

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Modelo rumiante de criopreservación de tejido testicular en
la preservación de germoplasma animal.**

Proyecto de investigación.

Francisco Gerardo Canet Suquillo

Ingeniería En Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 14 de diciembre de 2017

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

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Modelo rumiante de criopreservación de tejido testicular en la preservación
de germoplasma animal.**

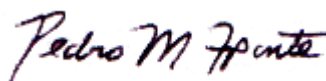
Francisco Gerardo Canet Suquillo

Calificación: 91

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte , PhD

Firma del profesor



Quito, 14 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: Francisco Gerardo Canet Suquillo

Código: 00110944

Cédula de Identidad: 1714422456

Lugar y fecha: Quito, 14 diciembre de 2017

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad San Francisco de Quito por permitirme realizar este trabajo en sus instalaciones.

A mis profesores, especialmente a Pedro Aponte por permitirme ser su tesista y guiarme a lo largo de este proceso.

A mis padres, familia y amigos que me apoyaron durante toda la carrera.

RESUMEN

La criopreservación de tejido testicular es una técnica que puede facilitar la preservación del potencial reproductivo de distintas especies animales, principalmente animales de alto valor genético que todavía no alcanzan la pubertad y por lo que no es posible la criopreservación de su semen, y en animales silvestres para los cuales existen pocos protocolos para aislamiento y cultivo de sus células madre espermatogoniales (SSCs). Esto es posible gracias a que el tejido testicular contiene espermatogonias, dentro de las cuales existe una subpoblación que posee características de SSCs. El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo bovino de criopreservación de tejido testicular para la preservación de germoplasma, mediante el aislamiento y cultivo *in vitro* de espermatogonias tipo A GFR α^+ , las cuales se consideran las SSCs en los bovinos. Dos aspectos hacen único a este trabajo, el primero es una prueba concepto para verificar que las células madre espermatogoniales sobreviven a la criopreservación, mediante la identificación de un marcador específico, y segundo la utilización de tejido testicular integro criopreservado bajo una modificación del protocolo usado previamente en suspensiones celulares. Para alcanzar este objetivo se realizaron dos ensayos de criopreservación de tejido testicular utilizando dos crioprotectores distintos (Tratamiento A y B) y posterior a la descongelación se realizó el aislamiento, cultivo e identificación molecular de espermatogonias tipo A GFR α^+ . El crecimiento de estas células en cultivo fue comparado con aquellas extraídas a partir de tejido testicular fresco, sin criopreservar (control). Se encontró que estructura de los túbulos seminíferos del tejido testicular criopreservado se mostraba intacta después de la descongelación, pero a pesar de los porcentajes de viabilidad de espermatogonias tipo A ser similares en el control (tejido fresco) y los tejidos descongelados ($p < 0,05$), se redujo el número absoluto (rendimiento) de espermatogonias tipo A vivas en la muestra obtenida del aislamiento ($p < 0,05$). A pesar de esto no existió diferencia significativa en la densidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ alcanzada durante los 12 días de cultivo, entre las células obtenidas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado ($p < 0,05$), demostrando que estas células retienen su capacidad de proliferación después de ser criopreservadas.

Palabras clave: Célula madre espermatogonial (SSC), receptor GFR α_1 , criopreservación, espermatogonia, germoplasma.

ABSTRACT

The cryopreservation of testicular tissue is an approach that can facilitate the preservation of the reproductive potential of several animal species, mainly that of animals of high genetic value that did not yet reach puberty and therefore do not produce sperm that can be cryopreserved and in wild animals for which only few protocols for the isolation and *in vitro* culture of their spermatogonial stem cells (SSCs) exist. This is possible because of the presence of spermatogonia in the testicular tissue, a cell population containing a subset of spermatogonia with SSC properties. The objective of this work is to develop a bovine model for the cryopreservation of testicular tissue for the preservation of germplasm through the isolation and *in vitro* culture of spermatogonia type A GFR α +, which are considered the germ stem cells in bovines. Two aspects make this work unique, first the fact of being a proof of concept to verify that SSCs survive cryopreservation through the detection of the specific marker GFR α 1, and second the use of whole testicular tissue cryopreserved under a modified protocol used previously for cell suspensions. To achieve this objective, two whole testicular tissue cryopreservation assays using two distinct cryoprotectants (Treatment A and B) were carried on. After cell thawing we proceeded with the isolation, culture and molecular identification of spermatogonia type A GFR α +. The growth of these cells was compared with those extracted from fresh testicular tissue (control). From these experiments, it was found that the structure of the seminiferous tubes was intact after thawing, and although Type A spermatogonia viability (%) was similar to fresh non frozen tissues ($p > 0.05$) a reduction in absolute numbers (yield) of viable spermatogonia type A in the sample was observed after the isolation ($p < 0.05$). Despite this, there was no significant difference in the density of spermatogonia type A GFR α + achieved from the 12 days long culture between the cells obtained from fresh testicular tissue or cryopreserved ($p > 0.05$), evidencing that these cells retain their capacity of proliferation after being cryopreserved.

