

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE  
CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES EN BOVINOS**

Proyecto de investigación

**Saulo Erazo Romero**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 11 de diciembre de 2017

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Aislamiento, cultivo e identificación molecular de células madre  
espermatogoniales en bovinos**

**Saulo Erazo Romero**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte, Ph.D.

Firma del profesor

---

Quito, 11 de diciembre de 2017

## 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: Saulo Erazo Romero

Código: 00104332

Cédula de Identidad: 1720987781

Lugar y fecha: Quito, diciembre de 2017

## RESUMEN

En este trabajo se aislaron, cultivaron e identificaron de forma molecular células madre espermatogoniales (SSC) en bovinos. Se realizaron tres ensayos a partir de los testículos de tres terneros de entre un mes y medio y cuatro meses de edad. Para el aislamiento se realizaron dos digestiones enzimáticas y se purificaron las espermatogonias tipo A mediante la técnica de plaqueo diferencial. Para el cultivo se probaron tres concentraciones de suero fetal bovino (FCS) 0.25%, 1% y 10%. Para la identificación de las SSC se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica (inmunoperoxidasa), con la cual se marcó el receptor  $GFR\alpha 1$  de la membrana de las SSC. Después del plaqueo diferencial se obtuvo un porcentaje de espermatogonias vivas entre 26% y 55.16%. La prueba t de Student demostró que no existe un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración de FCS en el número de SSC. Se logró en esta investigación marcar con éxito a las células germinales  $GFR\alpha 1$  positivas bovinas y su mantenimiento en cultivos de corto plazo lo cual no ha sido realizado hasta ahora.

Palabras clave: Células Madre Espermatogoniales (SSC), Suero Fetal Bovino (FCS),  $GFR\alpha 1$ , Cultivo celular, Espermatogonia tipo A, Inmunohistoquímica

## ABSTRACT

Bovine spermatogonial stem cells (SSC) were isolated, cultured and molecularly identified. Three trials were made from the testes of three calves between one and a half months and four months of age. For cell isolation, two enzymatic digestions were performed and type A spermatogonia were purified by differential plating. During culture, three concentrations of fetal calf serum (FCS), 0.25%, 1% and 10% were tested. For the identification of the SSC, Immunohistochemistry (immunoperoxidase) techniques were used, where the GFR $\alpha$ 1 receptor in SSC membrane was marked. After differential plating, the percentage of viable spermatogonia obtained was between 26% and 55.16%. Student's t-test showed that there was no significant effect ( $p < 0.05$ ) of the FCS concentration on the SSC numbers. In the present research, we successfully marked bovine GFR $\alpha$ 1 positive cells and followed their maintenance during short term cultures.

Keywords: Spermatogonial Stem Cells (SSC), Fetal Calf Serum (FCS), GFR $\alpha$ 1, Cell culture, Spermatogonia type A, Immunohistochemistry

# TABLA DE CONTENIDO

## Contenido

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1	Antecedentes.....	10
1.2	Aislamiento de células germinales testiculares.....	12
1.3	Cultivo.....	13
1.4	Identificación molecular.....	15
<b>2</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>17</b>
3.1	Objetivo General.....	17
3.2	Objetivos Específicos.....	17
<b>4</b>	<b>Área de estudio</b> .....	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>Materiales</b> .....	<b>19</b>
5.1	<i>Obtención de material biológico</i> .....	19
5.2	<i>Aislamiento y cultivo</i> .....	19
5.3	<i>Histología e inmunohistoquímica</i> .....	20
5.4	<i>Procesamiento de datos</i> .....	21
<b>6</b>	<b>Métodos</b> .....	<b>22</b>
6.1	<i>Obtención de material biológico</i> .....	22
6.2	<i>Histología e Inmunohistoquímica</i> .....	24
6.3	<i>Cuantificación y estadística</i> .....	26
<b>7</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>26</b>
7.1	Aislamiento de células germinales testiculares.....	26
7.2	Cultivo.....	26
7.3	Proliferación y diferenciación de las espermatogonias.....	27
7.4	Identificación molecular.....	28
7.5	Dinámica celular en cultivo.....	29
<b>8</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>29</b>
8.1	Aislamiento de células germinales testiculares.....	29
8.2	Cultivo.....	30
8.3	Proliferación y diferenciación de las espermatogonias.....	32
8.4	Identificación molecular.....	34
<b>9</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>36</b>
<b>10</b>	<b>Recomendaciones</b> .....	<b>37</b>
<b>11</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>38</b>
<b>12</b>	<b>Anexo A: Tablas</b> .....	<b>43</b>
<b>13</b>	<b>Anexo B: Figuras</b> .....	<b>45</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 .....	43
Tabla 2 .....	44
Tabla 3 .....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 .....	45
Figura 2 .....	46
Figura 3 .....	47
Figura 4 .....	48
Figura 5 .....	49
Figura 6 .....	50
Figura 7 .....	51
Figura 8 .....	52
Figura 9 .....	53
Figura 10 .....	54
Figura 11 .....	55



# 1 INTRODUCCIÓN

Los bovinos son mamíferos placentarios que pertenecen a la familia Bovidae, dentro de la cual podemos encontrar animales de gran importancia económica para la ganadería mundial. Gracias a los avances tecnológicos y a la creciente demanda de productos de origen animal, la ganadería está creciendo de forma acelerada (FAO, 2014). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), cerca de 200 millones de familias en Asia, África y América Latina tienen como fuente principal de ingresos a la ganadería (FAO, 2017a). En los últimos años a nivel mundial se ha experimentado un gran crecimiento en la producción y consumo de productos de origen animal. La ganadería tradicional aporta a los medios de vida del 70% de la población en zonas rurales del planeta (FAO, 2014). A nivel mundial la carne es el producto de la ganadería de mayor valor, estimándose que para el 2050 la producción de carne en todo el planeta se habrá duplicado, crecimiento que provendrá mayormente de países en desarrollo y por ende representando una fuente económica importante (FAO, 2016).

En el Ecuador la ganadería tiene una alta importancia económica en los sectores rurales y en la producción de carnes y sus derivados. Desde el 2003 la producción de lácteos ha aportado con un 0,5% del Producto Interno Bruto (PIB) total del país, y la carne el 0,3%; representando en promedio anual en 1,6% del PIB total (MAGAP, 2016). El 59.76% del ganado que se cría en el país es ganado vacuno, y el cual se subdivide en los rubros de producción de carne y de lácteos (Pro Ecuador, 2016). En el 2014 se contabilizó en el Ecuador un hato de 4'566.200 cabezas y que ocupan 4,5 millones de hectáreas de tierra que es utilizada para pastos en donde predomina el pastoreo de la ganadería de bovinos (MAGAP, 2016). Se debe recalcar que tanto la demanda a nivel nacional como global tiende al aumento debido a las mejoras en la calidad de vida de los pobladores, la mejora de la tecnología y al crecimiento poblacional.

De los resultados obtenidos en la investigación de las células madre de la línea germinativa en los testículos de ratones, se ha visto que estas células retienen la habilidad para generar células pluripotentes (Guan et al., 2006) lo que ha llevado a la investigación de estas técnicas en otros mamíferos, entre ellos los bovinos. El avance de la tecnología en el campo de las células madre espermatogoniales (SSC, del inglés *Spermatogonial stem cells*) y la importancia genética del ganado vacuno han sido una fuente de herramientas que han contribuido al mejoramiento genético del ganado vacuno y han abierto la puerta a múltiples investigaciones (Aponte & de Rooij, 2009). Las SSC son células madre germinativas del epitelio seminífero en los testículos, responsables de la formación de un sistema de células madre productoras de espermatozoides conocido como espermatogénesis (Aponte, 2015). Originalmente no existían conceptos claros en cuanto al potencial de diferenciación de las SSC además de que se solía creer que estas eran exclusivamente células unipotenciales. Hoy se conoce que las SSC adultas son las únicas que no solo son capaces de transmitir el genoma de una especie dada de generación en generación, sino que también tienen la habilidad de convertirse o dividirse en otras células madre pluripotentes (Aponte, 2015; Kanatsu-Shinohara, Takehashi, & Shinohara, 2008; Seandel et al., 2007).

## **1.1 Antecedentes**

En 1977 Bellvé *et al* lograron aislar y caracterizar morfológicamente a un grupo de células de la línea germinativa de los testículos de ratón, sentando las bases para la investigación y el aislamiento de las SSC (Bellvé et al., 1977). Para 1994 el grupo del Dr. Brinster desarrolló una técnica de trasplante de células germinativas en donde células testiculares disociadas de animales donadores lograron colonizar los túbulos seminíferos vacíos de ratones receptores infértiles, desarrollándose la espermatogénesis completa. Posteriormente estos animales fueron capaces de producir descendencia de los machos donadores de SSC. Así se obtuvo un ensayo funcional para las SSC a la vez que se observó la

importancia de las SSC debido a que solo estas pueden proliferar a término (diferenciación) y eventualmente regenerar la espermatogénesis tras un proceso de trasplante, a diferencia de otras células germinativas diferenciadas, las cuales desaparecen luego de 35 días (Kanatsu-Shinohara et al., 2008). El desarrollo de la técnica de trasplante abrió la puerta para la manipulación de la línea germinativa masculina para la producción de animales transgénicos; lo que abre muchas posibilidades para la transferencia de material de rasgos genéticos relevantes en el ganado de forma oportuna (Aponte & De Rooij, 2009).

La biotecnología de las SSC se enfoca en resolver problemas de fertilidad como por ejemplo en pacientes con cáncer, preservación de germoplasma en la reproducción de especies en peligro de extinción y en el desarrollo de técnicas de espermatogénesis *in vitro* (Aponte, 2015). Cuando por alguna razón los testículos son violentados por algún agente interno o externo, tales como, patógenos, químicos, medicamentos o radiación, se destruyen en su mayoría las células germinativas diferenciadas, pero gracias a que las SSC se pueden autorenovar y diferenciar, eventualmente y de a poco se repueblan los túbulo seminíferos, restableciéndose la espermatogénesis (De Rooij & Russell, 2000). Para poder estudiar de forma amplia las características de las SSC, se deben aislar grandes poblaciones de SSC puras, para lo cual debe alcanzarse la propagación *in vitro* de estas células (Aponte et al., 2008).

Los testículos de los bovinos tienen una forma oval alargada. En un adulto cada testículo puede pesar hasta 300 g. La lámina peritoneal que recubre la superficie del testículo es la túnica vaginalis, la que se extiende por sobre la túnica albugínea que cubre a todo el parénquima y le da la forma característica al testículo. Desde el mediastino testicular se irradian de forma periférica unos tabiques que dividen al testículo en lóbulos; cada lóbulo contiene un par de túbulos seminíferos que después se comunican con la rete testis, hasta llegar a los conductos eferentes que salen del testículo para proseguir en el epidídimo (Hafez,

1974). Cuando se realiza un corte transversal del túbulo seminífero pueden observarse la membrana basal que está rodeada por células mioides, células de Sertoli y dependiendo de la edad del animal distintos tipos de células germinales todas dirigiéndose hacia el lumen o luz del túbulo (Hafez, 1974; Izadyar, Spierenberg, Creemers, den Ouden, & de Rooij, 2002).

Para el aislamiento de las SSC hay que conocer que las SSC se encuentran en la base del epitelio seminífero y están rodeadas de sus células hijas diferenciadas en el compartimento basal que es creado por las células de Sertoli (Aponte & De Rooij, 2009). Además hay que conocer que existen varios tipos de células germinativas; la espermatogénesis se origina con las SSC, en los mamíferos no primates la espermatogonia del tipo  $A_s$  (A sola) es considerada como la célula madre que da origen a la espermatogénesis (Izadyar, Spierenberg, Creemers, den Ouden, & de Rooij, 2002). Cuando las SSC se dividen pueden tomar dos rutas, la primera es la migración lejos de la progenitora y ser dos células madre nuevas o la otra es permanecer juntas por medio de un puente intercitoplasmático, y a esta última se la conoce como espermatogonia  $A_{pr}$  (pareada); en bovinos las espermatogonias  $A_{pr}$  también conservan propiedades de SSC, por lo que las SSC pueden encontrarse entre las espermatogonias  $A_s$  y las  $A_{pr}$  (Izadyar et al., 2002). Las células  $A_{pr}$  continúan duplicándose y formando cadenas de células (unidas por puentes intercitoplasmáticos) que se conocen como espermatogonias  $A_{al}$  (alineadas). Estas continuarán su desarrollo y se diferenciarán en espermatogonias  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , espermatogonias intermedias y espermatogonias B, las que por la última división mitótica originan a los espermatoцитos que comenzaran con las divisiones meióticas (Izadyar et al., 2002).

