

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y ambientales

**Descelularización de testículos bovinos para proliferación de
células madre espermatozonales**

Valery Pamela Trujillo Benítez

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Biotecnóloga

Quito, 22 de diciembre de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Descelularización de testículos bovinos para proliferación de células madre
espermatogoniales**

Valery Pamela Trujillo Benítez

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte, MV, PhD

Quito, 22 de diciembre de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Valery Pamela Trujillo Benítez

Código: 00205653

Cédula de identidad: 0605091487

Lugar y fecha: Quito, 22 de diciembre de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

RESUMEN

La medicina regenerativa ha alcanzado popularidad en los últimos años por los avances tecnológicos, de esta manera el cultivo in vitro 3D de células madre busca recuperar tejidos afectados, especies en peligro de extinción y buscar soluciones a diferentes enfermedades. Las células madre germinales se autorrenovan a lo largo de la vida y contribuyen a la transmisión de información genética a la descendencia, pero en este caso son esenciales para mantener la espermatogénesis. El objetivo de esta investigación fue descelularizar un testículo bovino y proliferar células madre sobre el mismo, teniendo como resultado el crecimiento en la parte superior del biomaterial después de 7 días de cultivo, demostrando que los andamios son un lugar propicio para la proliferación de las células madre.

Palabras clave: células madre, descelularizar, testículo bovino, biomaterial, cultivo, proliferación.

ABSTRACT

Regenerative medicine has gained popularity in recent years due to technological advances, in this way the in vitro 3D culture of stem cells seeks to recover affected tissues, and endangered species and find solutions to different diseases. Spermatogonial stem cells are self-renewing throughout life and transmit genetic information to offspring, but in this case they are essential to maintain spermatogenesis. This research aimed was to decellularize a bovine testis and proliferate stem cells on it, resulting in growth on top of the biomaterial after seven days of culture, demonstrating that scaffolds are a propitious site for stem cell proliferation.

Keywords: stem cells, decellularize, bovine testis, biomaterial, culture, proliferation.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	11
Métodos	15
Resultados.....	18
Discusión	20
Conclusiones.....	24
Tablas.....	25
Figuras	26
Referencias bibliográficas.....	30
Anexos	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis estadístico de los tratamientos de los biomateriales.....	25
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Influencia de los tratamientos en el biomaterial.....	26
Figura 2. Influencia de los tratamientos en la descelularización observada por microscopía electrónica.....	27
Figura 3. Box plot del tamaño de los poros de los 4 tratamientos después de 25 mediciones aleatorias.....	28
Figura 4. Cultivo celular con corte histológico después de 7 días.....	29

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Preparación enzimática para cultivo celular	34
Anexo 2: Preparación del medio MEM 1X	34
Anexo 3: crecimiento de colonias (café) sobre pocillos después de 3 días	35

INTRODUCCIÓN

La medicina regenerativa aplica conocimientos básicos de cómo las células madre son utilizadas para la reparación de varios órganos, en los animales se presentan células madre con funciones de autorrenovación, pluripotencia y con capacidad para diferenciación ayudando a la funcionalidad de los órganos.

Las células madre que se encuentran en el origen de la espermatogénesis se llaman células madre espermatogoniales (SSC), estas residen en la parte basal del epitelio seminífero, son las únicas células que se autorrenuevan a lo largo de la vida y transmiten información genética a la descendencia (De Rooij, 2009). Son células individuales morfológicamente indiferenciadas que no están conectadas por puentes intercelulares como las células germinales avanzadas (Kubota & Brinster, 2018). Las células madre espermatogoniales (CME) son una población de células madre adultas de los testículos y sus actividades biológicas proporcionan una alta productividad de espermatogénesis, estas células surgen después del nacimiento y persisten durante toda la vida (Komeya & Ogawa, 2015).

Las células madre espermatogoniales (CME) cumplen varias funciones fundamentales en la espermatogénesis, luego de que se han comprometido a la diferenciación progresan de manera estricta y ordenada hasta formar espermatozoides en los tubos seminíferos. En segundo lugar, las células madre espermatogoniales sustentan la espermatogénesis durante toda la vida, debido a que se mantienen en autorrenovación. Por último, la interrupción de la espermatogénesis, sea por situaciones patológicas o estacionales se puede restaurar con la ayuda de SSC y también se busca mantener la integridad del ADN para que se transmitan de manera efectiva a la descendencia (Komeya & Ogawa, 2015).

Las células madre espermatogoniales (CME) mantienen la espermatogénesis a lo largo de la vida y se diferencian para producir espermatogonias Apareadas, Alineadas, A1-A4 y espermatogonias tipo B, a través de varios pasos que amplifican el número de células germinales en el compartimiento basal del túbulo seminífero. Las espermatogonias tipo B, se diferencian hacia células tetraploides que ingresan al proceso de la meiosis para generar finalmente células haploides (espermátidas) que se transformarán en espermatozoides, repitiendo este paso cada día a lo largo de la vida adulta (Oatley J. , 2010), ayudando a la fertilidad masculina y son las únicas células madre adultas que pueden pasar su genotipo a las siguientes generaciones (Ibtisham, Hazmi, & Hanaramooz, 2020).

En los testículos de bovinos, las células madre espermatogoniales (CME) residen en microambientes especializados llamados nichos, los cuales proporcionan los estímulos extrínsecos para la autorrenovación y la diferenciación a través de un soporte citoarquitectónico y estimulación con factores de crecimiento. Los nichos de las células están formados por contribuciones de células de soporte circundantes. En los testículos, las células de Sertoli son el principal contribuyente para el nicho de SSC, pero también es probable que contribuyan otras células somáticas testiculares, incluyendo mioides peritubulares y células de Leydig (Oatley & Brinster, 2008).

Las células de Sertoli, producen factores de crecimiento necesarios para la autorrenovación, como son el factor neurotrófico de la línea de células gliales (GDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básicos(FGFb), la membrana basal y las integrinas proporcionan anclajes, los estímulos de la red vascular y las células intersticiales son cruciales para la localización de la espermatogonias indiferenciadas a lo largo de la membrana basal. Las señales extrínsecas modulan las señales intrínsecas de SSC, como son las quinasas,

segundos mensajeros y factores de transcripción para la mantener la homeostasis (Kostereva & Hofmann, 2008) .