Key words: Spermatogonial stem cell (SSC), GFR α 1 receptor, spermatogonium, germplasm,

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción	10
1.1	Antecedentes de la biotecnología reproductiva.....	10
1.2	Preservación in vivo de germoplasma animal.....	11
1.3	Preservación de germoplasma animal in vitro	11
1.4	Criopreservación de tejido testicular	13
1.5	Trasplante de tejido testicular y de células madre espermatogoniales (SSCs) ..	14
1.6	Espermatogénesis in vitro.....	16
1.7	Métodos de criopreservación de tejido gonadal.....	18
1.8	Células madre espermatogoniales como modo de preservación de germoplasma	19
2	Objetivos	22
2.1	Objetivo General.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	Justificación	23
4	Area de estudio	25
5	Materiales	26
5.1	Obtención del material biológico	26
5.2	Criopreservación del tejido	26
5.3	Aislamiento y cultivo de células madre espermatogoniales	27
5.4	Histología e inmunohistoquímica	28
6	Metodos	30
6.1	Obtención del material biológico	30
6.2	Preparación del material biológico para la criopreservación.....	30
6.3	Aislamiento y cultivo celular.....	31
6.4	Fijación de las células cultivadas.....	33
6.5	Inmunohistoquímica.....	34
6.6	Determinación de la confluencia celular	34
6.7	Inclusión de las muestras en parafina	35
6.8	Histología del tejido testicular.	36
7	Resultados	37
7.1	Estructura del tejido testicular post-congelación.	37
7.2	Aislamiento celular de tejido fresco (control) y criopreservado.....	37
7.3	Densidad celular de espermatogonias tipo A GFR α^+ alcanzada durante cultivo corto	38
7.4	Dinámica del crecimiento de SSCs durante cultivo corto.	38
8	Discusion	41
8.1	Estructura del tejido testicular post-congelación.	41
8.2	Aislamiento celular de tejido fresco (control) y criopreservado.....	41
8.3	Dinámica del crecimiento de SSCs durante el cultivo corto.....	44
9	Conclusiones	48
10	Recomendaciones	49
11	Referencias bibliográficas	50
12	Anexo A: Tablas	55
13	Anexo B: Figuras	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: supervivencia celular después del aislamiento pre y post-congelación.....	55
Tabla 2: Preparación del medio de criopreservación.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Corte histológico del tejido testicular criopreservado bajo el tratamiento A. Tinción hematoxilina. Barra = 100 μm	56
Figura 2: Corte histológico del tejido testicular criopreservado bajo el tratamiento B. Tinción hematoxilina. Barra = 100 μm	56
Figura 3: Evaluación de la supervivencia celular del aislamiento proveniente de tejido testicular fresco (control) o criopreservado (Post-descongelación, tratamientos A y B)..	57
Figura 4: Intervalos de confianza para diferencias en la media en la supervivencia de las células somáticas aisladas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza= 90%.....	58
Figura 5: Intervalos de confianza para diferencias en la media en la cantidad de espermatogonias tipo A aisladas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza=95%.....	58
Figura 6:Intervalos de confianza para diferencias en la media de la densidad de espermatogonias tipo A $\text{GFR}\alpha^+$ cultivadas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza=90%.....	59
Figura 7: Dinámica del crecimiento de espermatogonias $\text{GFR}\alpha 1^+$ obtenidas de tejido testicular fresco. Los resultados están expresados como la media $\pm\text{SEM}$	59
Figura 8: Dinámica del crecimiento de espermatogonias $\text{GFR}\alpha 1^+$ obtenidas de tejido testicular criopreservado con el tratamiento A. Los resultados están expresados como la media $\pm\text{SEM}$	60
Figura 9: Dinámica del crecimiento de espermatogonias $\text{GFR}\alpha 1^+$ obtenidas de tejido testicular criopreservado con el tratamiento B. Los resultados están expresados como la media $\pm\text{SEM}$	60
Figura 10:Espermatogonia tipo A viva en el tratamiento A. Tinción azul tripan. Barra = 20 μm	61
Figura 11: Espermatogonia tipo A viva en el tratamiento B. Tinción azul tripan. Barra = 15 μm	61
Figura 12: Celulas adheridas al flask de cultivo despues de plaqueo diferencial en el tratamiento A. Tinción azul tripan. Barra = 50 μm	62
Figura 13: Celulas adheridas al flask de cultivo despues de plaqueo diferencial en el Tratamiento B. Tinción azul tripan. Barra = 50 μm	62

1 INTRODUCCIÓN

La preservación de material biológico incluye procedimientos fundamentales para las ciencias médicas, biológicas, agricultura y biotecnología y ha permitido desde la creación de bancos de células y tejidos listos para ser trasplantados cuando se necesiten hasta el mantenimiento de germoplasma en programas de conservación de especies (Day & Stacey, 2007). La biotecnología requiere germoplasma como material de partida o como una fuente natural de variación genética (National Research Council, 1993). El germoplasma es el mensaje hereditario que dirige el desarrollo de plantas y animales (Wilkes, 1989) y comprende recursos genéticos bajo la forma de células o tejidos capaces de generar nuevos organismos transmitiendo información genética de una generación a otra y que pueden ser colectados con fines de investigación, conservación y reproducción de una especie determinada.

La biotecnología no solo involucra a la tecnología del ADN recombinante, sino que también puede aplicarse en un campo más amplio incluyendo el cultivo de tejidos, criopreservación y regeneración de animales a partir de embriones. La biotecnología influencia la preservación del germoplasma de diversas maneras. En primer lugar, provee alternativas a la conservación de todo el organismo, como la conservación únicamente de sus gametos o tejidos. Segundo, puede ser una herramienta que ayude en el intercambio y comercialización de germoplasma. Tercero, puede aplicar técnicas de biología molecular para superar problemas con el manejo y utilización del germoplasma. Finalmente, influencia el crecimiento de la demanda de germoplasma y su conservación. (National Research Council, 1993).