## **1.2 Aislamiento de células germinales testiculares**

Varios eventos se han dado en el aislamiento de SSC, después de que Bellvé lograra aislar y caracterizar algunas células de la línea germinativa de los testículos de los ratones, muchas investigaciones se dieron en torno a este evento. En 1998 Nagano *et al* lograron

aislar células germinativas de ratón y mantenerlas con vida por más de cuatro meses en un medio que contenía suero (Bellvé et al., 1977; Nagano, Avarbock, Leonida, Brinster, & Brinster, 1998). En el 2002 Izadyar *et al* desarrollaron un protocolo específico para el aislamiento de espermatogonias tipo A y de células de la línea germinativa en bovinos mediante dos pasos de digestión enzimática y plaqueo diferencial (Izadyar et al., 2002).

### 1.3 Cultivo

Dentro del testículo las SSC se encuentran bajo ciertas condiciones que le permiten sobrevivir, en otras palabras se encuentra en un microambiente en donde los factores de crecimiento y los nutrientes convergen para que éstas células mantengan su estado de no diferenciación; y ese lugar se conoce como nicho de célula madre (Aponte & De Rooij, 2009). Para mantener un correcto funcionamiento de las células madre se debe mantener la homeostasis en el tejido, puesto que las células madre están estrechamente ligadas a su microambiente o nicho. Evidencia funcional y genética demuestra que el nicho es crítico para las SSC de los mamíferos (Yoshida, Sukeno, & Nabeshima, 2007) y es una de las razones por las que se dificulta su cultivo como células disociadas; por otro lado las SSC y su primera hija comprometida a la vía de la diferenciación son muy difíciles de distinguir entre si desde un punto morfológico, lo que dificulta su aislamiento, cultivo y posterior caracterización (Aponte & De Rooij, 2009).

El nicho de las SSC está constituido por las células de Sertoli, las células del mióide peritubular y las células de Leydig. Las células de Sertoli ofrece los nutrientes para las SSC y las células germinales diferenciadas mediante la producción del factor neurotrópico derivado de una línea de células gliales (GDNF) y también del factor de crecimiento fibroblasto básico (bFGF), los cuales son parámetros muy importantes para la autorenovación de las SSC *in vitro* (Hofmann, 2008; Meng et al., 2000; Takashima et al., 2015). Por otro lado las células mioídes peritubulares y las células de Leydig generan el factor estimulante de colonias 1

(CSF1) que exhibe un efecto sinérgico con GDNF. Además de generar la CSF1 las células de Leydig también pueden estimular el desarrollo de las gónadas y mantener la espermatogénesis a través de la producción de testosterona (Zheng et al., 2014). Idealmente todos estos factores de crecimiento y sistemas de señales intercelulares deberían tomarse en cuenta al momento de diseñar un sistema de cultivo de células germinales.

Varios sistemas de cultivo de SSC han sido descritos, pero hasta principios del año 2000 no existía un sistema de cultivo a largo plazo bien definido y además existían muchas falencias (De Rooij & Russell, 2000; Nagano et al., 1998). En el 2003 Izadyar *et al* desarrollaron un sistema de cultivo al largo plazo para espermatogonias tipo A (SSC más sus descendientes directas en vías de diferenciación) en bovinos. Este grupo de investigadores aisló SSC y las cultivó a 37°C y una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> en Medio Mínimo Esencial (MEM) que contenía distintas cantidades de suero fetal bovino (FCS, del inglés *Fetal Calf Serum*), lo que favorecía la proliferación celular, y dependiendo de la concentración, favorecía el crecimiento de células germinales o de células somáticas. Izadyar y su equipo lograron con éxito cultivar espermatogonias tipo A y su supervivencia en cultivo (Izadyar et al., 2003). Hay que tomar en cuenta que dependiendo del cultivo, en la mayoría de casos, se utilizan monocapas de células alimentadoras de fibroblastos así como factores esenciales de crecimiento. Por ende, con la ayuda de la manipulación genética y los trasplantes de cultivos de SSC, las investigaciones continúan descubriendo y entendiendo las vías regulatorias adecuadas para la autorenovación y la diferenciación de SSC (Phillips, Gassei, & Orwig, 2010). A fin de tener cultivos de células madre exitosos se requiere poder caracterizarlos adecuadamente. Actualmente la forma en la que se comprueba que un cultivo celular contiene SSC es mediante pruebas de funcionalidad mediante el trasplante a testículos de ratón desprovistos de espermatogénesis endógena para así observar si estas células son capaces de producir espermatogénesis (Aponte, 2015; Izadyar et al., 2003). Este tipo de

procedimientos toma mucho tiempo, niveles altos de experiencia en trasplante y mucho cuidado en la asepsia de cada uno de los pasos; por lo que resulta costoso y difícil de realizar. Una solución más práctica consiste en el uso de marcadores moleculares específicos para SSC.

#### **1.4 Identificación molecular**

Uno de los retos que se tiene en el aislamiento de SSC es la identificación de las mismas, debido a que las SSC morfológicamente son iguales a las primeras generaciones de sus células hijas, lo que dificulta una diferenciación morfológica (Aponte & De Rooij, 2009), además dentro de las células germinativas la población de SSC en ratones solo representan el 0,03% (Tegelenbosch & de Rooij, 1993), lo que hace su identificación aún más difícil. Por esta razón es que la forma ideal de identificar las SSC es con la ayuda de marcadores moleculares. Dentro del testículo las células de Sertoli, que son las principales células involucradas en la formación del nicho para SSC (Aponte & De Rooij, 2009), secretan el factor GDNF, para la autorenovación de las SSC, las cuales poseen un receptor llamado  $GFR\alpha 1$ , que es el receptor para la GDNF y que se encuentra en la membrana de la célula (Aponte, 2015; Grisanti et al., 2009). Ciertamente este no es el único marcador; ya que además de la  $GFR\alpha 1$  se tiene la THY1 (Reding, Stepnoski, Cloninger, & Oatley, 2010); en humanos se conoce la expresión de la  $GFR\alpha 1$  y la GPR125; y últimos reportes indican el producto de un nuevo gen en las SSC, llamado PAX7, que puede representar el marcador común entre distintas especies, como ratones, gatos, perros, cerdos, toros, monos e incluso en humanos (Aloisio et al., 2014).

## **2 JUSTIFICACIÓN**

Este proyecto tiene dos puntos que justifican su realización. El primero es el aporte al desarrollo de la biotecnología moderna, debido al gran potencial biotecnológico que tienen

las SSC. Gracias a la resistencia que presentan las SSC y su capacidad de autorenovación y diferenciación, son objetivo de estudio en casos de infertilidad causada por traumas o agentes dañinos internos o externos al testículo (De Rooij & Russell, 2000). La biotecnología de las SSC está enfocada a resolver los problemas de fertilidad, por ejemplo en pacientes con cáncer post tratamiento quimioterápico o radiación, que resultan en destrucción del epitelio seminífero, otros problemas de infertilidad o incluso en la reproducción de especies en peligro de extinción mediante la preservación de germoplasma así como al desarrollo de técnicas para la espermatogénesis *in vitro* (Aponte, 2015), por lo que su aislamiento, cultivo e identificación son herramientas muy importantes para el desarrollo de la investigación de la biotecnología médica. Por otro lado, las SSC son ideales para la transgénesis debido a que son las únicas células madre adultas capaces de transmitir genes de generación a generación convirtiéndole a la espermatogénesis es un sistema modelo ideal para el análisis de la regulación de las células madre (Aponte, Van Bragt, De Rooij, & Van Pelt, 2005).

El segundo punto importante de este proyecto es la vinculación del estudio de las SSC de bovinos y la relevancia económica que tienen estos animales. La FAO estima que en 2017 se producirán 69.6 millones de toneladas de carne de bovino en el mundo; por otro lado se estima que la producción de leche para el 2017 será de 830.5 millones de toneladas de leche (FAO, 2017b). Es por ello que en el presente proyecto buscamos la identificación de las SSC en estas especies en particular, las cuales, como posible aplicación, podrían ser trasplantadas desde sementales de gran vigor híbrido hacia toros de menor valor comercial, finalmente capaces de generar semen con un gran valor económico. Gracias al avance tecnológico en el campo de las SSC y la importancia genética del ganado vacuno se han desarrollado una serie de técnicas y herramientas que han ayudado al mejoramiento genético del ganado vacuno y abren las puertas a múltiples investigaciones (Aponte & De Rooij, 2009).



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo General

Aislar, cultivar e identificar molecularmente a las células madre espermatogoniales en bovinos

### 3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la supervivencia y la cantidad de SSC (a través del uso del marcador Gfr $\alpha$ 1 para su identificación) durante cultivo celular de corto plazo (15 días).
- Determinar las condiciones adecuadas para el cultivo a corto plazo de SSC en bovinos: condiciones del medio e incubación y porcentaje de FCS.
- Comparar los resultados *in vitro* con el tejido testicular original.

## 4 ÁREA DE ESTUDIO

El presente trabajo se realizó con tres distintos terneros de entre uno y medio y cuatro meses de edad, ubicados en la hacienda del profesor Fernando Salas Diehl en la vía a Papallacta, ciudad Quito, provincia de Pichincha – Ecuador. El material biológico recolectado fue trasladado al laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito, en donde se realizó una limpieza del material para proceder a su procesamiento.

## 5 MATERIALES

### 5.1 *Obtención de material biológico*

- Terneros de entre 2 a 4 meses
- Desinfectante yodado
- Anestésico local
- Bisturí
- Emasculador
- Desinfectante con violeta de genciana y plata
- Cooler

### 5.2 *Aislamiento y cultivo*

- Bisturí
- Pinzas
- Tijeras
- Bandejas de disección
- Balanza
- Cajas petri
- Tubos cónicos para centrifuga de 15 ml y 50ml (Falcon)
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Parafilm
- Papel aluminio
- Papel plástico
- Pipetas de plástico desechable de 10 ml y 50 ml (Nunc)
- Micropipetas

- Pipeteador automático
- Baño María
- Centrífuga
- Suero fisiológico
- MEM 10X (Gibco)
- DNase (SIGMA)
- Colagenasa
- Hialuronidasa
- Tripsina
- Suero Fetal Bovino (FCS) (SIGMA)
- Filtros de nylon de 100  $\mu\text{m}$  y 40  $\mu\text{m}$  (Sigma)
- BSA Albumina Sérica Bovina (SIGMA)
- Azul tripan
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubre objetos
- Culture Flasks de 75  $\text{cm}^2$
- Microscopio óptico
- Penicilina - estreptomina (Gibco, Life Technologies)
- Gentamicina (Gibco, Life Technologies)

### ***5.3 Histología e inmunohistoquímica***

- Paraformaldehído 4% (Sigma)
- Fijador Bouin (ácido pícrico, formaldehído al 37% y ácido acético glacial)
- PBS 1X
- Tubos cónicos para centrifuga de 15 ml y 50ml (Falcon)

- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Peróxido de Hidrógeno al 30%
- Reactivo de bloqueo UltraCruz (Santa Cruz Biotechnologies)
- Anticuerpo Primario GFR $\alpha$ 1 (Santa Cruz Biotechnologies)
- Anticuerpo Secundario marcado con HPR (Horse radish peroxidase), (Santa Cruz Biotechnologies)
- DAB (Sigma)
- Agua destilada
- Casetes para inclusión (Citotest)
- Etanol 70%
- Etanol 80%
- Etanol 96%
- Etanol 100%
- Xilol
- Parafina (Paraplast Plus), (Sigma)
- Estufa
- Agitador magnético
- Molde para la inclusión
- Hematoxilina
- Micrótopo (Slee)

#### ***5.4 Procesamiento de datos***

- Excel
- SPSS Statistics 17.0

## 6 MÉTODOS

### 6.1 *Obtención de material biológico*

En el presente trabajo se realizaron tres aislamientos celulares para la identificación y seguimiento en el tiempo de las SSC en cultivo. Por lo tanto, para la recolección de los testículos, se realizó, en tres oportunidades, la castración de tres terneros en total de entre 1 mes y medio y 4 meses de edad. Primero se ata al animal de forma que deja los testículos expuestos y visibles para su fácil castración. Se colocó un anestésico local en los testículos del animal, sobre todo alrededor del cordón espermático, y se procedió a su desinfección con una solución yodada. Después de unos minutos con un bisturí se abrió el escroto del animal, se tomó los testículos y con la ayuda de un emasculador se los extirpó. En la herida se colocó un desinfectante a base de violeta de genciana y plata. Los testículos fueron colocados en un cooler con hielo y fueron trasladados al laboratorio de biotecnología animal de la Universidad San Francisco de Quito para su análisis.