Las paredes peritubulares representan estructuras de revestimiento lamelares que envuelven a los túbulos seminíferos como un sistema de vendaje de capas de matriz extracelular, alternando con monocapa de células musculares lisas lamelares, conjuntamente contienen actina de músculo liso, cadenas ligeras de miosina, tropomiosina, proteínas de filamento tamaño intermedio desmina, filamina, talina y proteína SM22 alfa, proteínas de armadillo (Domke & Franke, 2019).

Se ha encontrado que los principales componentes moleculares y ultraestructurales en los túbulos seminíferos maduros de los testículos no contienen citoqueratina, sino solamente filamentos de tamaño intermedio de vimentina, tampoco contiene desmosomas o estructuras similares, ni proteínas o glicoproteínas marcadoras específicas de desmosomas (Domke & Franke, 2019). Incluso se ha encontrado que las células germinales tienen conexiones dentro de los túbulos seminíferos, basadas en N-cadherina de tipo AJ, mientras que las células de Sertoli tienen uniones cribiformes, caracterizadas por grupos de canales de citoplasma el citoplasma de 5 a 7 mm de ancho conectadas por cortos de tipo TJ o AJ (Domke & Franke, 2019).

La membrana basal de los túbulos seminíferos (STB) es una estructura extracelular delgada en forma de lámina, sus sustratos proporcionan señales para la diferenciación, mantenimiento y remodelación de tejidos, es decir, una característica definitoria del nicho celular. El componente predominante es el colágeno tipo IV, que puede ser de composición alfa 3 y 4, y está presente en la lámina 121, pero también se encuentra perlecan . Los colágenos intersticiales como el tipo I, III, y IV se encuentran en el espacio peritubular, pero no forma parte de la membrana basal (Glattauer et al., 2007). Es una red compleja de moléculas de triple

hélice, que funcionan como andamio y dan resistencia a la tracción de los tejidos epiteliales de crecimiento y están unidas a integrinas (Cummings et al., 2016).

Para estudiar la biología de células madre espermatogoniales y comprender los factores de la fertilidad masculina se utilizan técnicas como cultivo in vitro. Este sistema es elegido para establecer la espermatogénesis y proporcionar la situación adecuada para comunicación entre células somáticas, germinales y matriz extracelular, con un ambiente similar al de los túbulos seminíferos de los testículos (Majadi, Movahedin, & Mazaheri, 2019). Por lo tanto, en el presente trabajo se propone descelularizar testículos bovinos para la proliferación de células madre espermatogoniales.

MÉTODOS

Descelularización del testículo de bovino

Los testículos se obtuvieron del camal de Quito (Empresa Metropolitana del Rastro), se realizó una correcta limpieza y se colocaron en fundas a -20°C por un mes, se realizaron 3 cortes circulares en forma de discos de 1cm de grosor, y de cada disco cortado se sacaron discos pequeños de 1 cm de grosor con un sacabocado y se colocaron en tubos Falcon de 50 ml.

Para el tratamiento 1 de descelularización los discos se colocaron en un vaso de precipitación con 100 ml de etanol al 96% por 24 horas, se realizaron 2 lavados con agua destilada de 15 minutos cada uno, todo en agitación constante. En cuanto al tratamiento 2, los discos se colocaron en un vaso de precipitación y se lavaron con agua destilada por 15 minutos 2 veces. Posteriormente se colocaron en etanol al 96% por 4 horas, todo en agitación constante.

En el caso del tratamiento 3, los discos se colocaron en un vaso de precipitación y se lavaron en PBS por 15 minutos 2 veces, luego se sumergieron en Tritón X al 1% por 4 horas, posteriormente se sumergieron en SDS al 1% por 24 horas y finalmente se realizaron 2 lavados en PBS por 15 minutos, todo esto en agitación constante. Finalmente, para el tratamiento 4, se utilizó un testículo de toro fue cortado de manera longitudinal y congelado a -20°C con etanol al 96% por 3 semanas, luego se cortaron 9 discos pequeños de 1cm de grosor y se colocaron en un vaso de precipitación. Se realizaron 2 lavados con PBS por 15 minutos, se sumergieron en Tritón X al 1% por 4 horas, se colocaron en SDS al 1% por 24 horas, se realizaron 2 lavados con PBS por 15 minutos, todo esto en agitación. Finalmente se distribuyeron en una placa con pocillos y se liofilizaron por 24 horas. Todos los discos de los tratamientos fueron colocados en una placa con pocillos y se liofilizaron por 24 horas.

Microscopía electrónica

Se utilizó un microscopio de barrido electrónico, el cuál usa electrones para formar una imagen. Se tomó un disco de cada biomaterial y se cortaron para obtener su cara externa e interna, se posicionaron sobre una platina con cinta doble faz y se colocó dentro de una cámara de vacío, el detector ayuda a reconstruir la imagen cuando los electrones inciden sobre la muestra visualizando así la cara externa e interna del biomaterial.

Histología

Los discos testiculares descelularizados se incluyeron en parafina, para ello se deshidrataron con etanol de 75 %, 96%, 100%, se realizaron 2 lavados con xilol y se colocaron en parafina con xilol en una concentración de 1:1 y 2:1. Y luego solo en parafina pura y se armaron los bloques en moldes metálicos. Se cortaron las muestras en secciones de 5 μ m con un micrótopo Leica y se colocaron los cortes en placas previamente cubiertas con polilisina. Para la tinción con Hematoxilina de Harris, se prepararon las muestras con 3 lavados con Xilol, y posteriormente con etanol a concentraciones de 100% a 70%. Se lavaron las muestras con agua destilada y se tiñeron con Hematoxilina de Harris. Para el montaje, las placas se colocaron en etanol en concentración de 70% a 100%, se realizaron 3 pasos por xilol, y finalmente se colocó un medio de montaje para conservación y se cubrieron con un cubreobjetos. Se visualizó en el microscopio con un lente de aumento de 10X, para un aumento total de 100X.

Cultivo celular

Previamente a su uso en el cultivo celular, el biomaterial descelularizado es esterilizado con PBS y etanol, mientras que el material utilizado para la obtención de las células corresponde a un testículo de ovino de 6 meses de edad. Este testículo fue lavado con agua corriente y material de disección estéril se retira la túnica vaginal del testículo. Luego de ello se realiza otro lavado en agua corriente para retirar el exceso de sangre, y se realiza un corte para hasta obtener un segmento del testículo con un peso de aproximadamente 20g, el mismo

que se vuelve a cortar en 2 partes (10g) y se coloca en cajas Petri estériles dentro de la cámara de flujo laminar. También se debe colocar una muestra del testículo en etanol al 95% para realizar un control histológico del material.