1.1 Antecedentes de la biotecnología reproductiva

Se han desarrollado cuatro generaciones sucesivas de biotecnologías reproductivas que han permitido la conservación del germoplasma; la primera generación comprende la

inseminación artificial, la segunda la transferencia de embriones, la tercera la obtención de embriones a partir de la fertilización *in vitro* (Thibier, 2005); todas las tecnologías mencionadas anteriormente están basadas en la utilización de germoplasma gamético. La cuarta generación, busca la utilización de células diploides de la línea germinal, como células madre espermatogoniales (SSCs), (Aponte, 2015); esta última generación tiene grandes implicaciones no solo en la reproducción animal, sino también en la medicina regenerativa y preservación de especies tanto amenazadas como en peligro de extinción.

1.2 Preservación in vivo de germoplasma animal

La conservación *in vivo* de germoplasma se basa en la conservación de una raza a través del mantenimiento de poblaciones de animales vivos. Este sistema engloba dos métodos: la conservación *in situ* y *ex situ*. La preservación *in vivo* de poblaciones *in situ* es el método preferido (FAO, 2013), el cual involucra la crianza de poblaciones animales. Las actividades que incluyen este método de conservación incluyen el establecimiento de registros de desempeño de los animales y el desarrollo de programas de mejoramiento y de manejo de la diversidad genética dentro de la población. La crianza de los animales se realiza dentro del mismo hábitat y sistema de producción donde el recurso (animal) se desarrolla (FAO, 2012). Por otro lado, la estrategia *in vivo ex situ* hace referencia a la conservación fuera del hábitat y sistema de producción. Esta estrategia requiere del establecimiento y operación de granjas institucionales. En este sistema los granjeros pueden participar tanto como usuarios y proveedores de germoplasma (FAO, 2013).

1.3 Preservación de germoplasma animal *in vitro*

La conservación de germoplasma animal *in vitro* abarca dos métodos principales que son la congelación de semen y embriones (National Research Council, 1993) así como también células somáticas y tejido testicular y ovárico (Devi & Goel, 2016). Protocolos que aseguran

una criopreservación exitosa del semen datan del año 1950 y permitieron en 1951 obtener el primer becerro a partir de inseminación artificial utilizando semen previamente criopreservado (Curry, 2007) . A partir de ese momento, la criopreservación de semen ha sido una tecnología central en la producción ganadera y se han desarrollado protocolos para casi todos los animales domésticos. Además, la criopreservación de semen tiene un rol importante en el establecimiento de bancos de recursos genéticos para especies domésticas y más recientemente para especies salvajes amenazadas (Curry, 2007).

El almacenamiento de ovocitos sin fertilizar tiene numerosas aplicaciones. Pueden ser utilizados para tratar problemas de infertilidad en humanos si son colectados y preservados antes de que el paciente se someta a tratamientos contra el cáncer o falla prematura de los ovarios (Devi & Goel, 2016), así como también para almacenar el exceso de óvulos obtenidos en tratamientos que involucran fertilización *in vitro* y donación de óvulos. En las aplicaciones en el manejo animal incluye la preservación de animales amenazados o de alto valor o de razas modificadas genéticamente al momento de reducir los costos que representan los cruces continuos y de esta manera evitar problemas de deriva genética. Se prefiere la preservación de ovocitos humanos antes que la de embriones ya que existen menos preocupaciones éticas y en los animales porque permite tener más flexibilidad en programas de cría en comparación a la preservación de embriones. Se han reportado nacimientos exitosos a partir de ovocitos de mamíferos criopreservados en varias especies como bovinos, caballos, ratones y humanos (Paytner & Fuller, 2007).

La conservación de embriones presenta una ventaja frente a la criopreservación de semen, ya que mantienen un genotipo completo (National Research Council, 1993), además su uso en reproducción representa la única forma de diseminar genes valiosos de hembras (equivalente de la inseminación artificial en hembras).. En algunos animales domésticos, los embriones

que se recolectan provienen de animales sometidos a un tratamiento hormonal para inducir una sobreproducción de óvulos (superovulación). Primero se evalúa el potencial de los embriones resultantes y se determina si son capaces de ser implantados en una hembra receptora para producir el embarazo o soportar congelación (National Research Council, 1993).

La principal biotecnología asociada a la criopreservación de embriones es la transferencia de embriones. Mediante la transferencia de embriones se han obtenido resultados exitosos en animales domésticos como caballos, ovejas, cabras, bovinos (National Research Council, 1993) y cerdos («Embryo Transfer in Pigs - Management and Nutrition», s. f.). Por ejemplo, en el 2012 se reportó una producción global de aproximadamente 700.000 embriones bovinos producidos a partir de vacas bajo super ovulación y casi 450.000 embriones bovinos fueron producidos vía protocolos de inseminación artificial («Overview of Embryo Transfer in Farm Animals - Management and Nutrition», s. f.).

1.4 Criopreservación de tejido testicular

La criopreservación de tejido testicular es una técnica que puede facilitar la preservación del potencial reproductivo de diferentes especies animales. Esto se debe a que el tejido testicular contiene espermatogonias, células germinales que pueden llevar a la formación de espermatozoides. Este tejido puede ser criopreservado y la espermatogénesis puede completarse *in vitro* después de que el tejido ha sido descongelado (Lima, Silva, Lima, & Silva, 2017).