### *Mix enzimático I y II*

Para realizar el mix enzimático I se pesan 50 mg de colagenasa, 50 mg de hialuronidasa y 50 mg de tripsina, se coloca en un tubo cónico de 50 ml y se mantiene en el congelador hasta su uso. Para la elaboración del Mix enzimático II se coloca 50 mg de colagenasa y 50 mg de hialuronidasa en un tubo cónico de 50 ml, y se mantiene en el congelador hasta su uso. Antes de usar cualquiera de los dos mixes enzimáticos se añade MEM + DNAsa (25 ml) al mix para tener una concentración final de 2 mg/ml.

### *Aislamiento y cultivo*

#### **Día 1**

Se colocan los testículos en bandejas estériles y se les remueve la *túnica vaginalis*, se pesan y se mide el volumen; se les lava con suero fisiológico (NaCl 0.9%) para limpiar la sangre. Se toma una pequeña muestra para la examinación histológica, se coloca una muestra

en paraformaldehído y la otra en fijador Bouin. El resto del material se coloca en cajas petri estériles. Dentro de una cámara de flujo laminar se cortan los testículos por la mitad y se coloca cada pedazo en una caja Petri estéril y se coloca 12.5 ml de MEM + DNAsa (50 ml MEM 1x + 100  $\mu$ l DNAsa). Con la ayuda de las pinzas y el bisturí estériles se remueve la *túnica albugínea* y se cortan los testículos en pequeños trozos para tratar de remover el tejido conectivo y preparar los túbulos seminíferos lo mejor posible. Después de cortar los testículos en piezas muy pequeñas el material de cada caja Petri se coloca en un tubo cónico de 50 ml donde adicionalmente se agrega 12.5 ml de mix enzimático I (deben existir al menos 25 ml de tejido + mix enzimático I). Se tapan los tubos y se cubre las tapas con parafilm, para finalmente colocar los tubos en el baño maría con agitación a 32 °C y 140 ciclos/min durante 60 minutos.

Se sacan los tubos del baño maría y se colocan en la centrifuga por 1 min a 400 rpm, se remueve el sobrenadante y se lava con MEM + DNAsa por 3 ocasiones hasta que el sobrenadante este lo suficientemente claro. Se remueve el sobrenadante hasta 12.5 ml y se añade 12.5 ml del mix enzimático II a cada tubo. Se cierran los tubos, se coloca parafilm en las tapas a fin de hacerlos herméticos y se colocan los tubos en el baño maría con agitación a 32 °C y 140 ciclos/min durante 45 minutos. Mientras se da la digestión enzimática, se saca del congelador el FSC para su descongelación. Luego de la segunda digestión enzimática se centrifugan los tubos a 400 rpm durante 2 minutos. Se colecta el sobrenadante y se filtra por un filtro de nylon de 100  $\mu$ m y luego por un filtro de nylon de 40  $\mu$ m en un solo tubo. Se centrifuga la muestra a 1100 rpm durante 5 minutos. Luego se elimina el sobrenadante lo más posible dejando el pellet listo para resuspenderlo en 1 ml (suspensión celular) de MEM + DNAsa + BSA y colocarlo en hielo (9 ml de MEM+ 1 ml BSA + 10  $\mu$ l DNAsa).

Se toma 50  $\mu$ l de suspensión celular para realizar pruebas de viabilidad (tinción eosina negrosina y azul tripan) y de concentración (Cámara de conteo de Neubauer 7  $\mu$ l). Se prepara

50 ml de MEM 1x al 10% de FCS y se coloca la suspensión celular en este medio. Colocar 12.5 ml de la nueva suspensión celular en cada uno de los 4 culture flasks de 75 cm<sup>2</sup> cada uno. De forma gentil repartir la suspensión celular por toda la base del culture flask, tapar sin apretar fuertemente la tapa para permitir el intercambio gaseoso e incubar durante toda la noche en una incubadora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Día 2**

Luego de la incubación durante toda la noche (plaqueo diferencial), coleccionar las células y colocarlas en un tubo cónico de 50 ml. Centrifugar durante 5 minutos a 1100 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 600 µl de MEM + DNAsa + BSA y colocarlo en hielo. Medir la viabilidad y la concentración, colocar 50 mil SSC/pocillo (Izadyar et al., 2002). Para el cultivo de las células SSC se probaron tres concentraciones distintas de FCS 0.25%, 1% y 10%. Como el cultivo es un cultivo a corto plazo se sembraron cinco recipientes de cultivo, donde cada 3 días se realizaba una fijación con paraformaldehído de uno de ellos para proceder después a una inmunohistoquímica. La fijación se realizó previo lavado con PBS, frío (4 °C), durante 12 horas. Posteriormente se conservaron los recipientes de cultivo en el refrigerador a 4 °C.

## **6.2 *Histología e Inmunohistoquímica***

De las muestras de tejido fijadas que se obtuvieron de cada aislamiento, se realizó una inclusión en parafina de las muestras para posteriormente realizar una inmunohistoquímica. Primero se coloca la muestra en un casete y se rotula con lápiz, los casetes son sumergidos en etanol al 70% dos veces por 15 minutos. Luego se sumergen en alcohol al 80% dos veces por 20 min, después pasan a alcohol de 96% dos veces por 20 min y finalmente se coloca en alcohol al 100% tres veces por 20 min. Luego se sumergen los casetes en xilol por 10 min, luego en otro recipiente con xilol por 5 min y luego en otro recipiente con xilol por 5 min. Después se colocan los casetes en una solución con relación 1:1 de xilol – paraplast por 45



min. Luego se colocan los casetes en una solución con relación 1:2 de xilol – paraplast durante 45 min. Finalmente se colocan los casetes en paraplast puro dos veces durante 30 min cada vez. Se colocaron las muestras en moldes y fueron cortadas con la ayuda de un micrótopo marca Slee en cortes de 5  $\mu\text{m}$  que fueron colocadas en láminas portaobjetos, desparafinadas en xilol, rehidratadas en alcoholes de concentración decreciente para finalmente realizar una inmunohistoquímica.

### ***Inmunohistoquímica***

#### **Día 1**

Para la inmunohistoquímica se utiliza el protocolo de la GFR $\alpha$ 1 recomendado por la empresa fabricante. Tanto para el tejido como para los pocillos se siguió el mismo protocolo. Primero se lava brevemente con PBS y se incuban las muestras con Peróxido de Hidrógeno 0.1% entre 5 y 7 min para bloquear la peroxidasa endógena. Luego se lava dos veces con PBS por 5 min cada lavado. Se incuba con por una hora con el reactivo de bloqueo Ultracruz (200  $\mu\text{l}$ /pocillo) y finalmente se incuba con el anticuerpo primario anti GFR $\alpha$ 1 toda la noche a 4 °C en ambiente húmedo (concentración 1:100 de anticuerpo en el diluyente que es el reactivo de bloqueo - 200  $\mu\text{l}$ /pocillo).

#### **Día 2**

En el día dos se incuba por dos horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinado y acoplado a la enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano picante) (1:100 de anticuerpo y el diluyente es el reactivo de bloqueo). Finalmente se coloca 250  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo DAB (25  $\mu\text{l}$  de DAB solución stock + 5 ml de Buffer Tris + 0,85  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%) entre 5 y 10 min y se observa bajo el microscopio invertido los resultados. La solución stock de DAB se prepara colocando 1 g de DAB en 25 ml de agua destilada, que se mezcla en un matraz cubierto con papel aluminio ya que es fotosensible.

### **6.3 Cuantificación y estadística**

La confluencia en los cultivos se evaluó en términos de porcentaje de confluencia. Se contó el número de células Gfra1 positivas en las placas y los tejidos. Se realizaron tres aislamientos independientes en los que las células fueron sembradas en placas de 12 pocillos, en donde cada pocillo representa una réplica dentro de cada tratamiento / punto temporal; cada experimento fue independiente (experimento = aislamiento, cultivo y seguimiento con el marcador). Se analizaron las posibles diferencias entre dos concentraciones de suero fetal bovino (1% vs 10%). Se obtuvo la descripción estadística de los datos obtenidos y se utilizó la prueba t de Student con la ayuda del software estadístico SPSS Statistics 17.0.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Aislamiento de células germinales testiculares**

El tamaño de los testículos varió de acuerdo a la edad del animal, en el ternero de un mes y medio de edad cada testículo pesó 4.3 g y 4.1 g respectivamente (Aislamiento 1), en el ternero de tres meses de edad pesaron 16.1 g y 16.4 g (Aislamiento 2) y en el ternero de cuatro meses de edad los testículos pesaron 18.0 g y 17.2 g cada uno (Aislamiento 3). La evaluación celular con la tinción azul tripan después del plaqueo diferencial mostró los porcentajes de supervivencia de las espermatogonias (tabla 1). El porcentaje de supervivencia de las espermatogonias tipo A estuvo entre 26% y 55.16% en los tres aislamientos realizados. También se estimó la concentración de espermatogonias tipo A (células/ $\mu$ l) con la ayuda de la cámara de Neubauer para cada aislamiento, lo que ayudó a estimar el número de pocillos a sembrarse en base al volumen de suspensión celular obtenido del aislamiento (tabla 2).

### **7.2 Cultivo**

Se trabajó con tres concentraciones distintas de FCS 0.25%, 1.0% y 10.0%; luego del primer aislamiento se dejó de trabajar con la concentración más baja (0.25%) debido a que

mostró un muy escaso crecimiento de la monocapa celular durante el cultivo de corto plazo. El crecimiento de la población de SSC no mostró ser estadísticamente significativo durante los 15 días de cultivo (Figura 1). El efecto de las concentraciones de FCS sobre el número de células GFR $\alpha$ 1 positivas arrojó que los tratamientos son iguales estadísticamente y solo en el día 9 los tratamientos fueron distintos ( $p < 0.05$ ), mientras que en el resto de días la concentración de FCS no fueron determinantes para el hallazgo de SSC marcadas positivamente con el marcador Gfr $\alpha$ 1 (Figura 2).

El porcentaje de confluencia es muy importante para el correcto crecimiento de las células y para evitar su estrés ya que las células somáticas constituyen una monocapa que puede contribuir al mantenimiento de las SSC. Las placas fijadas en paraformaldehído fueron teñidas con hematoxilina y observadas bajo un estereoscopio para la determinación del porcentaje de confluencia (Figura 3) y mediante técnicas de estereología se midió el área de confluencia de cada pocillo (Figura 4), donde se observó que dentro de los 3 aislamientos no existe una diferencia significativa entre tratamientos de FCS (1% vs 10%) en relación al desarrollo de la confluencia de las células somáticas en los cultivos a lo largo del tiempo. Sin embargo los cultivos con 10% de FCS alcanzan la confluencia en menor tiempo que los cultivos con 1% de FCS, muchos de los cuales no llegan al 100% de confluencia.

### **7.3 Proliferación y diferenciación de las espermatogonias**

Cada pocillo cuenta con un área de 3.5 cm<sup>2</sup> en los cuales se observó durante los primeros días, el crecimiento de la monocapa celular, para el día 6 de cultivo cuando se utilizaron 50000 SSC/pocillo, se tenía una confluencia del 29% (1 cm<sup>2</sup>) (Figura 5A) y del 62% (2.15 cm<sup>2</sup>) (Figura 5B) cuando se tenía una concentración de 1% de FCS y de 10% de FCS respectivamente. Mientras que para el día 12 se tenía el 62% (2.15 cm<sup>2</sup>) (Figura 5C) y 91% (3.18 cm<sup>2</sup>) (Figura 5D) de confluencia a 1% y 10% de FCS respectivamente. Por el otro lado cuando se utilizaron 100000 SSC/pocillo (aislamiento 3), en el día 6 se tuvo una

confluencia de 64% (2.25 cm<sup>2</sup>) (Figura 6A) y 93% (3.25 cm<sup>2</sup>) (Figura 6B) a 1% y 10% de FCS respectivamente, mientras que para el día 12 para ambos tratamientos de FCS se obtuvo una confluencia de 100% (Figura 6C y 6D). Las monocapas de algunos pocillos correspondientes al aislamiento 3 se levantaron y enrollaron sobre si mismas para el día 15 (Figura 7). Con la ayuda del micrótopo se obtuvieron cortes de 5µm de la muestra de tejido testicular fijado en paraformaldehído. El tejido testicular del cual fue realizado el aislamiento fue teñido con hematoxilina para la visualización de la morfología de la muestra de tejido (día cero), donde se observan los túbulos seminíferos con ausencia de lumen, con células de Sertoli indiferenciadas y gonocitos.