Se coloca 50 ml MEM + 100 μ l DNase, en un tubo Falcon de 50ml, y de este se tomaron 12,5 ml y se colocaron en cada una de las cajas Petri con el biomaterial. Con la ayuda de un bisturí y una pinza estéril se retira la túnica albugínea, después se retira el tejido conectivo raspando el biomaterial hasta lograr que se fraccione el mismo. Colocar el material de cada caja Petri en un tubo Falcon de 50 ml y se añade 12,5 ml del mix enzimático I (Anexo 1). Se cerraron los tubos y se colocó Parafilm sobre la tapa, se sumergieron en agua a 37°C en agitación constante por 60 minutos. Cuando se terminó se centrifugó por 3 min a 300 rpm, posterior a ello se retiró el sobrenadante del tubo y se coloca 12.5ml de MEM + DNase y 12.5 ml del mix enzimático II (Anexo 1). Luego de ello se cerró el tubo y se colocó parafina para ponerlo de nuevo en el baño de agua a 37°C y en agitación constante por 45 minutos, al finalizar este paso se centrifuga por 2 min a 400 rpm y se pasa el sobrenadante por filtros de Nylon de 40 y 100 μ m, y el remanente se centrifuga por 5 min a 900rpm. Se saca el sobrenadante para solo colocar el pellet en un tubo Falcon de 50ml. En otro tubo se coloca 45 ml de MEM, 5 ml FCS y 20 μ l de Fungizona (Antofericina B). Para sembrar se coloca el biomaterial en la caja de cultivo con 400 μ L del medio MEM+FCS+fungizona y 50 μ L de las células, en 3 pocillos se colocó 500 μ l de MEM + FCS + fungizona + 50 μ L de células pero sin biomaterial. A los 3 días se cambia el medio de cultivo y se coloca en un tubo Falcon 2 ml de Suero Fetal Bovino, 18 ml de MEM y 20 μ L de Fungizona, se aspira y elimina el medio de los pocillos y se coloca 500 μ L del nuevo medio. Luego de 7 y 10 días se realizó un lavado de cada pocillo de la placa de cultivo con PBS 1X, y después de ello se fijaron las células con etanol al 95%. Finalmente las biomateriales (testículos descelularizados) con células se incluyeron en parafina y se realiza una tinción con hematoxilina de Harris para su observación.

RESULTADOS

Influencia de los tratamientos de descelularización en el biomaterial

Se presentó 4 distintos tratamientos para la descelularización del biomaterial, como se observa en la fig. 1 los tratamientos presentaron diferentes resultados en el biomaterial, en la fig. 1.A, perteneciente al tratamiento 1, los poros no son muy grandes y aún se puede ver el contenido de células, mientras que en la fig. 1.B presenta poros más grandes con menos cantidad de células por ello se los evidencia mejor. Por otro lado en la fig. 1.C no se observan células solo poros muy grandes lo que nos indica un mejor proceso de descelularización, por último, en la fig. 1.D se ven poros más pequeños y continuos ausencia de células casi completa. Para medir el diámetro de los poros se tomó imágenes de las placas al azar y se midió cada uno de ellos con el programa ImageJ con la ayuda de una gráticula calibrada previamente, los resultados de los tamaños de los poros se encuentran la tabla 1, donde se observa que el promedio de los poros para el primer tratamiento es de 266,44 μm , del tratamiento 2 es de 284,85 μm , del tratamiento 3 es de 456,14 μm , considerando a éste como el mejor, por el tamaño de poros y menor cantidad de células presentes, y el tratamiento 4 tiene un promedio de 193,23 μm , siendo el menos efectivo entre los demás. En cuanto vemos la desviación estándar en la misma tabla, se ve en la misma que los datos se encuentran bastantes dispersos de la media.

Cuando se observa el Box plot de la fig. 3, se ve que se tiene datos atípicos para el tratamiento 1 y 4, mientras que la media y los cuartiles del tratamiento 3 son superiores a los otros tratamientos, lo que comprueba que el tratamiento 3, sufrió un mejor proceso de descelularización.

En cuanto a la observación con el microscopio de barrido electrónico, se observa que la densidad celular de la fig. 2.A y fig. 2.B, correspondientes al tratamiento 1 y 2

respectivamente es mayor, debido a eso no se observan las fibras ni estructura testicular correctamente, sino solo se tiene una visión general del tejido. En la fig. 2.C, correspondiente al tratamiento 3 se observan varios poros y no mucho tejido, entre los poros se pueden encontrar fibras que es lo que nos indica un proceso de descelularización que sería perteneciente a la matriz extracelular del tejido, incluso la densidad celular es menor lo que permite mejor visualización. Por último, se observa que la fig. 2.D, correspondiente al tratamiento 4 el tejido se encuentra amontonado en grandes cantidades en el extremo superior derecho de la imagen se puede observar que no existen poros por la gran cantidad de densidad celular, lo que no permitió la difracción de los electrones y se observaron pocos poros.

Cultivo celular

Las células sembradas en cada uno de los pocillos son aproximada 690 000 células/pocillo, estas incluyen células germinales y somáticas. A los 3 días en los cultivos control sin biomaterial se visualiza el crecimiento de ciertas colonias de células germinales (Anexo 3), son aquellas colonias que muestran una coloración café, luego se realizó el cambio de medio, y a los 7 y 10 días se fijó el biomaterial con etanol.

Por medio de inclusión en parafina y de cortes histológicos se observa que existe crecimiento de las células en la parte superior del biomaterial tal y cual se ve en la fig. 4. Estas células no ingresaron completamente al biomaterial, por lo que los poros se observan en su mayoría vacíos. Con tinción de Hematoxilina de Harris se logra observar que las células que se colorean de azul son células que han crecido. Por lo que al tener colonias de células se puede decir que por lo menos se necesitó una célula madre para que dar inicio al crecimiento celular de las colonias. Sin embargo, no se logra con la tinción diferenciar qué células son germinales o somáticas, por lo que se necesitarían marcadores moleculares para diferenciarlas.