Avances recientes en la técnica de inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) y en el aislamiento y preservación de células germinales y su posible maduración *in vivo* o *in vitro* han llevado a que se centre nuevamente el interés en la investigación para la criopreservación de tejido gonadal, dado el gran potencial para la preservación de animales valiosos, raros, en

peligro o cuya población esté amenazada por una alta mortalidad neonatal/juvenil debido a enfermedades, malas prácticas en el manejo de animales o depresión endogámica (inbreeding depression), (Devi & Goel, 2016). Esta biotecnología constituye la única forma de preservar la fertilidad de animales que aún no alcanzaron la pubertad y por lo tanto no presentan espermatozoides para criopreservar directamente, así como también de aquellos que pasan por tratamientos que causan infertilidad como en el caso de la quimioterapia y tiene un rol muy importante en preservar recursos genéticos de animales domésticos y salvajes (Lima et al., 2017)

Actualmente la investigación está enfocada en utilizar nuevas tecnologías para el óptimo aislamiento y preservación de las células germinales y su subsecuente maduración, ya sea *in vitro* (espermatogénesis *in vitro*) o *in vivo* (trasplante de tejido testicular), ya que es necesario la producción de gametos que sean competentes para llevar a cabo el proceso de fertilización a partir de estas células germinales tempranas.

1.5 Trasplante de tejido testicular y de células madre espermatogoniales (SSCs)

Se ha logrado demostrar que el trasplante de tejido testicular inmaduro es efectivo para inducir espermatogénesis; lo interesante de esta tecnología es que puede ser aplicada a una diversidad de especies de mamíferos. Tejido pre-puberal de ratón, conejo, oveja y cerdo han sobrevivido al ser trasplantados en la región dorsal sub-cutánea de un ratón desnudo y han sido capaces de producir espermatozoides, algunos de los cuales han producido descendencia al ser utilizados por microinseminación (Yokonishi & Ogawa, 2016). La aplicación del trasplante de tejido ha estado centrada principalmente en roedores y trasplantes interespecíficos a especies filogenéticamente cercanas como ratas y ratones y ratones y hámster (Devi & Goel, 2016). También se han realizado xenotransplantes de tejido testicular

fresco de animales salvajes como hurones, bisontes, ciervos de cola blanca y pecaríes (Pothana, Makala, Devi, Varma, & Goel, 2015).

La criopreservación de tejido testicular inmaduro combinada con xenotransplantes puede ser una forma eficiente de producir células germinales fértiles y producir descendencia viable. Existen muy pocos reportes disponibles acerca de trasplantes utilizando tejido testicular criopreservado en animales salvajes o amenazados (Devi & Goel, 2016). Sin embargo, recientemente se ha reportado que modificaciones en la técnica empleada con ratones es exitosa en primates no humanos como macacos Rhesus (*Macaca mulatta*). Utilizando trozos de tejidos criopreservados, tanto cuando la combinación de donador y receptor fue autóloga como alogénica, se obtuvieron espermatozoides en paquiteno como el estadio más desarrollado de la espermatogénesis (espermatogénesis incompleta), (Yokonishi & Ogawa, 2016). En un experimento similar utilizando el ciervo ratón de la india (*Moschiola indica*), el estadio celular más avanzado fue el de espermatozoides primario (Pothana et al., 2015).

Desde la identificación de las SSCs de rata en 1971 como las responsables de iniciar y mantener la espermatogénesis y la introducción del trasplante de SSCs de ratones se abrió una nueva puerta para el tratamiento de la infertilidad masculina (Sadri-Ardekani & Atala, 2014). Hasta la fecha se ha logrado producir descendencia viva a partir de SSCs en animales de interés económico solo en ovejas y cabras con una eficiencia 7-10% (MIAO, 2011).

El primer estudio que consiguió reportar la producción de progenie viva utilizando trasplantes de células germinales en animales de granja fue realizado en ovejas (Herrid et al., 2009). En este estudio se demostró que es posible el trasplante de células germinales entre ovejas inmunocompetentes de distintas especies y que los animales que recibieron el trasplante fueron capaces de producir espermatozoides funcionales con la genética del animal donador de las células germinales, lo que también sugiere que existe inmunotolerancia en el

ambiente testicular de varias especies de animales de granja. Este estudio así mismo demuestra la importancia de un método eficaz para la eliminación de las células germinales endógenas del animal receptor. Utilizando radiación se logró obtener una tasa de éxito del 100% en el trasplante de células germinales (Herrid et al., 2009). A pesar de estos descubrimientos, la viabilidad y eficiencia de producir descendencia a partir de SSCs en animales de granja necesita ser investigada y mejorada, ya que la mayor parte de estas investigaciones se han centrado en roedores (MIAO, 2011).

Más tarde se encontró que es posible producir espermatozoides a partir de muestras criopreservadas de SSCs al trasplantarlas a los túbulos seminíferos de ratones receptores (Yokonishi & Ogawa, 2016). Incluso se ha reportado la obtención de prole fértil de ratones, ratas, conejos y babuinos, a partir de células madre espermatogoniales criopreservadas por más de 14 años (Wu et al., 2012).