#### **7.4 Identificación molecular**

A través de la técnica de la inmunohistoquímica se obtuvieron SSC positivas para el receptor Gfr $\alpha$ 1, las cuales fueron visualizadas con el microscopio invertido luego de la revelación con DAB (tabla 3). Algunos cristales de DAB fueron encontrados luego de la revelación en los cultivos celulares, aunque eran perfectamente diferenciables de las SSC marcadas positivamente (Figura 9). Se obtuvo el número promedio de SSC/cm<sup>2</sup> marcadas positivamente para el receptor Gfr $\alpha$ 1 en el cultivo de 15 días, no mostrando diferencias significativas en el tiempo, obteniéndose en el pool general de datos  $1,27 \pm 0,3$  espermatogonias tipo A positivas para Gfr $\alpha$ 1 (Figura 10). Por otro lado se observó que el efecto del FCS sobre el número de células Gfr $\alpha$ 1 positivas/unidad de superficie no mostró una diferencia significativa entre tratamientos, con excepción del día 3, donde los tratamientos fueron estadísticamente distintos ( $p < 0,05$ ) (Figura 11). No fue posible constatar la diferenciación de las espermatogonias, pero se observaron espermatogonias tipo A no marcadas con Gfr $\alpha$ 1 cada uno de los días de evaluación durante los 15 días.

## **7.5 Dinámica celular en cultivo**

En la Tabla 3 se pueden observar los números absolutos de células GFR $\alpha$ 1 positivas halladas por pocillo analizado a distintas concentraciones de FSC en un cultivo de 15 días. Los resultados se resumen en la tabla y son el resultado del conteo de las células que se marcaron por inmunohistoquímica (cada pocillo representa una réplica dentro de cada tratamiento/punto temporal dentro de cada experimento independiente y se realizaron tres experimentos en total).

# **8 DISCUSIÓN**

## **8.1 Aislamiento de células germinales testiculares**

La edad del animal donador de testículos en la que se realiza el aislamiento de SSC es determinante para obtener un mayor éxito en el aislamiento, debido a que la disposición de material biológico para trabajar y dependiendo de la edad del animal se encontrarán células más o menos diferenciadas. Se trabajó con testículos de terneros de tres edades distintas, 1 ½ meses, 3 meses y cuatro meses. En la Tabla 1 se detallan los porcentajes de células germinales y somáticas vivas y muertas mediante la tinción azul tripan. En todos los aislamientos se realizó tinción de viabilidad azul tripan, el cálculo de concentración de espermatogonias tipo A vivas, y conociendo el volumen de la suspensión celular se obtuvo el número total de espermatogonias vivas (tabla 2). La literatura sugiere que se obtiene un mayor número de espermatogonias tipo A si se trabaja con testículos de terneros de 5 meses de edad, ya que a esa edad la mayoría de las secciones transversales de túbulos seminíferos contienen como célula germinal en su estadio más avanzado a las espermatogonias de tipo A (Izadyar et al., 2002). Por ejemplo en ratones se utilizan testículos de ratones muy jóvenes para los aislamientos a diferencia de los testículos de adulto, donde obligatoriamente se debe purificar ya que solo el 0.02 – 0.03% son SSC (Tegelenbosch & de Rooij, 1993) y además en los

testículos inmaduros el radio entre células germinales y células somáticas es alto y su separación es relativamente fácil (Kanatsu-Shinohara et al., 2008).

La pureza de los aislamientos es muy importante, mientras mayor sea el número de células germinativas, mayor posibilidades de éxito se tiene. A todos los aislamientos se les realizó la técnica del plaqueo diferencial para eliminar el mayor número posible de células somáticas (Células mioides, de Leydig, de Sertoli, fibroblastos y otras). Van Pelt *et al* y su equipo (1996) utilizaron una suspensión iso-osmótica de Percoll a distintas concentraciones para purificar las células aisladas y obtener un mayor número de espermatogonias tipo A. El Percoll genera distintas densidades lo cual va a formar un gradiente que va a separar la suspensión celular en fracciones luego de aplicar una fuerza centrífuga de 800 G por 30 minutos (van Pelt et al., 1996), las primero 5 fracciones se colectan y se analizan, solo las fracciones con más del 50% de espermatogonias tipo A se lavan, cuentan y se usan para el cultivo (Izadyar et al., 2002). En el aislamiento tres se puede observar (tabla 1) que después del plaqueo diferencial se obtuvo un 55.16% de espermatogonias vivas, ideales para el cultivo. Los testículos utilizados en este aislamiento fueron los del ternero de 4 meses, edad que se acerca bastante a la recomendada por la literatura para el aislamiento de SSC (Izadyar et al., 2002) y que al mayor peso testicular de todos los aislamientos celulares de nuestro estudio, poseía mayor cantidad de material biológico para trabajar.

## 8.2 Cultivo

Se trabajó con tres concentraciones de FCS, para probar su efecto en el crecimiento celular en el cultivo, después del primer aislamiento se descartó el uso de la concentración de 0.25% FCS debido al prácticamente nulo crecimiento celular observado. En este trabajo se evaluaron las diferencias entre la concentración de FSC a 1% y 10%. Se puede ver en la figura 1 que el número de SSC se mantiene constante durante los 15 días de cultivo ya que las pruebas estadísticas utilizadas no mostraron una diferencia significativa entre el número

de SSC en los diferentes días muestreados durante el cultivo. El efecto de la concentración de FCS sobre el número de SSC no fue estadísticamente significativo, y por lo tanto el 1% como el 10% de FCS mostraron un comportamiento similar con excepción del día 9, donde los tratamientos mostraron ser distintos (Figura 2). En la literatura se reporta el uso de diferentes concentraciones de FCS en rangos de 0 a 10%, teniendo como el mejor resultado la concentración de 2.5% de FCS donde se vio que MEM + 2.5% de FCS a 37 °C proporciona condiciones óptimas para la supervivencia, proliferación e identificación de las espermatogonia tipo A y que mayores concentraciones de FCS solo potencian el número de células somáticas (Izadyar et al., 2003). En este trabajo la concentración de FCS no pareció afectar el número de SSC porque el marcador molecular *Gfra1* utilizado es específico para SSC, mientras que en estudios realizados por otros investigadores, el marcador que se utiliza es una lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA), el cual no es un marcador exclusivo de SSC sino que está presente en todas las espermatogonias tipo A en bovinos (Ertl & Wrobel, 1992; F. Izadyar et al., 2002). La literatura reporta que aquellas son las condiciones óptimas para obtener un el mayor número posible de espermatogonias tipo A (población que incluye a las SSC, pero mayoritariamente a sus células hijas, sin propiedades de célula madre y comprometidas a la vía de la diferenciación). En nuestro estudio las células marcadas fueron las SSC, las cuales observamos en números bajos. Las células en los testículos de ratones representan tan solo el 1.3% del total de espermatogonia tipo A (Tegelenbosch & de Rooij, 1993) por lo que el hecho de hallar un número bajo de ellas (tabla 3) es significativo aunque estadísticamente los tratamientos con FCS lograron mayores efectos. Se puede inferir que la mayoría de las espermatogonias que fueron sembradas se diferenciaron.

El crecimiento celular somático durante los 15 días de cultivo se lo midió mediante la confluencia celular. Los pocillos teñidos con hematoxilina, se colocaron bajo un estereoscopio y se tomaron fotos para después calcular la confluencia (Figura 3) de cada uno

de los pocillos, donde se analizó la posible interacción entre la confluencia y los dos tratamientos con FCS (Figura 4). Las pruebas estadísticas revelaron que no existen diferencias significativas en los tratamientos de FCS al 1% y 10% con respecto al desarrollo de la confluencia de las células somáticas en los cultivos a lo largo del tiempo (15 días), sin embargo los cultivos con 10% de FSC alcanzan una confluencia total (Figura 5D y 6D) más rápidamente, particularmente al noveno día, mientras que en los cultivos con 1% de FSC no todos llegaron a alcanzar un 100% de confluencia a este tiempo (Figura 5C y 6C). Además al cabo de pocos días las células somáticas constituyeron una monocapa celular confluyente en donde se observaron espermatogonias rodeadas por células somáticas. Esto concuerda con la literatura, en la cual por ejemplo Izayar y su equipo (2005) observaron que las células somáticas constituían una monocapa celular que en su mayoría eran células de Sertoli que fueron marcadas positivamente para el marcador vimetina, además de demostrar que la temperatura donde se encuentra gran cantidad de colonias espermatogoniales y una monocapa de células somáticas confluyente se da a 37 °C, favoreciendo la proliferación de células de Sertoli, por lo que se infiere que la mayor parte de la monocapa de este estudio está constituida por células de Sertoli (Aponte et al., 2005; Izadyar et al., 2003). Además esto se confirma debido a que las células de Sertoli producen factores de crecimiento esenciales para el mantenimiento de las espermatogonias y un estado de proliferación en este tipo de célula (van der Wee, Johnson, Dirami, Dym, & Hofmann, 2001). La proliferación de las células de Sertoli parece estar relacionado con el grado de confluencia, estas células se organizan alrededor de las áreas vacías, que se asemejan morfológicamente a secciones transversales de los túbulos seminíferos (Aponte, Soda, van de Kant, & de Rooij, 2006).

### **8.3 Proliferación y diferenciación de las espermatogonias**

Se encontró el crecimiento de la monocapa celular a lo largo del tiempo (Figura 5 y 6) lo que indica la proliferación celular general dentro del cultivo a corto plazo. En los primeros



2 aislamientos se trabajó con 50 mil espermatogonias/pocillo (Tabla 2) obteniéndose resultados similares a los expuestos en la literatura cuando se utilizó la misma cantidad de espermatogonias/pocillos. Izadyar *et al* (2003) encontraron a los pocos días de cultivo la monocapa celular de células somáticas con espermatogonias en el centro, mientras que en la segunda y tercera semana observaron un crecimiento de las espermatogonias y la formación de colonias. Observaron además que en el comienzo del cultivo las espermatogonias son redondas con un núcleo esférico con 1 a 3 nucléolos (Izadyar, Den Ouden, et al., 2003) lo que concuerda con los hallazgos encontrados en este cultivo. En el aislamiento 3 se utilizaron 100 mil espermatogonias/pocillo, lo cual combinado con un tratamiento de 10% de FCS generaron que la confluencia se diera de forma rápida, alcanzando una confluencia total desde el día 9 (Figura 4), la mayoría de las monocapas celulares de los pocillos en el día 15 con 10% de FCS se enrollaron sobre si mismas debido a la gran confluencia (Figura 7). Aponte *et al* (2006) realizaron un cultivo de SCC donde colocaron 100 mil espermatogonias/pocillo, donde no se reportó el enrollamiento de la monocapa celular en el día 15, sino que el crecimiento de la misma se dio de forma normal (Aponte et al., 2006). Sin embargo en este último trabajo se incluyó GDNF, factor de proliferación (autorenovación) de las SSC en el medio de cultivo. La explicación más acertada para explicar el fenómeno de enrollamiento es la concentración de FCS utilizada, Aponte *et al* utilizaron una concentración de 2.5% de FCS a diferencia de este estudio en donde la concentración fue de 10% de FCS y como ya se vio antes esto potencia el crecimiento celular.

Con respecto a la diferenciación, en los cortes histológicos de la muestra de testículo de la cual se inició el cultivo celular se observan túbulos seminíferos donde todavía no se ha formado el lumen, con varios gonocitos que aún no se han diferenciado en espermatogonia tipo A, además de gran cantidad de células de Sertoli indiferenciadas (Figura 8). En el cultivo celular se hallaron células espermatogoniales marcadas positivamente para *Gfra1*, pero

también se encontraron gran cantidad de espermatogonias sin marcar, lo que indica que ha existido diferenciación de gonocitos en espermatogonias *Gfra1* positivas y estas en espermatogonias tipo A. En la literatura se reporta que hasta los 3 meses de edad de los terneros solo presentan gonocitos y células de Sertoli inmaduras en los cortes histológicos, mientras que para los 5 meses de edad las espermatogonias se convierten en la célula germinal más común encontrada en la membrana basal de los túbulos seminíferos y rodeada por células de Sertoli; además tampoco se reportó en nuestro trabajo lumen central, lo que contrasta con lo encontrado para los 7 meses de edad en terneros de raza Holstein, en los cuales el diámetro de los túbulos seminíferos aumenta y ya se observa la presencia del lumen (Izadyar et al., 2002; Izadyar et al., 2003).