DISCUSIÓN

La descelularización se obtiene a través del uso de agentes químicos que destruyen por diferentes mecanismos las células del órgano, en este caso el testículo, dejando solo la matriz extracelular que será la que brindará soporte (Nari et al., 2013). Los resultados obtenidos nos muestran diferencias significativas entre los 4 tratamientos, como se observa en la tabla 1, el promedio del tamaño de los poros es mayor para el tratamiento 3 (456.14 μm), sin embargo, esta muestra una desviación estándar de 286.04 μm , lo que nos indica la dispersión de los datos tomados de la medición de los poros del tratamiento 3. Esta gran variación se da debido a que los poros son de tamaños muy diversos teniendo en cuenta que algunos discos del biomaterial sufrieron un proceso de mayor descelularización.

Al observar la fig. 3, se ve que los tratamientos 1 y 4 presentan valores atípicos, es decir, valores muy diferentes a las observaciones del mismo grupo de datos (Minitab, 2021) y como se menciona anteriormente esto se da a la diferencia de los poros de los discos de biomaterial. Mientras que el tratamiento 3 presenta una mediana de 400, la distribución de los datos es simétrica por lo que la media, mediana y moda coinciden, y los valores de los cuartiles son mayores a la de los otros tratamientos, lo que nos indica un tamaño mayor de los poros de este tratamiento. Para el tratamiento 2, la mediana es el segundo valor más alto después del tercer tratamiento y sus cuartiles nos indican que los tamaños de los poros también son mejores que los otros tratamientos. Esto se corrobora con la Tabla 1 debido a que nos indica que el promedio del tratamiento 2 es el segundo mejor.

Cuando se compara los tratamientos la diferencia del tratamiento 3 de los demás es que no tuvo contacto el biomaterial con etanol en todo el proceso, simplemente usó detergentes iónicos como el SDS y no iónicos como Tritón 100X. Los detergentes son los medios químicos más utilizados debido a que son más baratos, rápidos y eficientes. Los más comunes son los

mencionados anteriormente. El Tritón 100X elimina el contenido celular interrumpiendo las interacciones entre los lípidos y entre las proteínas y lípidos sin afectar las interacciones proteína-proteína (Moffat, Ye, & Jin, 2022). Mientras que el dodecil sulfato de sodio (SDS) desnaturaliza la estructura de las proteínas secundarias y terciarias (Canvax Biotech, 2022).

Por lo expuesto anteriormente se considera que el uso de detergentes contribuyó de manera significativa al tratamiento 3, mejorando el tamaño de los poros. En el estudio presentado por White y colaboradores los resultados con microscopía electrónica de barrido mostraron diferencias morfológicas y estructurales entre los biomateriales, el que fue tratado con el biomaterial con SDS y Tritón X-100 muestran que se retuvo una red intrincada de fibras, como se ve en la figura 2.C (2017). Muchas variables se deben tener consideración así como la congelación y descongelación, la densidad celular, el grosor del biomaterial, la morfología también puede afectar al grado de descelularización y las propiedades físicas de la matriz extracelular (Keane et al., 2015). El ciclo de congelación-descongelación se realiza por la fluctuación entre la temperatura de congelación y la temperatura biológica, alterando las membranas celulares y la lisis celular por la formación de cristales intracelulares, se ha demostrado que este método mantiene considerable la estructura de la matriz extracelular pero no elimina desechos celulares de manera efectiva (Neishabouri et al., 2022).

En cuanto a los tratamientos en los que se incorporó alcohol durante el proceso de descelularización se obtuvo células que no fueron eliminadas, se debe tener en cuenta que el alcohol, especialmente el etanol, se utiliza como un fijador y preserva bien algunas proteínas, causan deshidratación en el tejido, mientras fijan y se podría usar como un conservante de las muestras (Megías, 2022), para el tratamiento 1 se tuvo por 24 horas en etanol el biomaterial y en el tratamiento 4 se tuvo por un mes se ve que los poros son más pequeños en cuanto al promedio, mientras que el tratamiento 3 solo estuvo 4 horas y su promedio del tamaño es mayor, lo que nos indica que mientras menos tiempo se encuentren en contacto con etanol

mejor se desarrolla el proceso de descelularización. Por ello, los alcoholes cumplen un mejor uso en la desinfección y esterilización de las matrices extracelulares de los biomateriales (Neishabouri et al., 2022).

La variabilidad en la especie de los donantes, la edad de los donantes y las condiciones de salud podrían interferir en los diferentes estudios (Voga, Adamic, Vengust, & Majdic, 2020). En histología, la tinción es el método más utilizado para identificar regiones, recuentos u otras características estructurales de las células (Ferrara, 2021). Con la ayuda de la tinción de hematoxilina de Harris es una tinción nuclear especialmente es diseñada para teñir los núcleos, al no tener mercurio se acidifica para dar una solución de hematoxilina bien oxidada que proporciona un excelente detalle y diferenciación, nuclear, así como tiñe la membrana nuclear, el nucleoplasma y el nucléolo (CellPath, 2022).

Las células de mamífero crecen *in vitro* en entornos tridimensionales complejos. La forma y la composición química de la matriz extracelular que rodea a la célula puede ocasionar varias respuestas fisiológicas (MERCK, 2016). Para los biomateriales descelularizados, la distribución de los poros, así como el área de superficie expuesta y la porosidad son parte importante, así como la cantidad y distribución influyen en la penetración y la velocidad de las células dentro del andamio (Carletti, Motta, & Migliaresi, 2010).

Las células que se encontraron durante el cultivo celular colonizaron la parte superior del biomaterial donde fueron sembradas desde un inicio, debido a que las células en material poroso se pueden encontrar en la superficie y en el interior mientras que nuestro cultivo control sin biomaterial (cultivo 2D) están unidas directamente al fondo del pocillo. Las proteínas que son sintetizadas por las células se absorben en la superficie del material y facilitan la adhesión celular, a través de esta las células interactúan con el sustrato, por lo que las propiedades del biomaterial pueden influir en el comportamiento y la morfología celular (Campuzano & Pelling, 2019).

