaje de la viabilidad de células espermáticas (38,4%). Con un 95% de confianza es posible determinar que existe diferencia significativa estadística en la supervivencia de espermatozoides al ser extraídos de tejidos pre o post-congelados y que esta viabilidad desciende después de la congelación ( $p<0,05$ ).

## **4. DISCUSIÓN**

El empleo de tejido del epidídimo y gonadal para la preservación de germoplasma masculino de ovinos prepuberales representa una técnica innovadora, eficiente y rápida. El microambiente tisular pueden actuar como un medio adecuado para la supervivencia de las células espermáticas luego de ser criopreservadas y así mantener la fertilidad (Adetunji et al., 2019). Por un lado, el epidídimo de los mamíferos desempeña varias funciones de transporte, capacitación y reserva de espermatozoides (Parra & del Sol, 2002). Durante el paso por el epidídimo los espermatozoides son capacitados para la fecundación y su motilidad funcional (Smithwick & Young, 1999). Varios estudios histoquímicos e inmunohistoquímicos exponen que dicha capacitación puede ser gracias

a la gran cantidad de proteínas, glicoproteínas y enzimas antioxidantes secretadas por el epidídimo (NagDas, Winfrey & Olson, 2000). Por otro lado, cada testículo en su interior fomenta la formación de espermatozoides en los túbulos seminíferos. Estos túbulos engloban a las células espermatogénicas, que se transforman en espermatozoides y a las células de Sertoli, encargadas de la espermatogénesis. Asimismo, en las gónadas se encuentran las células de Leydig encargadas de secretar testosterona (Harrison, 2009).

En el presente trabajo se reportó porcentajes de preservación post-congelación superiores al 30%, lo cual es comparable con porcentajes de espermatozoides vivos en semen comercial, posiblemente debido a la combinación de emplear tejidos junto con el empleo de DMSO como crioprotector penetrante y sacarosa como crioprotector no penetrante. El DMSO presenta una gran capacidad de penetración en tejidos por lo que ha sido ampliamente empleado en criocongelación de tejidos testiculares humanos ya que brinda protección a los túbulos seminíferos y al ADN (Pothana et al., 2015). La sacarosa se ha reportado desarrollar un gran efecto protector ya que actúa aumentando la osmolaridad dentro y fuera de las células, disminuyendo la cantidad de agua y evitando la acumulación de electrolitos; resultando en un ambiente apropiado para la criopreservación de los tejidos y las células contenidas en ellos (Volk et al., 2006). Sin embargo, cabe mencionar que el uso de otros compuesto crioprotectores podría variar los resultados obtenidos. Es así que trabajos reportados en semen comercial de ovinos han expuesto que emplear glicerol, combinado con fructosa, como criopreservante, fomenta una mejor calidad del semen con porcentajes de viabilidad superiores al 50%, frente a emplear etilenglicol y glucosa (Ruiz, Sandoval & Santiani, 2015). Por otro lado, trabajos reportados por Molinia et al., (1994) en semen de ovinos, por Naing et al., (2010) en semen de caprinos y por Garde et al., (2008) en semen de gacelas macho

reportan que no existe diferencia significativa al emplear fructosa o glucosa. No obstante, para semen de verracos, la fructosa si ha resultado dar efectos ligeramente más óptimos (Chanapiwat et al., 2012). Los mecanismos y la eficiencia del empleo de un crioprotector frente a otro no han sido del todo revelados, existen varios aspectos a considerar como la especie, el tipo de células y tejidos, al igual que el tiempo, velocidad y temperatura de congelación.

Para programas de reproducción asistida la viabilidad de los gametos masculinos es un parámetro relevante, no obstante, para obtener una óptima capacidad fecundante también es de importancia evaluar la integridad de la membrana y del acrosoma, luego de la criopreservación. Según se ha reportado en bovinos (Ribeiro-Peres, Munita-Barbosa, Yumi-Kanazawa, Mello-Martins, & Ferreira, 2014) dichos parámetros en el eyaculado son relativamente adecuados, ello debido a que el semen contiene espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, en donde se ha completado su maduración. Por otro lado, Fayomi et al. (2019) menciona que para espermatozoides obtenidos de tejido testicular es necesario una capacitación, ya que en dicho zona las células espermáticas se encuentran todavía inmaduras. Por lo tanto, se infiere que debido a que dichos parámetros no se analizaron en el presente trabajo, los resultados no mostraron otro tipo de diferencias funcionales entre las células espermáticas gonadales y del epidídimo.