#### **8.4 Identificación molecular**

En la tabla 3 se observa el resultado de las células germinales marcadas positivamente para el marcador *Gfra1* durante los 15 días de cultivo (evaluadas cada 3 días) en tres aislamientos. Se realizó una inmunohistoquímica para cada uno de los tratamientos cada tres días, y en cada tratamiento se encontraron células marcadas positivamente. Los controles negativos, en los cuales no se colocó el anticuerpo primario, no mostraron reacción. En la figura 9 se observan 3 diferentes campos microscópicos que muestran células *Gfra1* positivas marcadas con DAB, las cuales tienen una forma redondeada y están completamente de color marrón (inmuno-marcación positiva) y rodeadas por células somáticas obviamente no marcadas. Por otro lado, reacciones de inmunohistoquímica seriadas en el tiempo con el marcador *Gfra1* no han sido realizadas previamente. La forma de identificar las espermatogonias tipo A en bovinos es mediante el uso del marcador DBA, una lectina con afinidad específica a  $\alpha$ -D-GalNAc, el cual se encuentra en el aparato de Golgi de las espermatogonias (Aponte et al., 2006; Ertl & Wrobel, 1992; Izadyar et al., 2002). Para marcar las células diferenciadas de la espermatogonia tipo A se utiliza marcador c-kit

(Izadyar et al., 2002; Izadyar et al., 2003). La literatura indica que al usar inmunohistoquímica varios genes específicos reconocen a la pre-espermatogonia tipo A tales como PLZF, NGN3, SOX, GFR $\alpha$ 1, entre otros (Aponte et al., 2005). En la actualidad se cuenta con un nuevo factor de transcripción identificado, el PAX7 que se utiliza como marcador específico para espermatogonias tipo A<sub>single</sub> en ratones (Aloisio et al., 2014).

En la figura 11 se observa el efecto que tiene el FCS sobre el número de células Gfr $\alpha$ 1 positivas/cm<sup>2</sup>, no encontrándose una diferencia significativa entre los tratamientos con FCS y el número de Gfr $\alpha$ 1 positivas/cm<sup>2</sup>, pero la tendencia que se observa es una caída de células Gfr $\alpha$ 1 positivas a partir del día 6 en adelante muy posiblemente debido a la diferenciación de estas células. La Gfr $\alpha$ 1 es el receptor específico para la GDNF, que normalmente es secretada por las células de Sertoli en el testículo. Este factor de crecimiento regula el destino de las SSC, además en cultivos *in vitro* la GDNF promueve la proliferación de las células de Sertoli (Meng et al., 2000). Posiblemente la disminución de células Gfr $\alpha$ 1 positivas en nuestro trabajo se debió a que estas pudieron diferenciarse a causa de bajas concentraciones de GDNF secretada por las células de Sertoli presentes en el cultivo, a su vez quizás debido a la ausencia de hormonas gonodotrofinas en suficientes cantidades en el suero. La GDNF afecta de forma directa al número de espermatogonias tipo A los primeros días de cultivo y es un factor indispensable para la autorenovación de las SSC (Aponte et al., 2006; Takashima et al., 2015). Todos los datos recolectados son muy importantes en especial los de células Gfr $\alpha$ 1 positivas ya que la expresión de Gfr $\alpha$ 1 en los testículos de toro no ha sido reportada (Reding et al., 2010).

## 9 CONCLUSIONES

- En este estudio se cumplió con el objetivo general ya que se encontraron células GFR $\alpha$ 1 positivas que son sugerentes de ser SSC, lo cual en bovinos no ha sido validado por medio de trasplante la funcionalidad de estas células por lo que se debe tener cautela antes de concluir que son SCC.
- El plaqueo diferencial ayudó a la purificación de la suspensión celular para obtener mayores porcentajes de células germinales.
- En este estudio se observó que el cultivo a corto plazo funcionó muy bien para mantener células GFR $\alpha$ 1 positivas
- No se encontró una diferencia estadística significativa con el uso de FCS a 1% o 10%, con respecto al número de células GFR $\alpha$ 1 positivas, con excepción del día 9 de cultivo donde los tratamientos mostraron ser distintos, por lo que 1% podría sugerirse como un porcentaje adecuado de suero con la adición de factores de crecimiento estimulantes de la proliferación de SSC (GDNF, bFGF).
- Estadísticamente los tratamientos de FSC (1% vs 10%) fueron iguales con respecto a la confluencia celular, cabe recalcar que con la concentración 10% de FCS se llega a una confluencia completa a partir del día 9 de cultivo.
- Se encontró que si existió diferenciación celular en el cultivo, ya que se hallaron gran número de espermatogonias tipo A sin la marca positiva para GFR $\alpha$ 1, lo que indica su diferenciación, además de que en el corte histológico del testículo los gonocitos fueron la célula germinal más prevalente.
- Se probó con éxito el uso del marcador GFR $\alpha$ 1 para la identificación de SSC en un cultivo a corto plazo donde se realizaron reacciones inmunohistoquímicas seriadas, obteniendo células positivas en cada evaluación.

## 10 RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar terneros con edades entre los 3 - 7 meses ya que en estos las células germinales presentes con mayor frecuencia en los túbulos seminíferos son las espermatogonias de tipo A.
- Es recomendable añadir un paso de purificación con gradientes de concentración como de Percoll después del plaqueo diferencial para obtener una mayor concentración de espermatogonias de tipo A antes de su siembra.
- En el día 9 donde se observa diferencia significativa entre tratamientos se recomienda realizar un pasaje de células a otro frasco de cultivo para evitar que la confluencia limite la renovación de las SSC. Este sería el punto de inicio para cultivos de largo plazo que necesariamente requieren de estos pasajes
- Se recomienda filtrar el DAB previo su utilización para evitar la acumulación de cristales de DAB en el cultivo celular.
- Se recomienda validar la identificación molecular de SSC con el marcador  $GFR\alpha 1$  por medio de un trasplante de estas células a ratones sin espermatogénesis endógena para evaluar la restitución de la espermatogénesis (Prueba funcional).
- Se recomienda probar de otros marcadores específicos para SSC como el PLZF, THY1 o PAX7 para ampliar el estudio realizado en este trabajo.
- Se sugiere además establecer controles negativos externos a través de líneas celulares que no exprese el receptor  $Gfra1$ .

## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aloisio, G. M., Nakada, Y., Saatcioglu, H. D., Peña, C. G., Baker, M. D., Tarnawa, E. D., ...

Castrillon, D. H. (2014). PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(9), 3929–3944.

<https://doi.org/10.1172/JCI75943>

Aponte, P. M. (2015). Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, *7*(4), 669–680.

<https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i4.669>

Aponte, P. M., & De Rooij, D. G. (2009). Biomanipulation of bovine spermatogonial stem cells. *Animal Reproduction*, *5*, 16–22.

Aponte, P. M., Soda, T., Teerds, K. J., Mizrak, S. C., van de Kant, H. J. G., & de Rooij, D. G.

(2008). Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*, *136*(5), 543–557. <https://doi.org/10.1530/REP-07-0419>

Aponte, P. M., Soda, T., van de Kant, H. J. G., & de Rooij, D. G. (2006). Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology*, *65*(9), 1828–1847.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.020>

Aponte, P. M., Van Bragt, M. P. A., De Rooij, D. G., & Van Pelt, A. M. M. (2005).

Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. *APMIS*, *113*(11–12), 727–742. [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm\\_302.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_302.x)

Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., & Dym, M.

(1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological

characterization. *The Journal of Cell Biology*, 74(1), 68–85.

<https://doi.org/10.1083/jcb.74.1.68>

De Rooij, D. G., & Russell, L. D. (2000). All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. *Journal of Andrology*, 21(6), 776–798.

<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03408.x>

Ertl, C., & Wrobel, K. H. (1992). Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Histochemistry*, 97(2), 161–171.

FAO. (2014, March 7). FAO - División de Producción y Sanidad Animal. Retrieved September 4, 2017, from [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/animal\\_production.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/animal_production.html)

FAO. (2016, April 26). FAO - División de Producción y Sanidad Animal. Retrieved November 6, 2017, from <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/home.html>

FAO. (2017a). Boletín Informativo - FAO Ecuador. Retrieved September 4, 2017, from <http://www.fao.org/publications/card/es/c/703ca9ad-16bf-44d5-bc7c-d691f01ca48f/>

FAO. (2017b, June). Food Outlook. Biannual Report on Global Food Markets. Retrieved September 4, 2017, from <http://www.fao.org/3/a-i7343e.pdf>

Grisanti, L., Falciatori, I., Grasso, M., Dovere, L., Fera, S., Muciaccia, B., ... Vicini, E. (2009). Identification of Spermatogonial Stem Cell Subsets by Morphological Analysis and Prospective Isolation. *STEM CELLS*, 27(12), 3043–3052.

<https://doi.org/10.1002/stem.206>

Guan, K., Nayernia, K., Maier, L. S., Wagner, S., Dressel, R., Lee, J. H., ... Hasenfuss, G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440(7088), 1199–1203. <https://doi.org/10.1038/nature04697>

- Hafez, E. S. . (1974). *Reproduction in farm animals* (3rd ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Hofmann, M.-C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *288*(1–2), 95–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.012>
- Izadyar, F., Den Ouden, K., Creemers, L. B., Posthuma, G., Parvinen, M., & De Rooij, D. G. (2003). Proliferation and differentiation of bovine type A spermatogonia during long-term culture. *Biology of Reproduction*, *68*(1), 272–281.
- Izadyar, F., den Ouden, K., Creemers, L. B., Posthuma, G., Parvinen, M., Rooij, D., & G, D. (2003). Proliferation and Differentiation of Bovine Type A Spermatogonia During Long-Term Culture. *Biology of Reproduction*, *68*(1), 272–281.  
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004986>
- 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)*, *124*(1), 85–94.
- Kanatsu-Shinohara, M., Takehashi, M., & Shinohara, T. (2008). Brief History, Pitfalls, and Prospects of Mammalian Spermatogonial Stem Cell Research. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *73*, 17–23.  
<https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.033>
- MAGAP. (2016). La Políticas Agropecuarias al 2025 I parte. Retrieved November 6, 2017, from  
<http://servicios.agricultura.gob.ec/politicas/La%20Pol%C3%ADticas%20Agropecuarias%20al%20%202025%20I%20parte.pdf>
- Meng, X., Lindahl, M., E. Hyvönen, M., Parvinen, M., G. de Rooij, D., Hess, M. W., ... Sariola, H. (2000). Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiated Spermatogonia by



GDNF. *Science (New York, N.Y.)*, 287, 1489–93.

<https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1489>

Nagano, M., Avarbock, M. R., Leonida, E. B., Brinster, C. J., & Brinster, R. L. (1998). Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue and Cell*, 30(4), 389–397.

[https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(98\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(98)80053-0)

Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1546), 1663–1678. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026>

Pro Ecuador. (2016). Perfil Sectorial de Lácteos y Cárnicos 2016. Retrieved September 4, 2017, from [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/proec\\_psi2016\\_lacteos.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/proec_psi2016_lacteos.pdf)

Reding, S. C., Stepnoski, A. L., Cloninger, E. W., & Oatley, J. M. (2010). THY1 is a conserved marker of undifferentiated spermatogonia in the pre-pubertal bull testis. *Reproduction*, 139(5), 893–903. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0513>

Seandel, M., James, D., Shmelkov, S. V., Falciatori, I., Kim, J., Chavala, S., ... Rafii, S. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*, 449(7160), 346–350. <https://doi.org/10.1038/nature06129>

Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., ... Shinohara, T. (2015). Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 4(3), 489–502. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.010>

Tegelenbosch, R. A., & de Rooij, D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research*, 290(2), 193–200.