Para que el crecimiento celular tenga origen tuvo que existir por lo menos una célula madre, ya que estas son las que generan las demás células con funciones especializadas bajo condiciones adecuadas, es decir, las células madre se dividen para formar más células llamadas células hijas. Nuestras células se adhirieron sobre el soporte sólido constituido por el biomaterial del tratamiento 3, cuando se establecen en el cultivo aumentan el número aquellas que tienen mayor tasa de crecimiento y se detienen el mismo cuando alcanza la confluencia, es decir expresan sus aspectos característicos, son más parecidas a su estado original (EHU, n.d.). Por lo tanto el cultivo celular tuvo éxito y las células se acoplaron de la mejor manera al biomaterial, sin embargo, para diferenciar los tipos celulares que colonizaron se deberían usar marcadores moleculares como ZBTB16, que tiñe a las SSC de los túbulos seminíferos (Hermann, Phillips, & Orwig, 2011) así como marcadores generales de células germinales y somáticas testiculares.

CONCLUSIONES

Las células madre se autorrenovan a lo largo de toda la vida y transmiten información genética a la descendencia, a lo largo de este proyecto se revisaron varios tratamientos de descelularización, donde se ve que el usar detergentes ionizantes y no ionizantes genera poros (luz intratubular) de mayores dimensiones y por ende un mejor proceso de descelularización. Al usar etanol las muestras se preservan y las proteínas de adhesión celular y las mismas células se fijan al biomaterial lo que hace difícil su remoción. El cultivo celular fue exitoso, ya que las células colonizaron la parte superior del biomaterial, encontrando los nutrientes necesarios para proliferar y de igual manera algunas de las células ingresaron al biomaterial por los poros. Estas no fueron en gran cantidad por lo que se recomienda buscar una manera que las células sean colocadas dentro de los poros en las partes profundas del biomaterial y no sobre este último. La tinción de hematoxilina de Harris ayudó a encontrar las células en el corte histológico del biomaterial, tiñendo los núcleos de células germinales y somáticas de forma general. Por último, el cultivo 3D, ayudará a la conservación de varias especies que están en peligro de extinción y mejorará los estudios en el campo de la medicina regenerativa.

TABLAS

Tabla 1. Análisis estadístico de los tratamientos de los biomateriales

Tratamiento	Promedio	Desviación Estándar
1	266.44 μm	117.28
2	284.85 μm	87.33
3	456.14 μm	286.04
4	193.23 μm	67.45

Descripción de la Tabla: Los promedios y desviaciones estándar de cada una de las mediciones de los poros de un total de mediciones de 25 poros por cada tratamiento obtenidas por el programa ImageJ.

FIGURAS

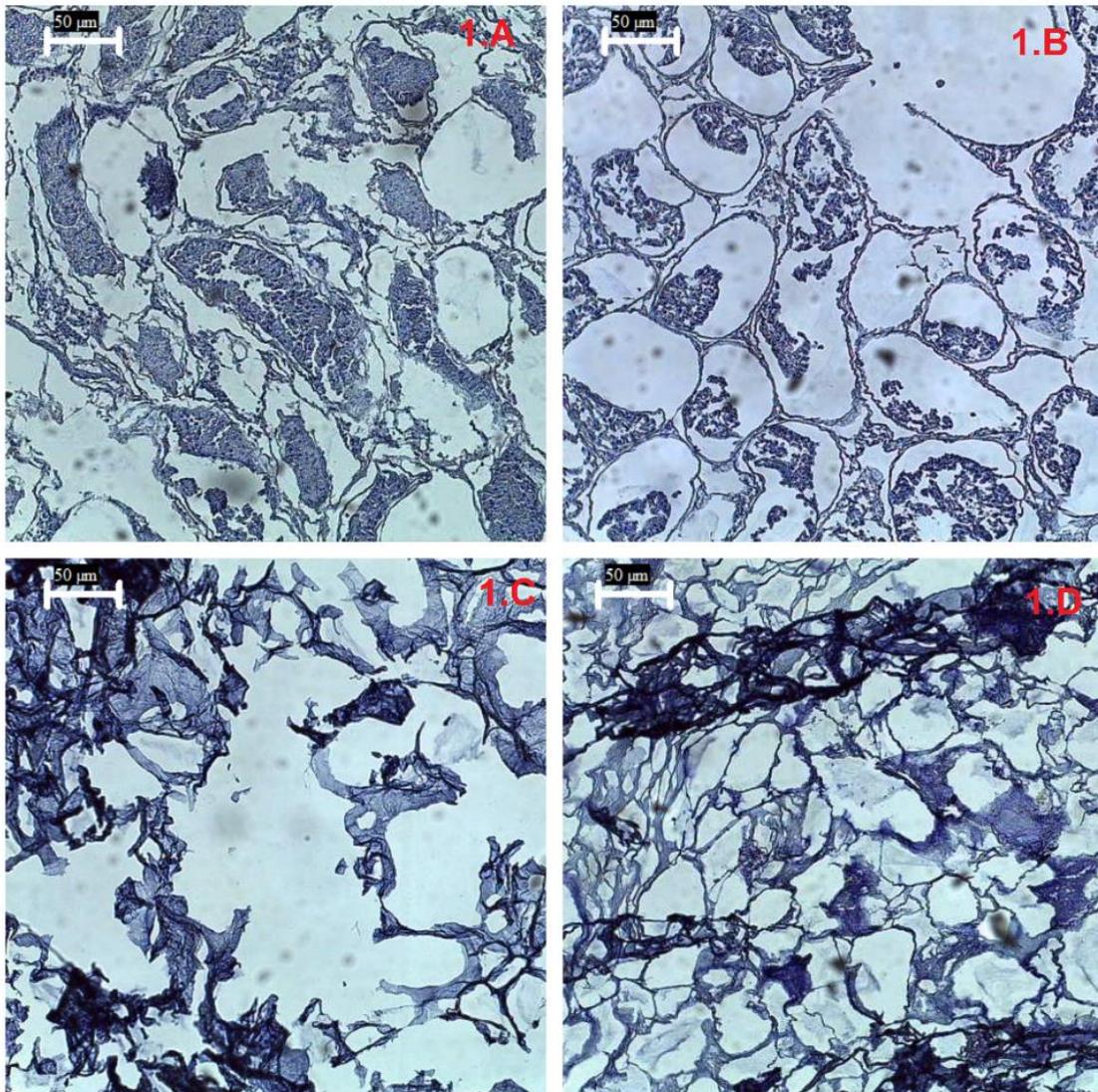


Figura 1. Influencia de los tratamientos en el biomaterial

Descripción de la figura: 1.A Tratamiento 1, muestra presencia de poros, pero posee aún células. 1.B tratamiento 2, muestra poros con presencia de células. 1.C tratamiento 3 con poros grandes y no se observan células. 1.D tratamiento 4 con poros pequeños y con cantidad grande de células.