Referente a la técnica de evaluación de la viabilidad celular se empleó el colorante azul tripán. Este es un colorante impermeable para la membrana de células vivas, por lo que las células muertas eran aquellas pigmentadas de azul, lo cual permitía distinguirlas. Este pigmento resulta adecuado para diferenciar entre células con disrupción de la membrana de aquellas viables con membranas sanas. Asimismo, se ha reportado el uso

de máquinas computarizadas y automatizadas para registrar la motilidad y la concentración de células espermáticas en centro de reproducción asistida. No obstante, dicha tecnología aun resulta costosa (Patel et al., 2017).

En cuanto al material de estudio, 3 individuos no resulta suficiente para obtener conclusiones estadísticas totalmente confiables. En un estudio realizado con epidídimos de bovinos hicieron uso de 22 ejemplares, obteniendo mayor cantidad de datos para llevar a cabo análisis estadísticos más completos y resultados más sólidos (Ribeiro et al., 2014). Asimismo, en otro estudio realizado con ratas de caña emplearon 20 especímenes, con los que los datos obtenidos reflejaron ser útiles para una selección más productiva de ratas macho de caña con fines de reproducción, así como una utilización más efectiva de los recursos de esperma. En adición, el estudio expuso datos que pueden ser de referencia sobre las reservas de esperma gonadal y extragonadal de dicha especie (Olukole, Oyeyemi & Oke, 2010).

## **5. CONCLUSIONES**

La criopreservación de espermatozoides en tejido del epidídimo y gonadal provee un microambiente adecuado, el mismo que se puede complementar con la combinación de crioprotectores, penetrantes y no penetrantes, para optimizar la eficiencia del procedimiento. Es inevitable que los porcentajes de viabilidad de espermatozoides sean afectados por la congelación, tal fue el caso de esta investigación, resultando en una disminución del 50% de la viabilidad. No obstante, valores similares han sido reportados para semen comercial de diferentes animales de granja, lo cual para términos del presente trabajo resulta adecuado.

Por otro lado, en términos de calidad espermática existen otros parámetros que se recomienda sean tomados en cuenta, tal como la motilidad, integridad estructural y funcionalidad la membrana plasmática y del acrosoma, función de la mitocondria y del ADN; para lograr resultados más precisos junto, con el empleo de un mayor número de ejemplares para el estudio.

## 6. REFERENCIAS

- Aponte, P. (2015). Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J Stem Cells*, 7(4), 669-80. doi: 10.4252/wjsc.v7.i4.669. PMID: 26029339
- Bisioli, C. (2018). ¿Cuál es la razón para hacer todo inyección intracitoplasmática de espermatozoides ICSI? *Revista peruana de Ginecología y Obstetricia*, 64(2), 231-237. doi.org/10.31403/rpgo.v64i2083
- Chanapiwat, P., Kaeoket, K., & Tummaruk, P. (2012). Cryopreservation of Boar Semen by Egg Yolk-Based Extenders Containing Lactose or Fructose is Better Than Sorbitol. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(3), 351–354. doi:10.1292/jvms.11-0273
- Córdova, A., Ruiz, C., Campos, V., Córdova, M., & Córdova, C. (2011). Biotecnología de reproducción animal con posibilidad de aplicación para optimizar el potencial reproductivo y productivo de los animales. Una revisión. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 5(2), 1-10.
- Cruvinel, D., & Machado, L. (2017). Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, 47(11). doi.org/10.1590/0103-8478cr20170135
- Dalman, A., Deheshkar Gooneh Farahani, N. S., Totonchi, M., Pirjani, R., Ebrahimi, B., & Rezazadeh Valojerdi, M. (2017). Slow freezing versus vitrification technique for human ovarian tissue cryopreservation: An evaluation of histological changes, WNT signaling pathway and apoptotic genes expression. *Cryobiology*, 79, 29–36. doi:10.1016/j.cryobiol.2017.09.007
- Day, J., & Stacey, G. (2007). Preface. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. (Segunda, p. 5). New Jersey: Humana Press.