- van der Wee, K. S., Johnson, E. W., Dirami, G., Dym, T. M., & Hofmann, M. C. (2001). Immunomagnetic isolation and long-term culture of mouse type A spermatogonia. *Journal of Andrology*, *22*(4), 696–704.
- van Pelt, A. M., Morena, A. R., van Dissel-Emiliani, F. M., Boitani, C., Gaemers, I. C., de Rooij, D. G., & Stefanini, M. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*, *55*(2), 439–444.
- Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y. (2007). A Vasculature-Associated Niche for Undifferentiated Spermatogonia in the Mouse Testis. *Science*, *317*(5845), 1722–1726. <https://doi.org/10.1126/science.1144885>
- Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., & Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, *147*(3), R65–R74. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0466>

## 12 ANEXO A: TABLAS

**Tabla 1**

**Tabla 1:** Porcentaje de espermatogonias vivas vs espermatogonias muertas, además del porcentaje de células somáticas vivas vs somáticas muertas

Aislamiento	Espermatogonias vivas (%)	Espermatogonias Muertas (%)	Somáticas vivas (%)	Somáticas muertas (%)
1	41,96	4,46	37,50	16,08
2	26	3,3	50,7	20
3	55,16	1,42	27,76	15,66

**Tabla 2**

**Tabla 2:** Valores de espermatogonias totales obtenidos previo el cultivo y después del plaqueo diferencial.

Aislamiento	Volumen de suspensión celular (μl)	# Espermatogonias/μl	#Total espermatogonias vivas	# Total de Espermatogonias	# Espermatogonias /pocillo
1	550	3800	1594,48	876964	50000
2	2000	17250	4485	8970000	50000
3	920	13025	7184,6	6609840	100000

**Tabla 3**

**Tabla 3:** Número de células GFRα1 positivas halladas por pocillo analizado a distintas concentraciones de FSC en un cultivo de 15 días

Células Positivas para Gfrα1										
Días	3		6		9		12		15	
Concentración de FCS	1%	10%	1%	10%	1%	10%	1%	10%	1%	10%
Aislamiento 1	7	2	-	-	-	-	5 y 1	1 y 1	0 y 1	0 y 0
Aislamiento 2	0	1	5 y 2	9 y 5	2 y 0	5 y 6	0 y 2	5 y 0	3 y 4	4 y 4
Aislamiento 3	0 y 1	3 y 2	3 y 0	4 y 4	1 y 2	3 y 3	1 y 2	1 y 1	5 y 4	1 y 0

## 13 ANEXO B: FIGURAS

Figura 1

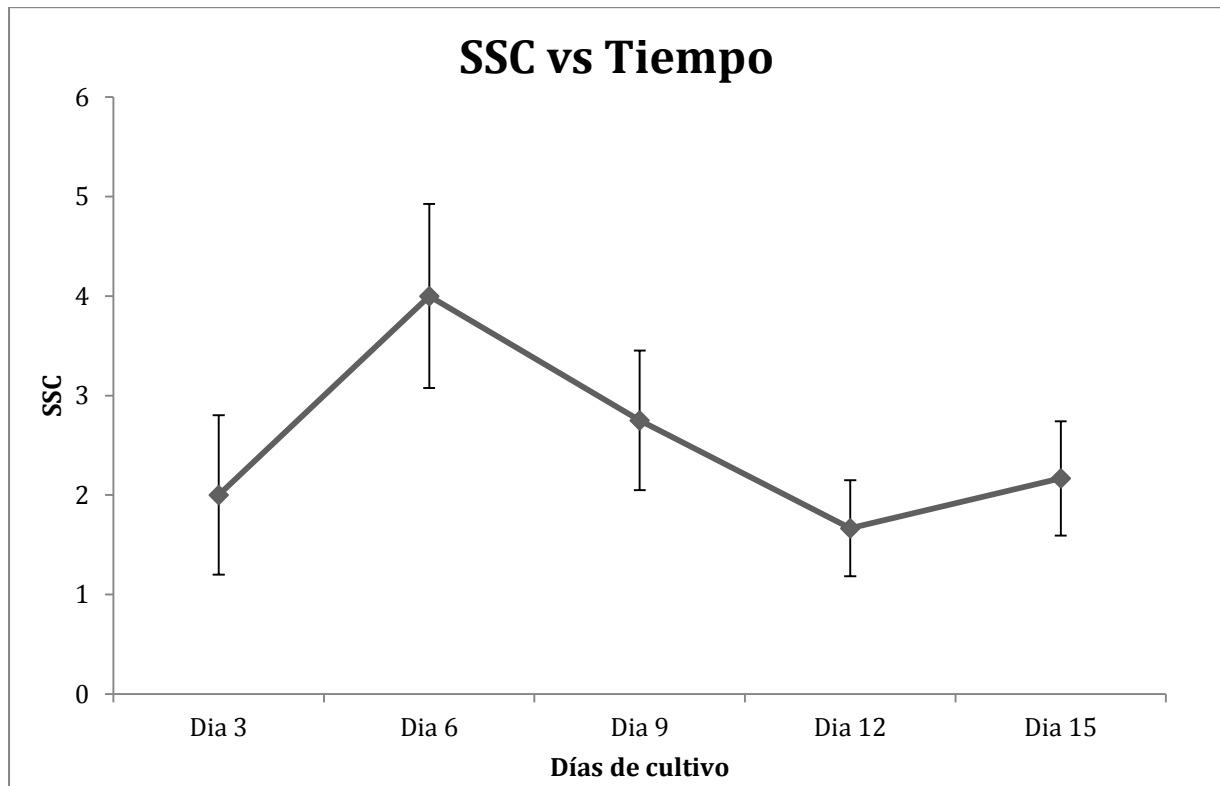


Figura 1: Número de SSC (media  $\pm$  SEM) con respecto al tiempo en el cultivo de corto tiempo (15 días)

Figura 2

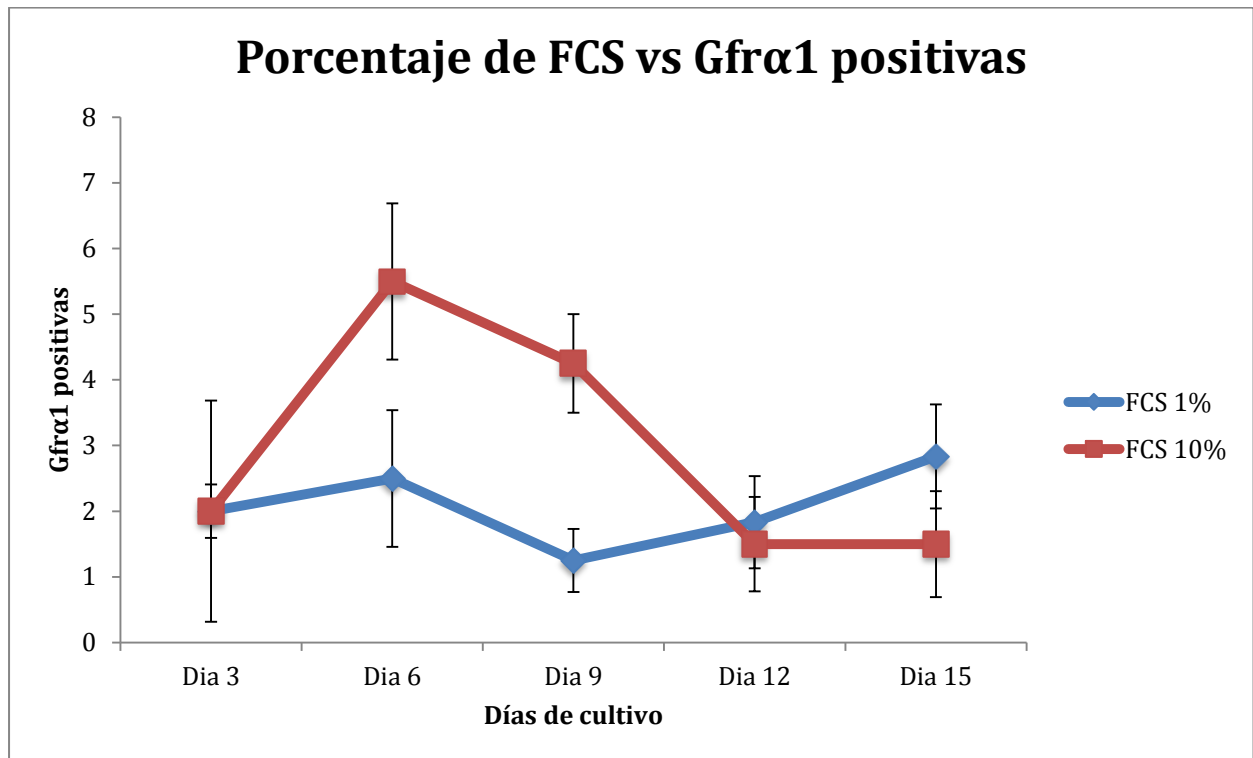


Figura 2: Efecto de los 2 tratamientos de FCS al 1% y 10% sobre el número de espermatogonias Gfr $\alpha$ 1 positivas por pocillo (media  $\pm$  SEM).

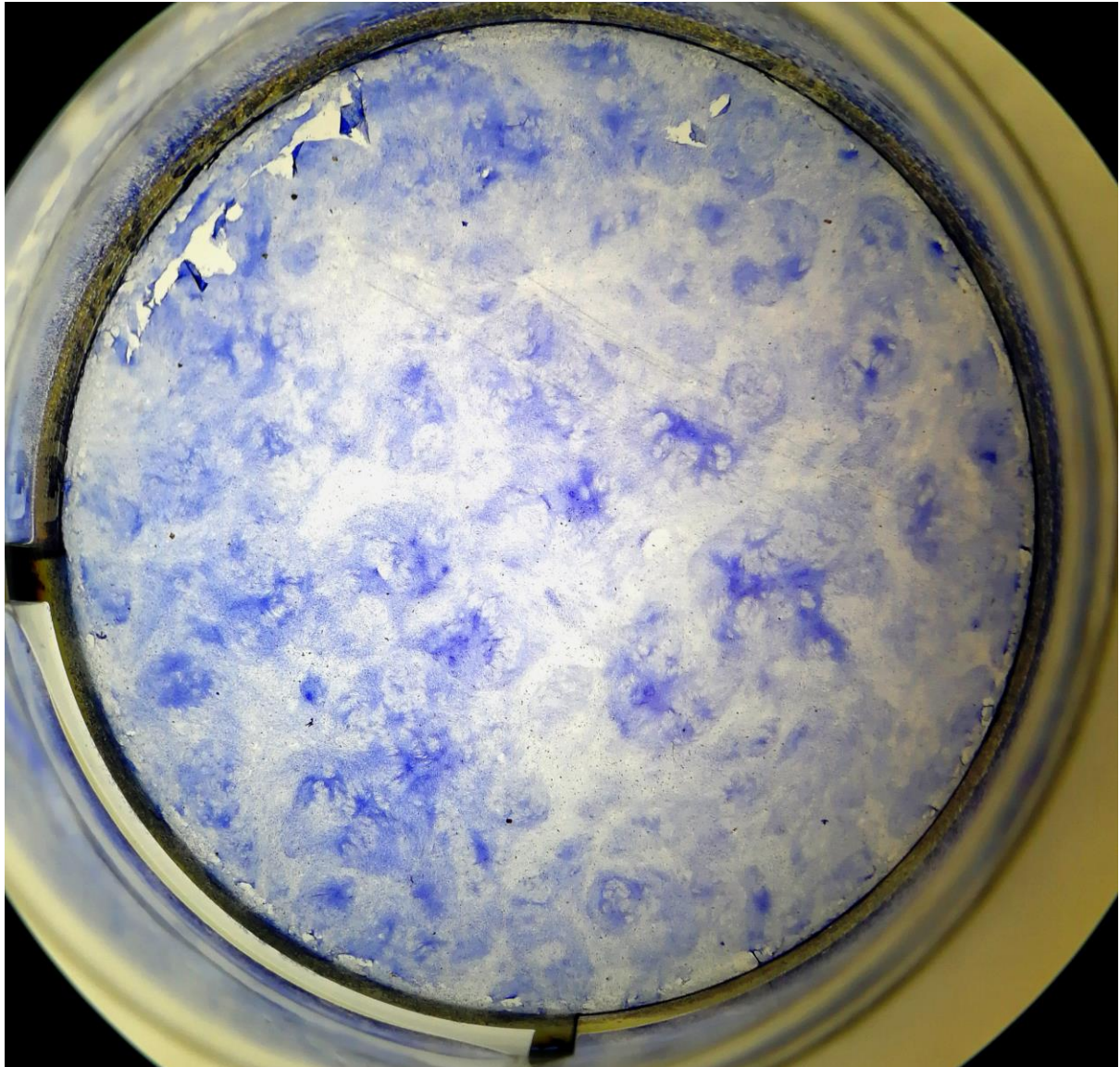
**Figura 3**

Figura 3: Pocillo que muestra la monocapa celular teñida con hematoxilina para medir la confluencia celular de una muestra del Aislamiento 3, día 15 con 1% de FSC