1.6 Espermatogénesis *in vitro*

La espermatogénesis es uno de los procesos más largos y complejos de proliferación y diferenciación celular secuencial, que por ejemplo en ratones, toma más de un mes para las SSCs formar espermatozoides a través de la meiosis (Sato et al., 2011). La espermatogénesis comienza cuando espermatogonias tipo A_s (SSCs en ratones y bovinos) proliferan para autorrenovarse a sí mismas y al mismo tiempo producen células germinales cada vez más especializadas. De forma resumida durante la espermatogénesis, la mayoría de las células germinales y espermatogonias diferenciadas llevan a cabo varias rondas de divisiones mitóticas antes de entrar en la meiosis. En orden de su aparición en la serie de mitosis estarían los siguientes tipos: espermatogonias tipo A_s (sencillas), A_{pr} (pareadas), A_{al} (alineadas), A_{1-4} , espermatogonia In (Intermedia) y finalmente las B. Las espermatogonias B sufren un cambio hacia espermatoцитos primarios donde comienza la fase meiótica

(espermatocitogénesis). Se llevan a cabo dos divisiones meióticas pasando desde el espermatocito primario hacia el secundario con la primera división meiótica y termina con la formación de espermatidas con la segunda división (Singh, Burnicka-Turek, Chauhan, & Hou, 2011). Finalmente ocurre la espermiogénesis, donde las espermatidas sufren transformaciones celulares y maduración hacia la formación del espermatozoide. Estas transformaciones incluyen la formación del acrosoma, flagelo y pieza intermedia (Universidad Nacional de Córdoba, 2013).

Todo este proceso es soportado por las células de Sertoli, las cuales están en contacto directo con las células germinales en los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli proveen de señales hormonales, nutrientes, y soporte físico a las células germinales para que se lleve a cabo la espermatogénesis. Por lo tanto estas células son necesarias para coordinar y por ende completar la espermatogénesis tanto *in vivo* como *in vitro* (Kim et al., 2015). Sin embargo, aun con la introducción de células de Sertoli como una monocapa de alimentación, no es posible alcanzar una espermatogénesis completa utilizando técnicas de cultivo celular (Sato et al., 2011). Por lo tanto, el único método para lograr espermatogénesis *in vitro* es el cultivo de tejidos (Kim et al., 2015).

Recientemente se han desarrollado tecnologías de cultivo de tejidos que han permitido desarrollar espermatogénesis completa *in vitro* cultivando trozos de tejido testicular de ratones neonatos (Sato et al., 2011). Al aplicar este mismo método de cultivo a tejido testicular criopreservado se obtuvo el mismo resultado. Se obtuvo espermatidas y espermatozoides, los cuales fueron utilizados para micro inseminación e inyección intracitoplasmática (ICSI) respectivamente, dando lugar a progenie saludable y fértil (Yokonishi & Ogawa, 2016). Ensayos similares en bovinos, utilizando hormonas, como la T3, y factores de crecimiento como SCF, se potenció la espermatogénesis 2.4-2.7 veces,

comparando la cantidad de túbulos seminíferos que restauraron la espermatogénesis entre el tejido testicular que se cultivó bajo T3 y SCF y los del grupo control Sin embargo no se logró una espermatogénesis completa, obteniendo espermátocitos y espermátidas como los estadios más desarrollados (Kim et al., 2015).

1.7 Métodos de criopreservación de tejido gonadal.

La criopreservación de tejido testicular puede conseguirse utilizando varias técnicas como congelación lenta, rápida y ultra-rápida (vitrificación). Los protocolos que actualmente se utilizan están siendo probados en varias especies animales. En la congelación lenta se utiliza un equipo que reduce la temperatura gradualmente a la que es expuesta el tejido testicular hasta alcanzar el punto de congelación, después del cual el tejido se transfiere a crioviales y se almacenan en nitrógeno líquido (Lima et al., 2017). Para la criopreservación de espermatogonias de bovino bajo congelación lenta se utiliza una tasa de enfriamiento de 1°C o 5°C/min hasta llegar a -80°C, cuando se transfieren a nitrógeno líquido. En protocolos de congelación lenta no controlada, las células se mantienen en un congelador a -80°C por un día y se las transfiere a nitrógeno líquido (Izadyar et al., 2002)

La congelación rápida puede considerarse una metodología intermedia entre la congelación lenta y la congelación (AbdelHafez,, 2010), en esta metodología se expone el tejido a una solución crioprotectora y posteriormente se colocan directamente en nitrógeno líquido (Trounson, Peura, & Kirby, 1987). En la vitrificación se da un rápido proceso de solidificación y así se evita la cristalización del medio (Curaba et al., 2011). Para que suceda la vitrificación de la solución de criopreservación, esta debe ser lo suficientemente viscosa como para que se comporte como un sólido sin la formación de cristales, por eso es necesario que la solución contenga una elevada concentración de criopreservantes (Pegg, 2007). La vitrificación es una de las técnicas más efectivas para evitar el daño celular por la formación de cristales. Sin embargo, debido a la alta concentración de criopreservantes es posible que se

afecte la morfología y funcionalidad de las células madre (Lima et al., 2017). Esta metodología de criopreservación ha sido ampliamente utilizada en la preservación de tejido ovárico y promete buenos resultados para el preservación de tejido testicular (Curaba et al., 2011).

El uso de agentes crioprotectores en protocolos de criopreservación es crucial para mantener la viabilidad celular después de que el tejido ha sido descongelado, ya que estos agentes protegen a las células de sufrir daños en el mismo proceso de congelación. Se han probado varios crioprotectores en protocolos de criopreservación de tejido; sin embargo, no se ha reportado un crioprotector ideal o mezcla de ellos que sea utilizado para mantener la calidad y viabilidad de las células testiculares (Lima et al., 2017).

1.8 Células madre espermatogoniales como modo de preservación de germoplasma

Las SSCs son células madre germinales en el epitelio de los túbulos seminíferos (Aponte, 2015) que tienen la capacidad de renovarse y mantener una población constante de SSCs y a su vez generar una cascada de diferenciación de células germinales que terminan en la constitución del altamente especializado espermatozoide (Aponte et al., 2008). Durante mucho tiempo se había pensado que la única función de las SSCs es la producción continua de espermatozoides en los animales, sin embargo con la manipulación de estas células se ha logrado cambiar este enfoque y otorgarles aplicaciones biotecnológicas novedosas como facilitar el proceso de obtención de animales transgénicos, restaurar la fertilidad en animales de alto valor genético o preservar su germoplasma, aplicaciones dentro de la medicina regenerativa y diferenciación *in vitro* hacia espermatozoides (Aponte, 2015).