- Elnahas, A., Alcolak, E., Marar, E. A., Elnahas, T., Elnahas, K., Palapelas, V., ... Al-Hasani, S. (2010). Vitrification of human oocytes and different development stages of embryos: An overview. *Middle East Fertility Society Journal*, *15*(1), 2–9. doi:10.1016/j.mefs.2010.03.013
- Fayomi, A. P., Peters, K., Sukhwani, M., Valli-Pulaski, H., Shetty, G., Meistrich, M. L., ... Orwig, K. E. (2019). Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6433), 1314–1319. doi:10.1126/science.aav2914
- Foote, R. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science*, *80* (2), 1-10. Obtenido el 26 de noviembre de 2019 de <http://www.zds-bonn.de/services/files/boarsemen2011/AI-History.pdf>
- Garde, J., del Olmo, A., Soler, A., Espeso, G., Gomendio, M., & Roldan, E. (2008). Effect of Egg Yolk on Cryopreservation of Rhesus Monkey Ejaculated and Epididymal Sperm. *Journal of Andrology*, *30*(3), 309–316. doi:10.2164/jandrol.108.006395
- Gibbons, A., Fernandez, J., Bruno, M., Spinelli, M., & Cueto, M. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, *16*(4), 803-809. doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019
- Harrison, R. G. (2009). The comparative anatomy of the blood-supply of the mammalian testis. *Proceedings of the Zoological Society of London*, *119*(2), 325–344. doi:10.1111/j.1096-3642.1949.tb00882.x
- Leboeuf, B., Restall, B., & Salamon, S. (2000). Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, *62*(1-3), 113–141. doi:10.1016/s0378-4320(00)00156-1



- Liu, D., & Pan, F. (2016). Advances in Cryopreservation of Organs. *Wuhan: Med Sci*, 36(2), 153-161. doi.org/10.1007/s11596-016-1559-x
- Maffei, S., Hanenberg, M., Pennarossa, G., Roberto V., Silva, J., Tiziana, A., Brevini, L., & Gandolfi, F. (2013). Direct comparative analysis of conventional and directional freezing for the cryopreservation of whole ovaries. *Fertility and Sterility*, 100(4), 1122-1131. doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.06.003
- Molinia, F. C., Evans, G., Quintana Casares, P. I., & Maxwell, W. M. C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 113–122. doi:10.1016/0378-4320(94)90058-2
- NagDas, S. K., Winfrey, V. P., & Olson, G. E. (2000). Identification of a Hamster Epididymal Region-Specific Secretory Glycoprotein That Binds Nonviable Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1428–1436. doi:10.1095/biolreprod63.5.1428
- Naing, S. W., Wahid, H., Mohd Azam, K., Rosnina, Y., Zuki, A. B., Kazhal, S., & San, M. M. (2010). Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 122(1-2), 23-28. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.06.006
- Olukole, S. G., Oyeyemi, M. O., & Oke, B. O. (2010). Gonadal and extragonadal sperm reserves of the domesticated adult African greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). *Reproductive Biology*, 10(2), 155–158. doi:10.1016/s1642-431x(12)60057-6
- Parra, R., & del Sol, M. (2002). ESTUDIOS HISTOLÓGICO E HISTOQUÍMICO DEL EPIDÍDIMO DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista chilena de*

*anatomía*, 20(3),269-274. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682002000300006>

- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25(4), 591–600.doi:10.1016/0093-691x(86)90143-3
- Patel, G., Haque, N., Madhavatar, M., Chaudhari, A., Patel, Dhaval., Bhalakiya, N., Jamnesha, N., Patel, P., & Kumar, R. (2017). Artificial insemination: A tool to improve livestock productivity. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 88(11), 307-313.
- Pereira, N., González, E., & Caviedes, P. (2017). Criopreservación de células estromales derivadas del tejido adiposo: viabilidad utilizando un medio definido libre de proteína animal. *Cirugía plástica ibero-latinoamericana*, 43(4), 381-386. Obtenido el 26 de noviembre de 2019 de <http://dx.doi.org/10.4321/s0376-78922017000500008>
- Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, G., Gómez, C., Lozano, J., & Reguero., M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291-300. Obtenido el 26 de noviembre de 2019 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf>
- Pothana, L., Makala, H., Devi, L., Varma, V. P., & Goel, S. (2015). Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology*, 83(4), 625–633.doi:10.1016/j.theriogenology.2014.10.028
- Quinones, Q. J., Ma, Q., Zhang, Z., Barnes, B. M., & Podgoreanu, M. V. (2014). Organ protective mechanisms common to extremes of physiology: a window through

- hibernation biology. *Integrative and comparative biology*, 54(3), 497–515.  
doi:10.1093/icb/icu047.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira de Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. doi:10.4067/s0301-732x2014000100005
- Ruiz, S. (2009). AVANCES EN FECUNDACIÓN *IN VITRO* EN LA ESPECIE PORCINA. *Fisiología Veterinaria*, 40(12), 231-240. Obtenido el 26 de noviembre de 2019 de [https://www.researchgate.net/publication/328334928\\_Avances\\_en\\_fecundacion\\_in\\_vitro\\_en\\_la\\_especie\\_porcina](https://www.researchgate.net/publication/328334928_Avances_en_fecundacion_in_vitro_en_la_especie_porcina)
- Ruiz, S., Romero, J., Astiz, S., Almela, L., & Poto, A. (2013). Application of Reproductive Biotechnology for the Recovery of Endangered Breeds: Birth of the First Calf of Murciana–Levantina Bovine Breed Derived by OPU, In vitro Production and Embryo Vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, 81-84. doi: 10.1111/rda.12179
- Smithwick, E., & Young, L. (1999). Immunohistochemical localization of epididymal secretory glycoprotein EP1 in the adult male chimpanzee. *Tissue and Cell*, 31(1), 54–65. doi:10.1054/tice.1998.0020
- Ugalde, R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1). Obtenido el 26 de noviembre de 2019 de <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193030122009.pdf>

Vallecino, A., Camacho, M., & Delgado, J. (2011). *Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación* (tesis doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

Volk, G. M., Harris, J. L., & Rotindo, K. E. (2006). Survival of mint shoot tips after exposure to cryoprotectant solution components. *Cryobiology*, 52(2), 305-308. doi: 10.1016/j.cryobiol.2005.11.003

## 7. ANEXO A: TABLAS

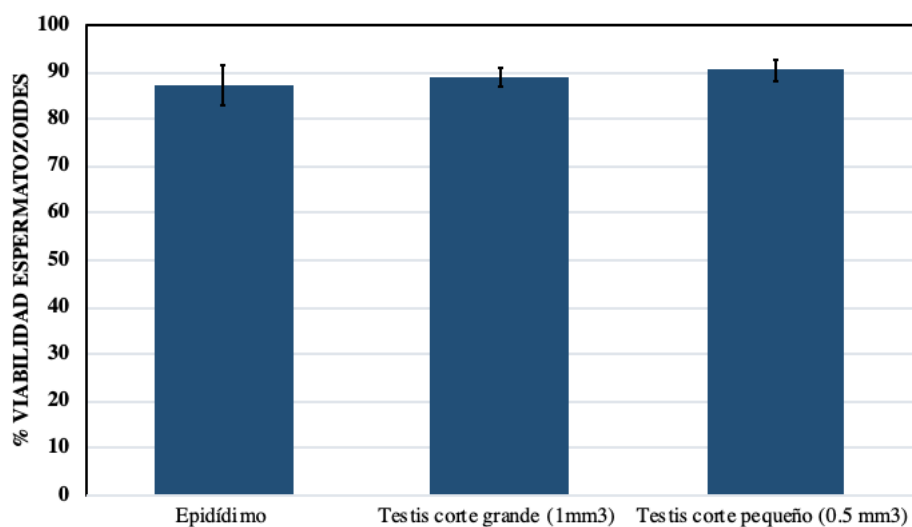
**Tabla 1.** Porcentajes de supervivencia de células espermáticas pre y post criopreservación.