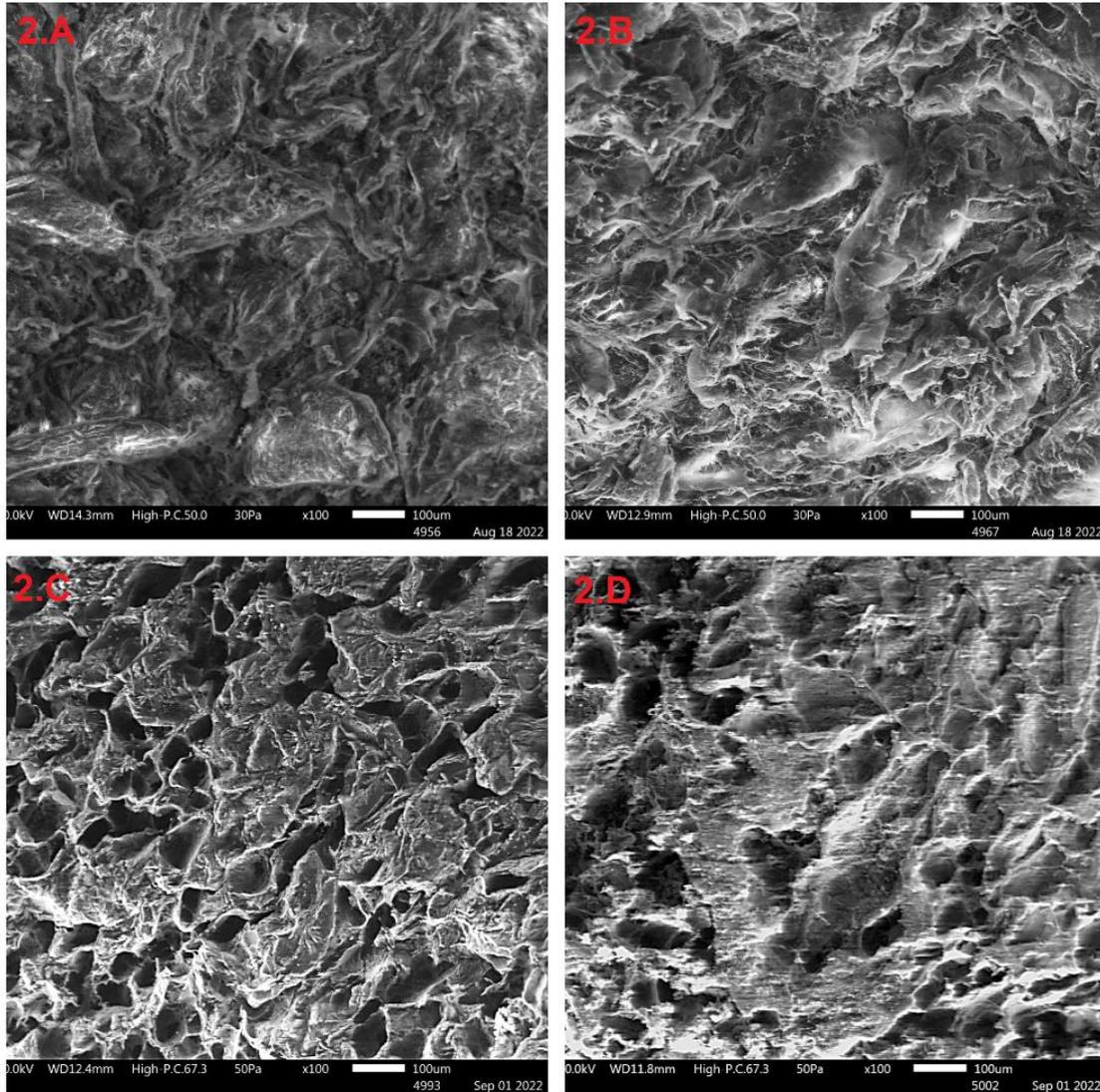


Figura 2. Influencia de los tratamientos en la descelularización observada por microscopía electrónica

Descripción de la figura: 2.A Tratamiento 1, muestra sin presencia de poros, tejido compacto. 2.B tratamiento 2, muestra sin poros y tejido compacto. 2.C tratamiento 3 con varios poros alrededor de todo el tejido. 2.D tratamiento 4 con pocos poros pequeños y parte del tejido compacto.