En los bovinos, las SSCs forman parte de una sub-población de espermatogonias tipo A (Izadyar et al., 2002) y mediante de la expresión del receptor $GFR\alpha 1$ se pueden identificar .

GFR α 1 es el receptor de la GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor), el cual regula la renovación de las SSCs y su diferenciación (de Rooij & Russell, 2000; Singh et al., 2011). Se ha observado que la sobre-expresión de GDNF en testículos de ratón inhibe la diferenciación y la principal célula observada es la espermatogonia tipo A_s (SSCs). Por otro lado, ratones heterocigotos en los que una copia del gen *gdnf* fue silenciada, mostraban un agotamiento temprano de SSCs y pérdida de la espermatogénesis (de Rooij & Russell, 2000). En experimentos de cultivo celular, se evidenció que la adición de GDNF exógeno promueve el cultivo de SSCs (Oatley, Reeves, & McLean, 2004).

Las SSCs han sido difíciles de aislar debido a su bajo número y la falta de marcadores específicos en su membrana. Sin embargo, con el descubrimiento del receptor GFR α 1 expresado por las SSCs y su progenie, es posible la identificación de las espermatogonias A_{pr} utilizando anticuerpos (Hofmann, 2008), siendo las espermatogonias A_s consideradas las SSCs y las generaciones subsecuentes A_{pr} y A_{al} no muestran características especiales en el núcleo o citoplasma que permitan distinguirlas (de Rooij & Russell, 2000) lo que hace difícil su identificación durante el cultivo. De allí radica la importancia de utilizar marcadores moleculares para la identificación de SSCs. Las espermatogonias tipo A₁₋₄ son muy similares y solo pueden distinguirse determinando en que estadio del epitelio testicular están presentes, mientras que las espermatogonias intermedias y tipo B pueden ser reconocidas morfológicamente debido a que presentan cantidades mayores de heterocromatina (de Rooij & Russell, 2000).

Se conoce el efecto de la criopreservación sobre los lípidos y proteínas de la membrana celular, así como también el daño celular producido por la formación de cristales durante la congelación (FAO, 2012), sin embargo existen pocos reportes en la literatura sobre el proceso de criopreservación de gónadas enteras (sean masculinas o femeninas) en animales

domésticos y menos aún en silvestres, con fines de trasplante u obtención de células madre germinales (espermatogoniales u ovogoniales) contenidas en estos órganos. Dado lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo es desarrollar un modelo bovino de criopreservación de tejido testicular para la preservación de germoplasma animal, al analizar el efecto de la criopreservación sobre las espermatogonias tipo A GFR α 1 positivas que a su vez pueda abrir la posibilidad de realizar procedimientos parecidos en otras especies animales, sobre todo aquellas amenazadas o en peligro de extinción. Este estudio es único al utilizar un marcador específico de células madre espermatogoniales, el GFR α 1, para su identificación después de la criopreservación y también al utilizar tejido testicular bovino intacto bajo un protocolo modificado de criopreservación usado previamente con SSCs bovinas en suspensión (Izadyar et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar un modelo animal rumiante de criopreservación de tejido testicular para la preservación de germoplasma, mediante la obtención de células madre espermatogoniales utilizando rumiantes domésticos

2.2 Objetivos Específicos

- Establecer un protocolo para criopreservar tejido testicular animal.
- Aislar, cultivar e identificar molecularmente células madre espermatogoniales antes y después de la criopreservación del tejido.
- Optimizar condiciones para los ensayos de inmunohistoquímica para la detección de marcadores específicos de SSCs en el modelo animal propuesto.
- Cuantificar SSCs presentes en el tejido testicular antes y después de la criopreservación a fin de establecer el rendimiento en SSC post-descongelación.

3 JUSTIFICACIÓN

El mejoramiento genético ha incrementado en gran medida la productividad de la ganadería, industrias lácteas y del sector avícola. Los recursos genéticos representados en los animales silvestres también son de importancia, ya que pueden representar usos potenciales para el hombre y mantener las funciones del ecosistema. Sin embargo, limitaciones financieras hacen que sea difícil mantener poblaciones animales lo suficientemente grandes como para mantener diversidad genética útil (McGuire, P, 1985). El mantenimiento del germoplasma en forma de animales vivos presenta una interrogante muy importante, si a largo plazo esta estrategia contará con financiación y el compromiso de mantener varias generaciones de animales acordes con los estándares que se requieren para una conservación exitosa (FAO, 2012).

La Convención de Diversidad Biológica considera que estrategias de conservación *ex situ*, como la criopreservación, deben ser una actividad complementaria en programas de conservación de germoplasma animal a largo plazo (FAO, 2012). El aislamiento y cultivo de SSCs pueden ser una estrategia importante para la preservación del germoplasma animal, ya que el resultado ulterior de estas tecnologías es la obtención de gametos por diversas vías y enfoques con el fin de generar embriones (*in vivo* o *in vitro*), que a su vez puedan ser implantados en hembras receptoras y de esta forma generar individuos con fines tan relevantes como repoblar ecosistemas en desequilibrio o aumentar las tasas de mejoramiento genético en sistemas de producción animal. Las actuales tecnologías de preservación *in vitro* de germoplasma animal que se basan en el uso de material gamético presentan la limitación de trabajar con un número finito de células mientras que la utilización de células diploides

como las SSCs supera esta limitante mediante su capacidad de proliferación constante durante el cultivo *in vitro* o al ser trasplantadas a animales recipientes.