Figura 4

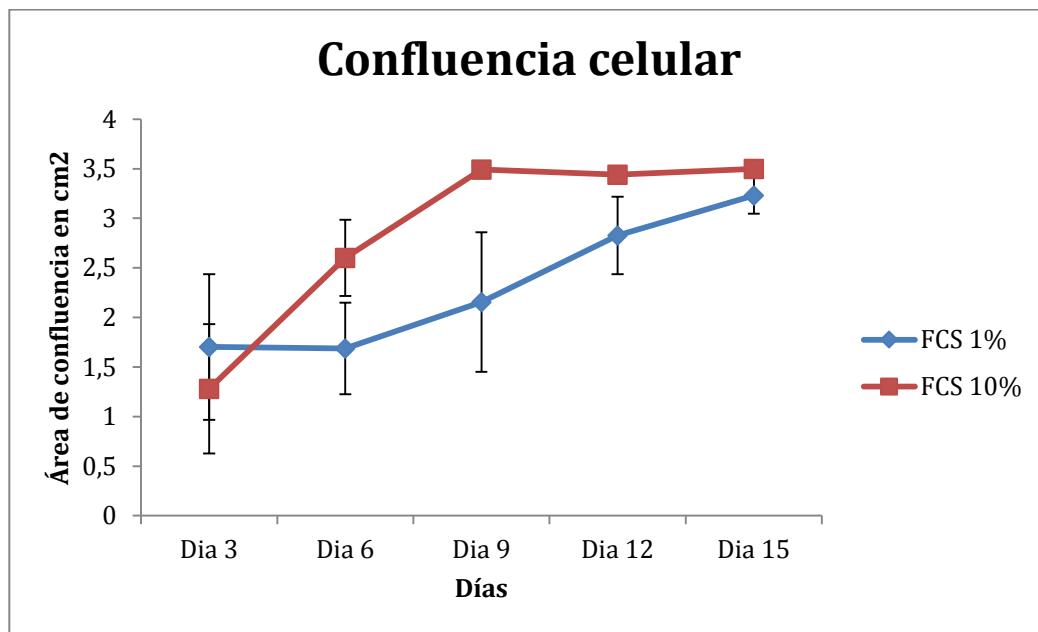


Figura 4: Efecto del FCS sobre la confluencia celular a lo largo de los días de cultivo. El área del pocillo en placas de 12 pocillos es de 3.5 cm<sup>2</sup> (área de confluencia máxima que equivale al 100%)



Figura 5

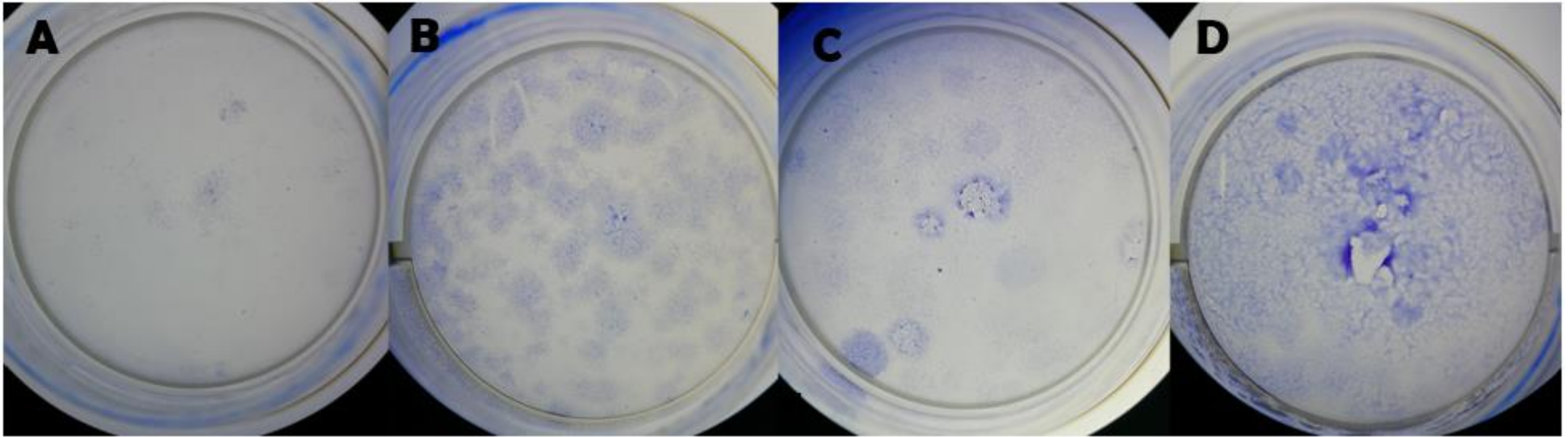


Figura 5: Crecimiento de la monocapa celular del aislamiento 2, con 50 mil espermatogonias sembradas por pocillo. A: 29%. B: 62%. C: 64% y D: 91%

Figura 6

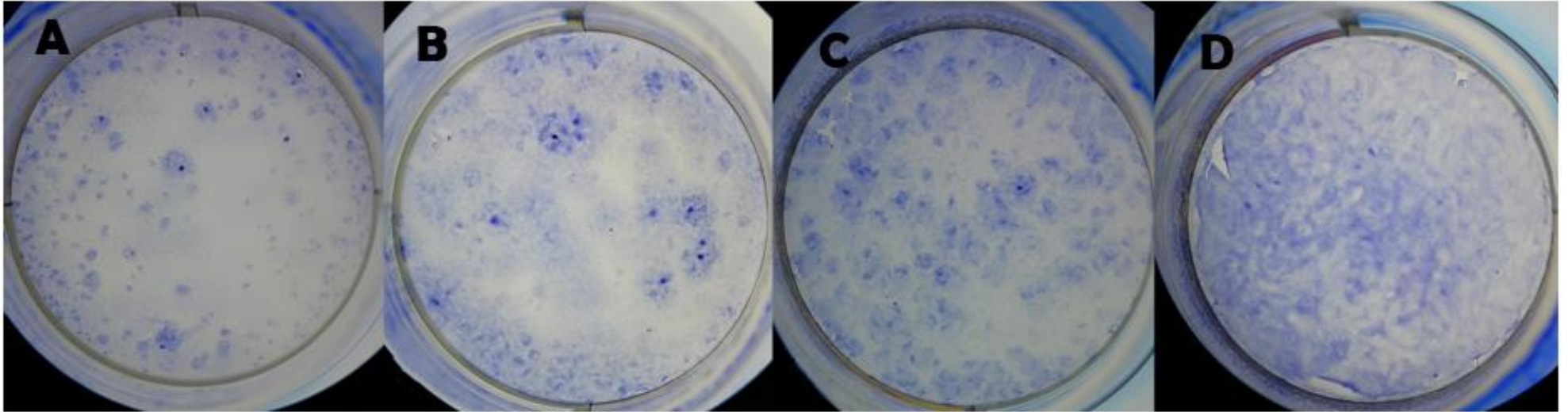


Figura 5: Crecimiento de la monocapa celular del aislamiento 3 con 100mil espermatogonias sembradas por pocillo. A: 64%. B: 93%. C: 100% y D: 100%

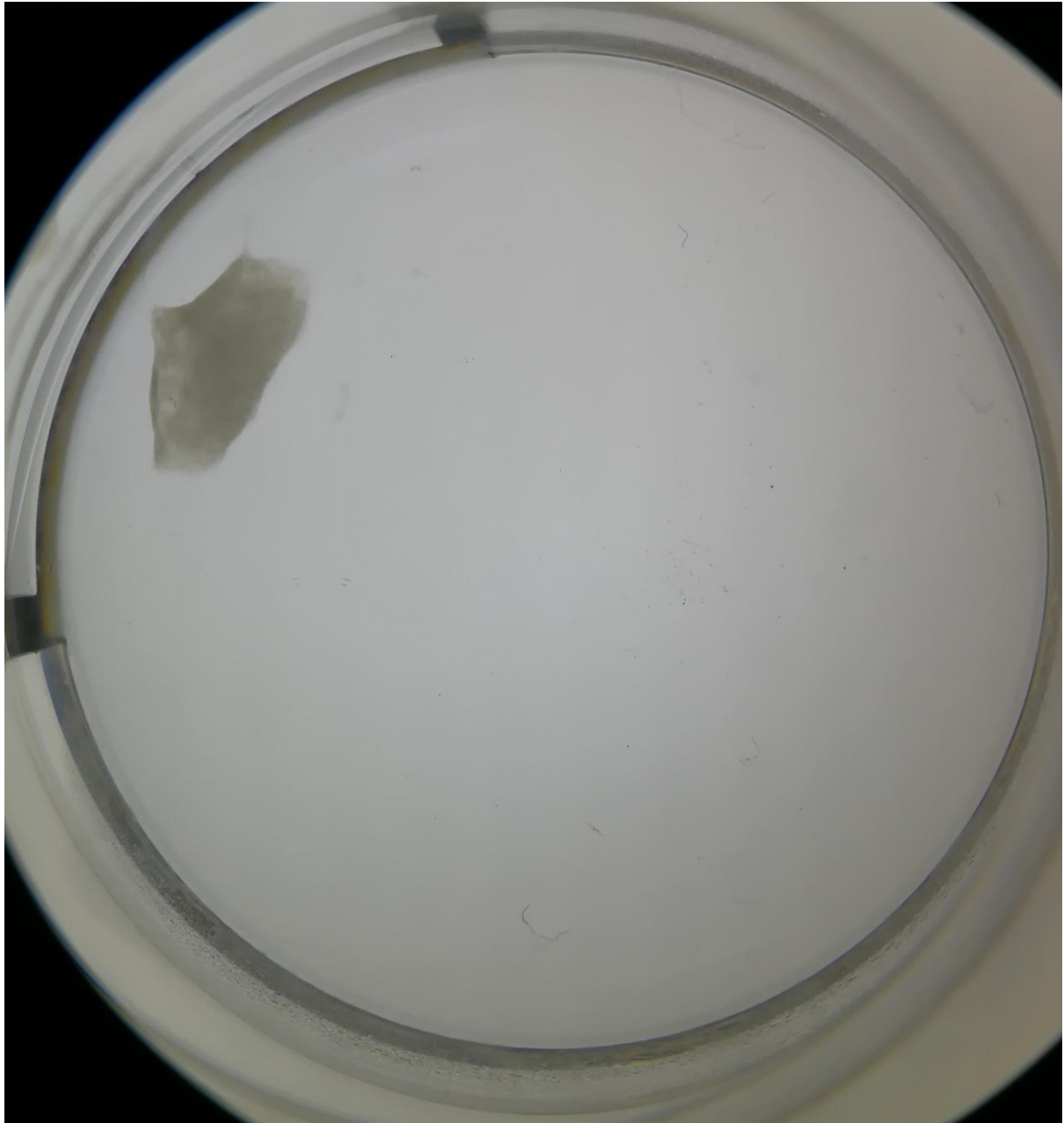
**Figura 7**

Figura 7: Monocapa celular enrollada en el aislamiento 3 día 15 con una concentración de 10% de FCS

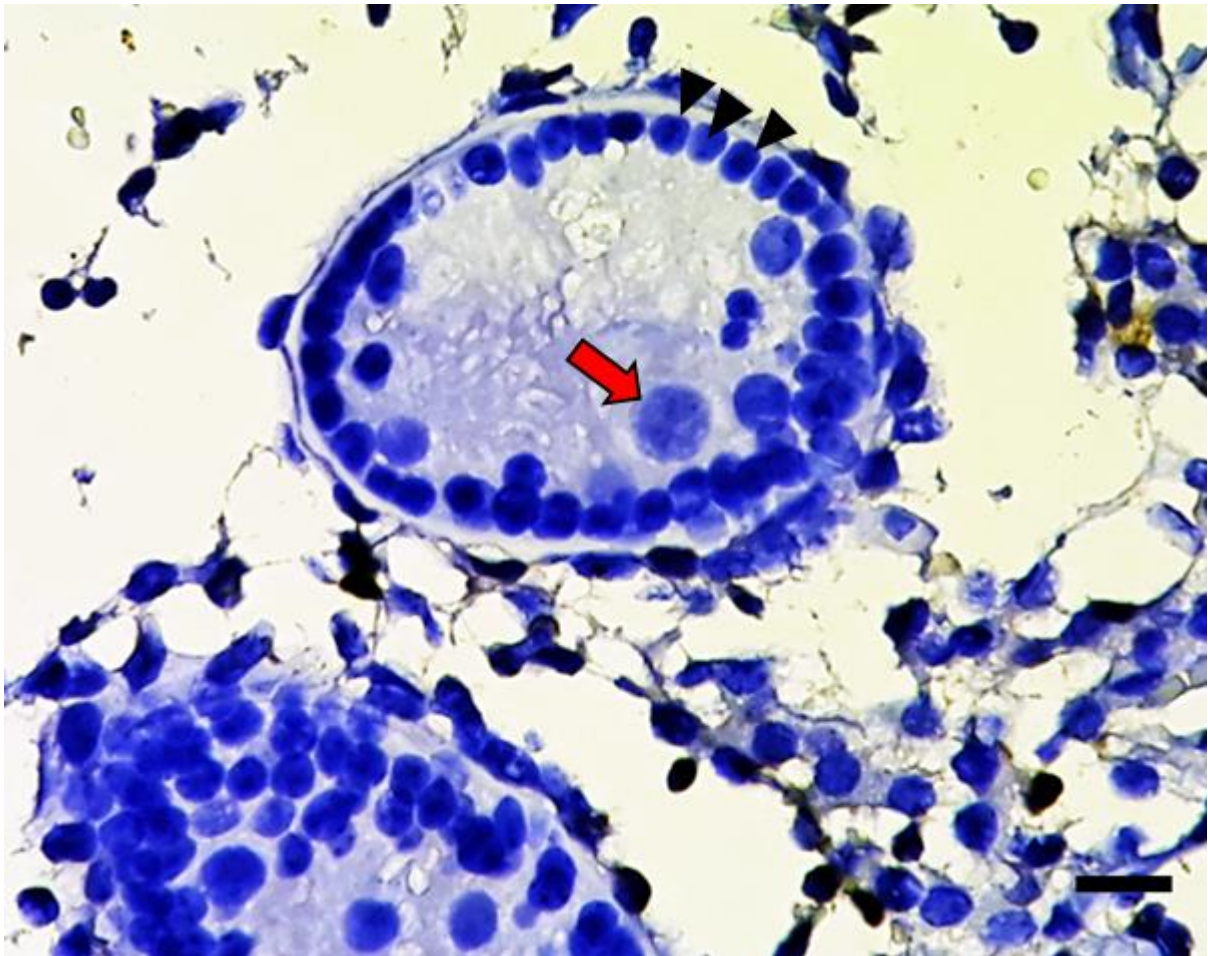
**Figura 8**

Figura 8: Corte histológico de 5µm de testículo de bovino de un mes y medio de edad donde se pueden evidenciar células de Sertoli indiferenciadas (punta de flecha negras) y gonocitos (flecha roja). Coloración hematoxilina. Barra = 20 µm