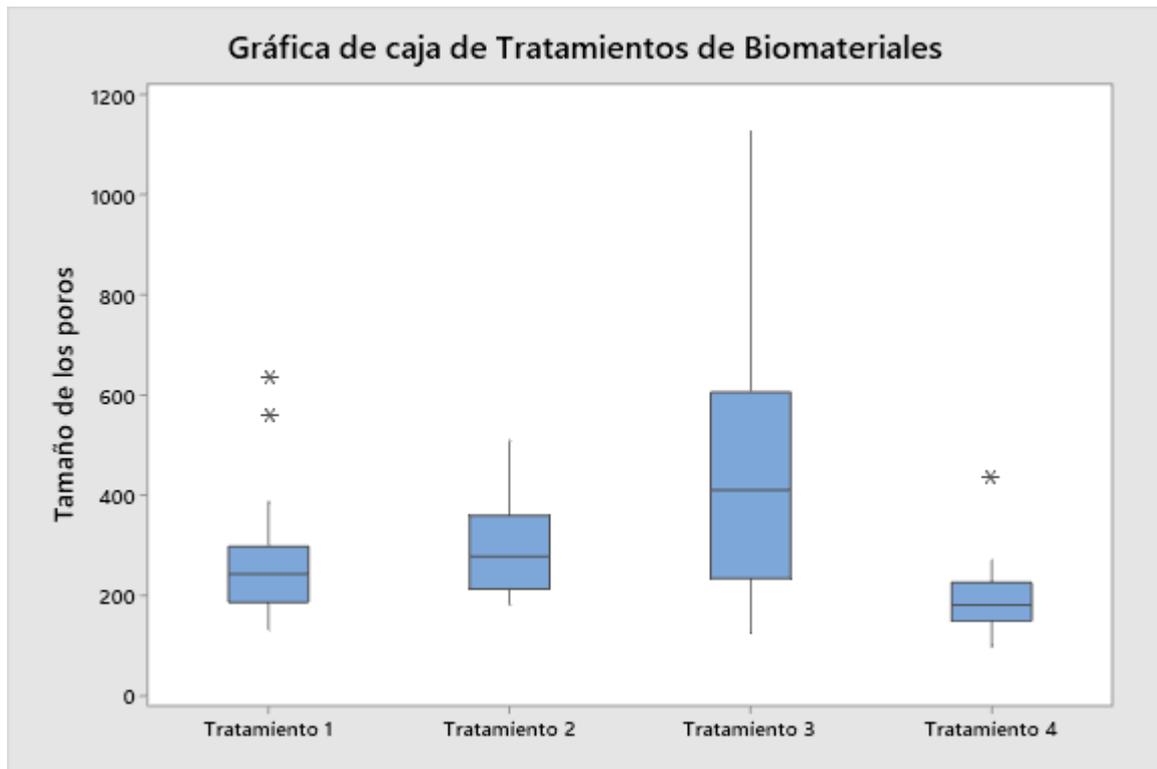


Figura 3. Box plot del tamaño de los poros de los 4 tratamientos después de 25 mediciones aleatorias

Descripción de la figura: El tamaño de los poros de los diferentes tratamientos luego de realizar las mediciones con el programa ImageJ de 25 diferentes poros de manera aleatoria, muestra que el tratamiento 1 y 4 con valores atípicos y que la mediana del tratamiento 3 es superior.