Como se mencionó anteriormente; existen pocos reportes en relación al proceso de criopreservación de gónadas enteras (masculina o femenina) en animales domésticos y silvestres, con fines de obtención posterior de las células madre germinales contenidas en estos órganos (células madre espermatogoniales u ovogoniales) (Aponte, 2015). Por lo tanto, la importancia de este trabajo radica en establecer un modelo animal rumiante de criopreservación de tejido testicular entero, para el posterior aislamiento y cultivo de SSCs, con el objetivo de preservar el germoplasma animal.

4 AREA DE ESTUDIO

El material biológico fue recolectado de dos terneros *Bos primigenius taurus* de entre 2-4 meses de edad. Los terneros se encontraban en una hacienda ubicada en el kilómetro cuatro, vía a Papallacta, Pichincha Ecuador. El material biológico fue transportado hasta los laboratorios de biotecnología animal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá; donde se realizó la criopreservación, aislamiento y cultivo celular.

5 MATERIALES

5.1 Obtención del material biológico

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

5.2 Criopreservación del tejido

- Hielo
- DMSO
- Sacarosa
- Suero fetal bovino (FBS) (Sigma)
- MEM 10X (Gibco)
- Bisturí
- Pinzas
- Nevera
- Cajas Petri
- Balanza
- Tubos cónicos para centrifuga de 15 ml y 50ml (Falcon)
- Tubos Eppendorf 1.5 ml

- Papel aluminio
- Pipetas de plástico desechable de 10 ml y 50 ml (Nunc)
- Micropipetas
- Pipeteador automático
- Centrifuga
- DNase (SIGMA)
- BSA Albumina Sérica Bovina (SIGMA)

5.3 Aislamiento y cultivo de células madre espermatozonales

- 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 (SIGMA)
- Tripsina (SIGMA)
- Suero Fetal Bovino (FCS) (SIGMA)
- Filtros de nylon de 100 μ m y 40 μ m (SIGMA)
- BSA Albumina Sérica Bovina (SIGMA)
- Azul tripán
- Cámara de Neubauer
- Porta y cubre objetos
- Culture Flasks de 75 cm²
- Microscopio óptico
- Penicilina Streptomycin (Gibco, Life Technologies)
- Gentamicina (Gibco, Life Technologies)

5.4 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 α 1(Santa Cruz Biotechnologies)
- Anticuerpo Secundario marcado con HPR (Horse radish peroxidase), (Santa Cruz Biotechnologies)
- DAB (SIGMA)
- Agua destilada
- Casetes para inclusión
- Etanol 70%
- Etanol 80%
- Etanol 96%
- Etanol 100%
- Xilol
- Parafina (Paraplast Plus, SIGMA)
- Estufa
- Agitador magnético
- Molde para la inclusión
- Micrótopo.
- Hematoxilina de Harris (Sigma)

6 METODOS

6.1 Obtención del material biológico

Se realizaron dos recolecciones de testículos, para ello se castraron dos terneros de entre 2 y 4 meses de edad. Primero se recuesta al animal sobre el suelo y se procedió a atar sus patas traseras y delanteras de tal forma que los testículos queden expuestos. Después se colocó una inyección en los testículos de anestésico local, principalmente alrededor del cordón espermático. Una vez que el anestésico hizo efecto, se colocó una solución desinfectante, a base de yodo, sobre toda el área genital del animal. Paso siguiente, utilizando un bisturí se cortó el escroto del ternero dejando expuestos los testículos y con el emasculador se los extirpo. Se dejó cerrado el emasculador sobre el corte y no exista hemorragia. Finalmente se retiró el emasculador y se añadió violeta de genciana y desinfectante a base de plata para limpiar la herida y ayudar a la cicatrización del ternero. Los testículos se almacenaron en una nevera con hielo y fueron transportados hacia los laboratorios de biotecnología animal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá; donde fueron utilizados para los experimentos correspondientes.

6.2 Preparación del material biológico para la criopreservación.

Una vez se obtuvieron los testículos, ya en el laboratorio, se procedió a retirar la *túnica vaginalis*, se pesaron los testículos y se tomó medidas del volumen. Después se lavaron con agua destilada para retirar exceso de sangre en el material biológico. Se tomaron aproximadamente 20 g de testículos y se retiró un trozo para análisis histológico posterior. Después de pesar se transfirió el material a una caja Petri estéril y se procedió a cortar el testículo en dos mitades, cada una de las cuales se transfirió a una nueva caja Petri y se

añadió 12.5 ml MEM + DNAsa (50 ml MEM +100 µl DNAsa) para mantener el tejido hidratado.

Luego se procedió a remover la *túnica albugínea* de cada mitad con un bisturí, pinzas y tijera previamente esterilizados; una vez retirada esta estructura se utilizó el extremo romo de la tijera y junto con las pinzas se retiró tejido conectivo presente en el mediastino. Se cortó el tejido testicular resultante en pequeños trozos de aproximadamente 0,5 cm³ utilizando las tijeras. Una vez obtenidos pequeños trozos, el contenido de cada caja Petri se repartió entre dos tubos cónicos de 50 ml y en cada uno se agregó al tejido el medio de congelación, ya sea solución A (6ml de MEM + 2ml DMSO + 480mg sacarosa + 2ml SFB) o solución B (6ml de MEM + 2ml DMSO + 480mg sacarosa + 2ml BSA). El medio de congelación fue añadido en tres fracciones (\approx 3.5ml) gota a gota, lentamente y en frío. Cada vez que se agregó una fracción del medio de congelación, se incubó el tejido testicular en la nevera a 4°C durante 20 minutos antes de agregar la siguiente fracción.