Figura 9

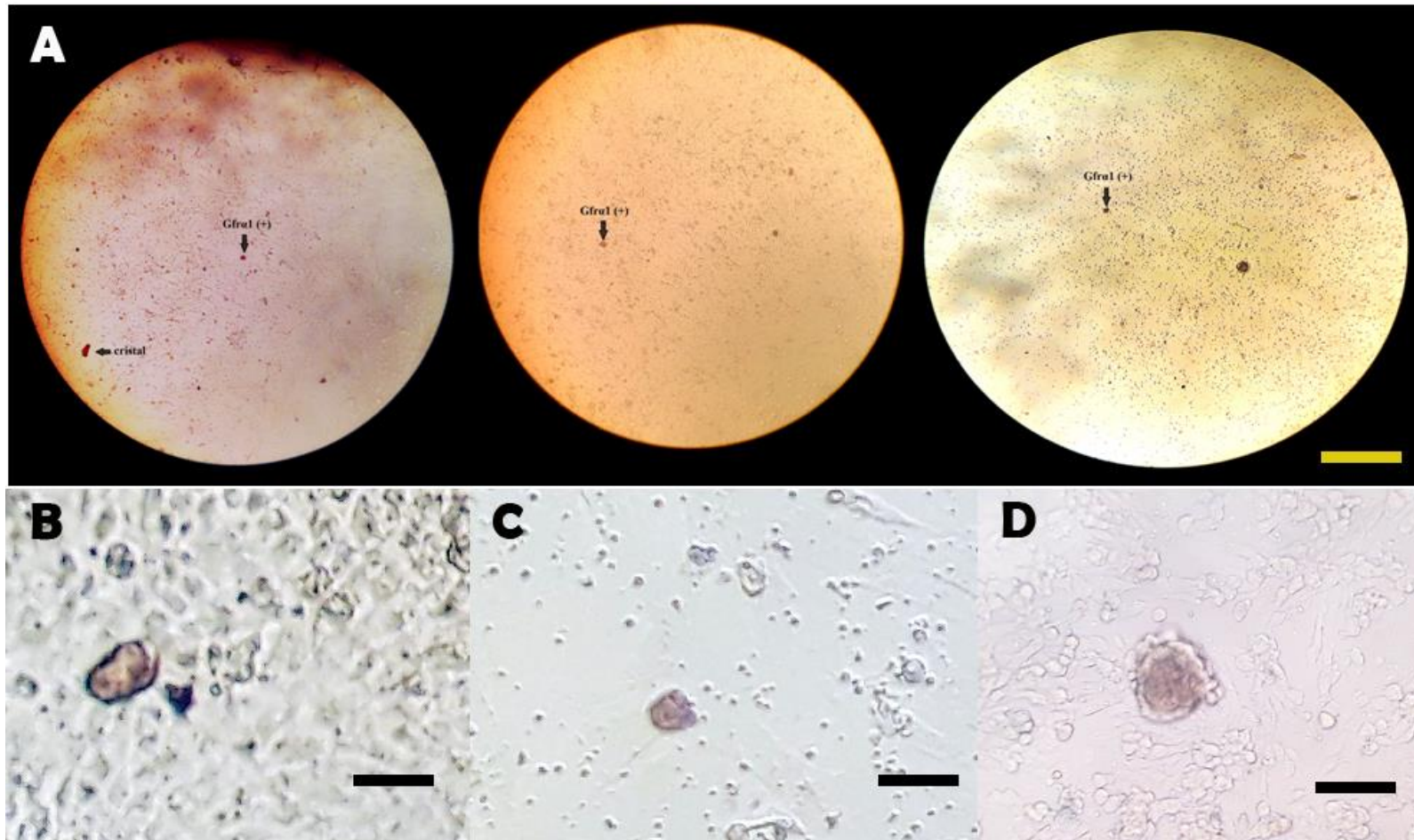


Figura 9: Células positivas para el marcador  $GFR\alpha 1$  en cultivo de espermatodonias bovinas a corto plazo (15 días). Inmunohistoquímica indirecta con inmunoperoxidasa – DAB. A) Se observan tres campos indistintos con células marcadas poritivamente para el marcador  $GFR\alpha 1$  en el cultivo corto de 15 días. Barra = 90  $\mu m$  B) Dos células  $GFR\alpha 1$  positivas (ocurrencia muy rara en los cultivos). Barra = 30  $\mu m$  C) célula aislada  $GFR\alpha 1$  positiva. Barra 30  $\mu m$  D) Pequeña colonia de aproximadamente 4 células  $GFR\alpha 1$  (Ocurrencia muy rara en los cultivos). Barra = 30  $\mu m$

Figura 10

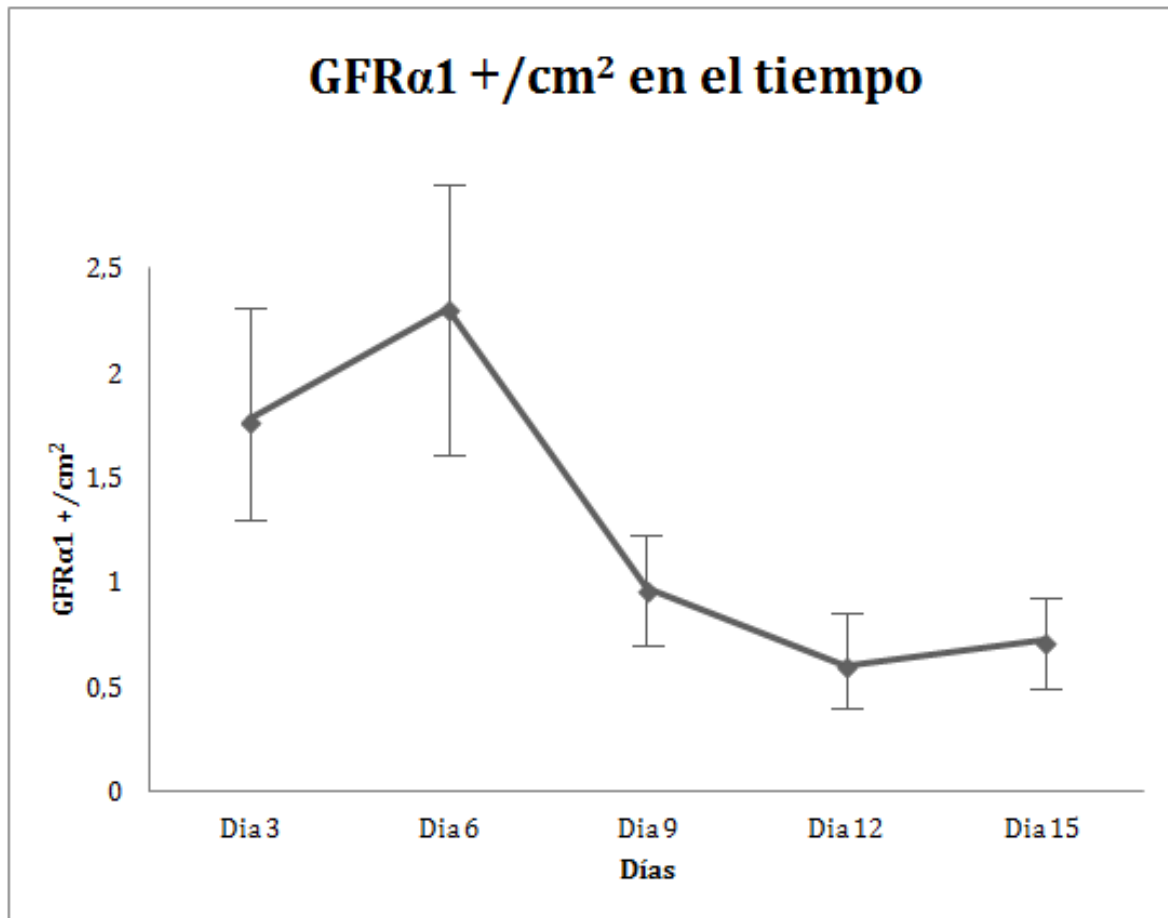
Figura 10: Número de células GFRα1 +/- cm<sup>2</sup> general con respecto al tiempo (media ± SEM).

Figura 11

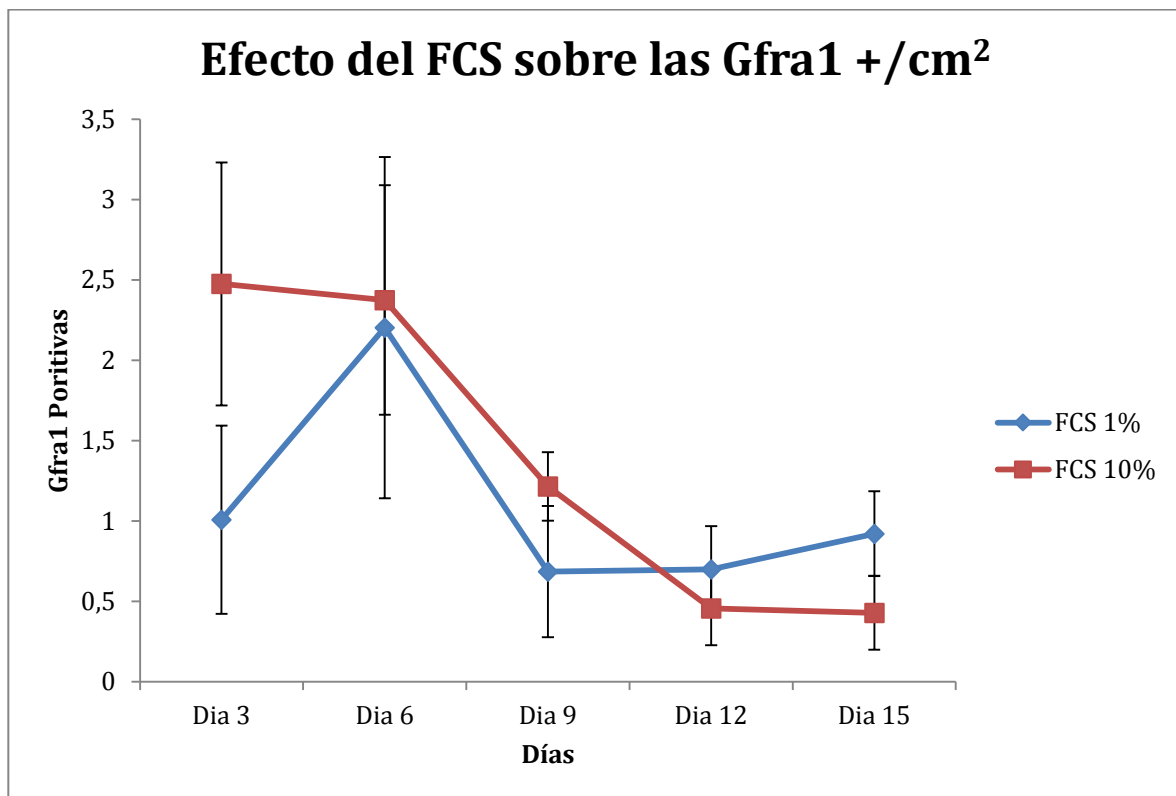


Figura 11: El efecto del FCS en distintas concentraciones sobre el número de GFR $\alpha$ 1 +/cm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SEM).