<b>Tratamiento (tejido)</b>	<b>Pre congelación</b>	<b>Post congelación</b>
<b>Epidídimo</b>	87,23 %	40,90 %
<b>Testis corte 1cm<sup>3</sup></b>	88,89 %	30,16 %
<b>Testis corte 0.5 cm<sup>3</sup></b>	90,32 %	30,56 %

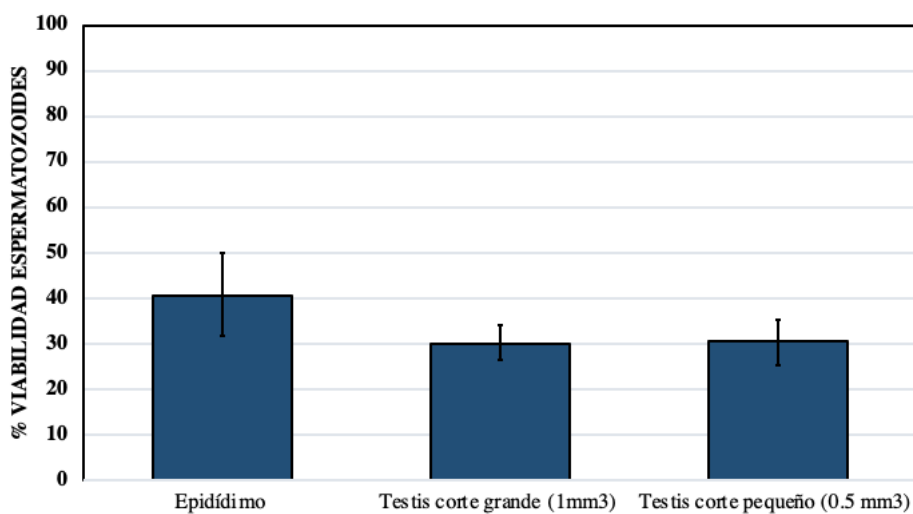
**Tabla 2.** Composición de medio de criopreservación.

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad</b>
FCS (suero fetal bovino)	10 mL
DMSO	10 mL
MEM 10X	30 mL
Sacarosa	240 mL