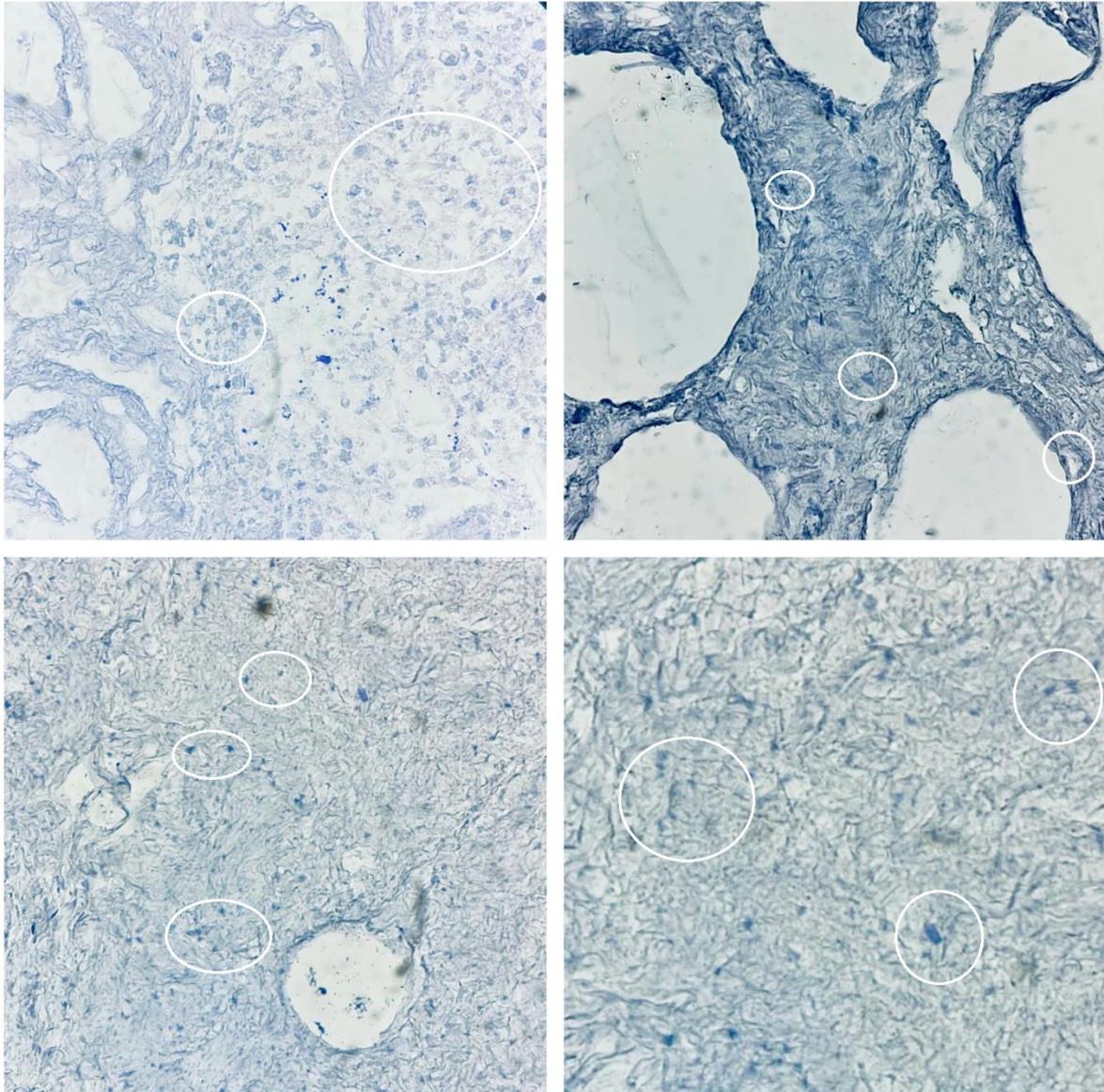


Figura 4. Cultivo celular con corte histológico después de 7 días

Descripción de la figura: Se observa crecimiento de colonias de células en los biomateriales luego de 7 días de su cultivo, los núcleos de las células se tiñen de color azul, debido a la hematoxilina de Harris.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campuzano, S., & Pelling, A. E. (2019). Scaffolds for 3D Cell Culture and Cellular Agriculture Applications Derived From Non-animal Sources. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2019.00038>
- Canvax Biotech. (2022). Sodium Dodecyl Sulphate (SDS). *Canvax Reagents*. <https://lifescience.canvaxbiotech.com/product/sds-sodium-dodecyl-sulfate/>
- Carletti, E., Motta, A., & Migliaresi, C. (2010). Scaffolds for Tissue Engineering and 3D Cell Culture. *Methods in Molecular Biology*, 17–39. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_2
- CellPath. (2022). HARRIS HAEMATOXYLIN STAIN (ORTHO) - 1L. Retrieved December 18, 2022, from [https://www.cellpath.com/harris-haematoxylin-stain-ortho-11-rba-4213-00a.html#:~:text=The%20Harris%20Haematoxylin%20Stain%20\(Ortho,vitro%20examination%20of%20cellular%20deformity.](https://www.cellpath.com/harris-haematoxylin-stain-ortho-11-rba-4213-00a.html#:~:text=The%20Harris%20Haematoxylin%20Stain%20(Ortho,vitro%20examination%20of%20cellular%20deformity.)
- Cummings, C., Pedchenko, V., Brown, K., Colon, S., Rafi, M., Jones-Paris, C., . . . Sant, S. (2016). Extracellular chloride signals collagen IV network assembly during basement membrane formation. *J Cell Biol*, 479-494. doi. 10.1083/jcb.201510065
- De Rooij, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy Research and Technique*, 72(8), 580–585. <https://doi.org/10.1002/jemt.20699>
- Domke, L., & Franke, W. (2019). The cell–cell junctions of mammalian testes: II. The lamellar smooth muscle monolayer cells of the peritubular wall are laterally connected by vertical adherens junctions—a novel architectonic cell–cell junction system. *Cell and Tissue Research*, 451-482. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-018-2968-x>

- EHU. (n.d.). INTRODUCCIÓN AL CULTIVO CELULAR. *Universidad el País Vazco*. Retrieved from https://www.ehu.es/biofisica/juanma/mbb/pdf/cultivo_celular.pdf
- Ferrara, G. (2021). Nuclear Staining: Overview of Hematoxylin | Visikol. Retrieved December 18, 2022, from Visikol.com website: <https://visikol.com/blog/2021/07/15/nuclear-staining-overview-of-hematoxylin/>
- Glattauer, V., Irving-Rodgers, H., Rodger, R., Stockwell, S., Brownlee, A., Werkmeister, J., & Ramshaw, J. (2007). Examination of basement membrane components associated with the bovine seminiferous tubule basal lamina. *Reprod Fertil Dev.* , 473-481.
- Hermann, B. P., Phillips, B. T., & Orwig, K. E. (2011). The Elusive Spermatogonial Stem Cell Marker?1. *Biology of Reproduction*, 85(2), 221–223. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.093146>
- Ibtisham, F., Hazmi, A., & Hanaramooz, A. (27 de Abril de 2020). The study and manipulation of spermatogonial stem cells using animal models. *Cell and Tissue Research*, 393-414. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-020-03212-x>
- Keane, T. J., Swinehart, I. T. & Badylakabc, S. F. (2015, agosto). Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*, volumen 84, 25-34. Obtenido de: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>.
- Komeya, M., & Ogawa, T. (2015). Spermatogonial stem cells: progress and prospects. *Asian Journal of Andrology*, 771-775. Obtenido de doi: 10.4103/1008-682X.154995
- Kostereva, N., & Hofmann, M. (2008). Regulation of the Spermatogonial Stem Cell Niche. *Reproduction in Domestic Animals*, 386-392. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904914/>
- Kubota, H., & Brinster, R. (2018). Spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction* , 52-74.

- Majadi, N., Movahedin, M., & Mazaheri, Z. (2019). Three-Dimensional Culture of Mouse Spermatogonial Stem Cells Using A Decellularised Testicular Scaffold. *Cell Journal*, 410-418. doi. 10.22074/CELDAJ.2020.6304
- Megías, M. (2022). Técnicas Histológicas. 2. Fijadores. Atlas de Histología Vegetal y Animal. Obtenido de *Universidad de Vigo*: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/2-fijadores.php#:~:text=Etanol%2C%20metanol%2C%20acetona&text=En%20general%2C%20son%20buenos%20fijadores,obtenidas%20de%20tejido%20no%20fijado>.
- MERCK. (2016). Andamios para cultivo celular en 3D. *Sigmaaldrich.com*. <https://doi.org/dogri>
- Meyer, M., Kreila, G., & Aschauer, H. (1997). The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of the membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Letters*, 385-388. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579397009368>
- Minitab. (2021). Identificar valores atípicos. Obtenido de *Minitab, LLC* website: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/20/help-and-how-to/graphs/general-graph-options/graph-editing-basics/identifying-outliers/#:~:text=Un%20valor%20at%C3%ADpico%20es%20una,2%2C%203%2C%20y%2034>.
- Moffat, D. (2022). Decellularization for the retention of tissue niches - Deana Moffat, Kaiming Ye, Sha Jin. 13. *Journal of Tissue Engineering*: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/20417314221101151>
- Nari, G. A., Cid, M., Comín, R., Reyna, L., Juri, G., Taborda, R., & Salvatierra, N. A. (2013). Preparation of a three-dimensional extracellular matrix by decellularization of rabbit livers. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 105(3), 138–143. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082013000300004>

- Neishabouri, A., Soltani Khaboushan, A., Daghigh, F., Kajbafzadeh, A.-M., & Majidi Zolbin, M. (2022). Decellularization in tissue engineering and regenerative medicine: Evaluation, modification, and application methods. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 805299. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>
- Oatley, J. (2010). Spermatogonial stem cell biology in the bull: development of isolation, culture, and transplantation methodologies and their potential impacts on cattle production. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 133-143.
- Oatley, J., & Brinster, R. (2008). Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 263-286. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4066667/>
- Tammi, R., Rönkkö, S., Ägren, U., & Tammi, M. (1994). Distribution of Hyaluronan in Bull Reproductive Organs. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1479-1486.
- Voga, M., Adamic, N., Vengust, M., & Majdic, G. (2020). Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00278>
- White, L. J., Taylor, A. J., Faulk, D. M., Keane, T. J., Saldin, L. T., Reing, J. E., ... Badylak, S. F. . (2017). The impact of detergents on the tissue decellularization process: A ToF-SIMS study. *Acta Biomaterialia*, 50, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>

ANEXOS

ANEXO 1: PREPARACIÓN ENZIMÁTICA PARA CULTIVO CELULAR

Mix Enzimático I	
Enzima	Peso (mg)
Colagenasa	50
Hialuronidasa	50
Tripsina	50
Mix Enzimático II	
Enzima	Peso (mg)
Colagenasa	50
Hialuronidasa	50

ANEXO 2: PREPARACIÓN DEL MEDIO MEM 1X

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

**ANEXO 3: CRECIMIENTO DE COLONIAS (CAFÉ) SOBRE POCILLOS DESPUÉS
DE 3 DÍAS**