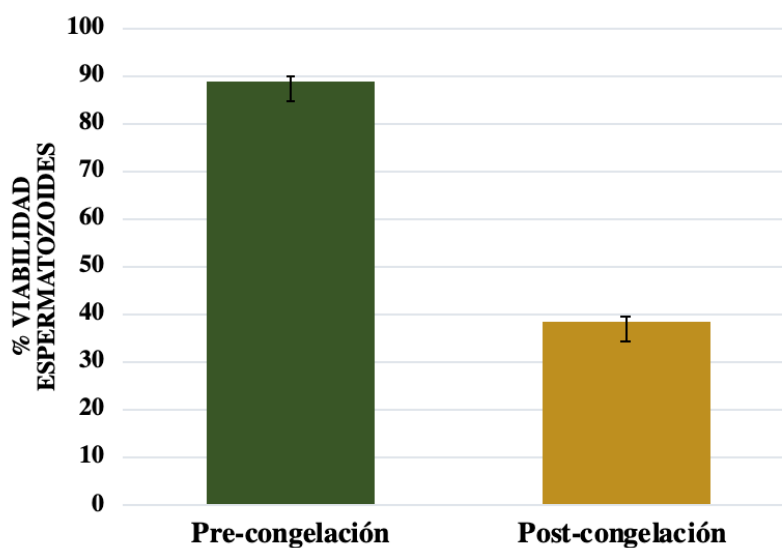
## 8. ANEXO B: FIGURAS



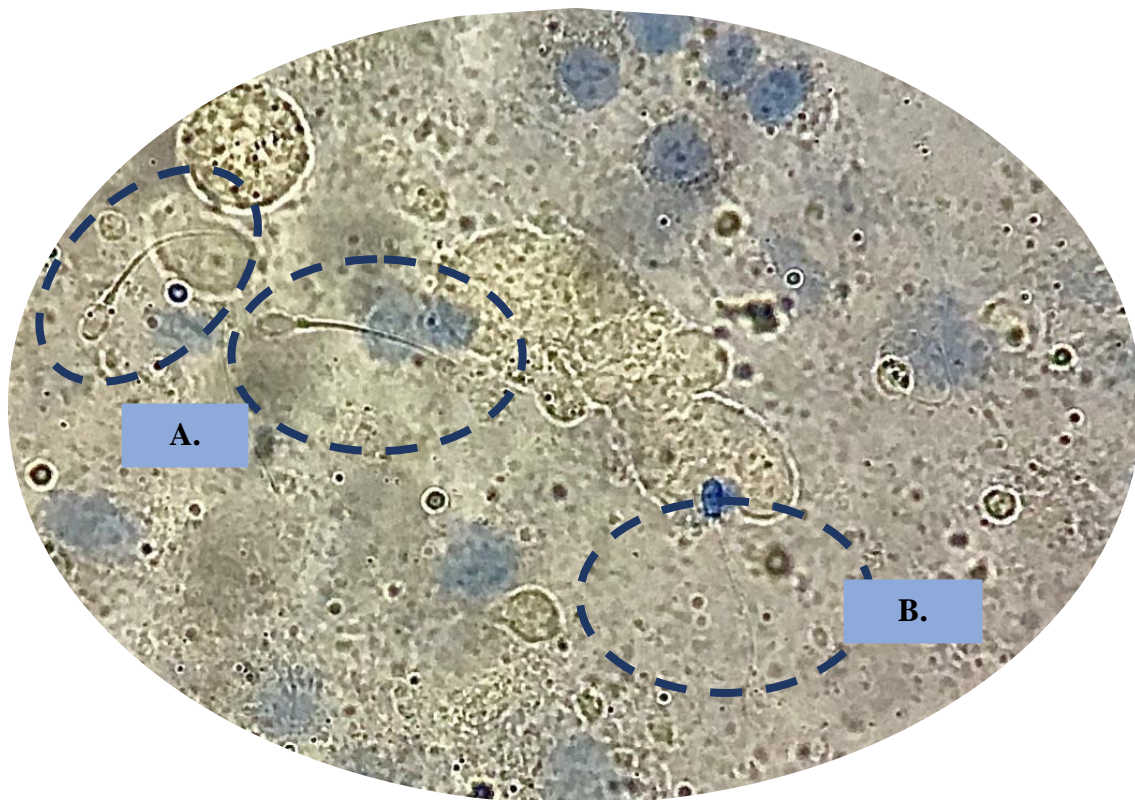
**Figura 1. Porcentaje de viabilidad de células espermáticas pre-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p>0,05).** Los porcentajes de espermatozoides vivos extraídos de tejidos pre-congelación reflejaron valores superiores al 80%. Cada barra expone el porcentaje de células espermáticas vivas halladas en cada tipo de tejido evaluado, obteniendo porcentajes de 87.2, 88.9 y 90,3% para epidídimo, corte grande testis y corte pequeño testis, respectivamente.



**Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células espermáticas post-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p>0,05).** Los porcentajes de espermatozoides vivos extraídos de tejidos pre-congelación reflejaron valores menores al 50%. Cada barra expone el porcentaje de células espermáticas vivas halladas en cada tipo de tejido evaluado, obteniendo porcentajes de 40.9, 30.2 y 30,6% para epidídimo, corte grande testis y corte pequeño testis, respectivamente.



**Figura 3. Porcentaje de viabilidad general de células espermáticas extraídas de tejidos testiculares, pre y post-congelación en nitrógeno líquido (-196°C) (n=3, p<0,05).** Las barras representan los porcentajes general de espermatozoides vivos encontrados en los tejidos, tanto del epidídimo como de la testis. Para el tratamiento pre-congelación 88.81% y post-congelación 38.44%.



**Figura 4. Tinción con azul tripán de células espermáticas en suspensión celular de tejido testicular de borrego joven. A. Espermatozoides vivos con membrana íntegra. B. espermatozoide muerto (cabeza azul) con membrana dañada, observados con un objetivo 40x.**