Una vez se colocaron las 3 fracciones del medio de congelación al tejido testicular, se colocó las muestras en un congelador a -80°C durante 72 horas. Finalmente, las muestras se transfirieron a nitrógeno líquido.

6.3 Aislamiento y cultivo celular

Día 1

Para iniciar con el aislamiento cultivo celular se retiraron los tubos cónicos que contenían las muestras del nitrógeno líquido, los cuales fueron sumergidos en agua a 39°C durante 2 minutos para su descongelación. Una vez descongeladas, las muestras se colocaron en nuevos tubos cónicos y se procedió a retirar el medio de congelación del tejido testicular. Para ello se añadió lentamente MEM al 10% SFB al tejido en una proporción 1:3 (v/v) para

que el medio de congelación se diluya. Luego se centrifugaron los tubos 1200RPM durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se repitió este proceso una vez más.

Posteriormente, el tejido testicular contenido en los dos tubos cónicos se colocó en dos cajas Petri distintas y utilizando dos cuchillas de bisturí se removió el tejido conectivo presente en el mediastino para que los túbulos seminíferos queden más expuestos. Después de trocear el tejido testicular, se transfirió el contenido de cada caja Petri a un nuevo tubo cónico de 50ml y se añadió la mezcla enzimática I (conteniendo colagenasa I, hialuronidasa y tripsina). Se cerraron los tubos y se colocó parafilm en la tapa para sellarlos herméticamente. Se sumergieron ambos tubos en un baño de agua a 32°C con agitación durante 60 minutos.

Una vez que transcurrió el tiempo, se retiraron los tubos del agua y se centrifugaron a 300 RPM por un minuto, se retiró el sobrenadante y se colocó MEM + DNAsa fresco, este proceso se repitió por 3 veces hasta que el sobrenadante quedó limpio. Se removió el sobrenadante hasta que quedó aproximadamente 12.5ml en el tubo y se añadieron 12.5 ml de la mezcla enzimática II (colagenasa y hialuronidasa) a cada tubo. Nuevamente se cerró la tapa de los tubos con parafilm y se dejaron durante 45 minutos en el baño de agua a 32°C.

Después de la segunda digestión enzimática se centrifugaron los tubos a 400 RPM por 2 minutos. Luego se tomó el sobrenadante y se filtró una a través de una membrana de nylon 77µm y posteriormente a través de otra de 55µm, el filtrado se recogió en un nuevo tubo estéril y se centrifugó a 900 RPM por 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y finalmente se resuspendió el pellet de células en MEM + DNAsa + BSA (9ml MEM + 1ml BSA + 10ul DNAsa), hasta alcanzar un volumen de 4 ml en un tubo Falcon, el cual se colocó en hielo.

Se prepararon 50ml de medio de cultivo al 10% SFB que contenía 41ml MEM 1X +5ml de SFB + 4ml de la suspensión celular y se colocó 12.5ml de esta suspensión celular en cada uno de cuatro frascos de cultivo de 75 cm². El último paso consistió en agitar suavemente el

frasco en distintas direcciones para que las células se distribuyan uniformemente por toda la superficie, la tapa se ajustó ligeramente y se incubó a 37°C en una atmosfera el 5% de CO₂ durante toda la noche.

DIA 2

Después de la incubación durante toda la noche, a fin de recolectar las células, se agitaron los frascos de cultivos y se lavó las paredes de los frascos con su mismo medio varias veces, después de lo cual se recogió todo el medio para transferirlo a un tubo cónico de 50 ml estéril y se centrifugo durante 5 minutos a 900 RPM.

Posteriormente, se retiró todo el sobrenadante posible y se resuspendió el pellet de células en 0.7ml de MEM + DNAsa + BSA y se colocó este en hielo. Se tomó una pequeña muestra del pellet para evaluar la viabilidad, pureza y concentración celular post-congelación. Una vez se realizaron estos cálculos, se procedió a inocular el volumen correspondiente del pellet resuspendido en el medio de cultivo a utilizarse, para que en cada pocillo existan por lo menos 100.000 espermatogonias tipo A viables. Finalmente se incubó la placa a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂.

6.4 Fijación de las células cultivadas

Se comenzó retirando el medio de cultivo de cada pocillo y se lavó brevemente con PBS 1X durante 3 minutos. Después se retiró el PBS y se colocó paraformaldehído al 4%, las placas se llevaron a la nevera (4 °C) donde se fijaron durante al menos 10 minutos. Finalmente se retiró el paraformaldehído y se lo reemplazo con etanol al 70%. Las placas se conservaron en etanol protegidas de la luz con papel aluminio en la nevera (4 °C) hasta que se las utilizó en los ensayos de inmunohistoquímica.

6.5 Inmunohistoquímica

Primero se retiró el etanol de cada pocillo y se lavó brevemente con PBS 1X, después se incubaron las células con una solución de peróxido de hidrogeno al 0.1% durante 5-7 minutos a temperatura ambiente y se lo retiró. Para eliminar los restos de peróxido de hidrogeno se realizaron 2 lavados con PBS 1X, cada uno de 5 minutos de duración.

Posteriormente, se retiró el PBS y se incubó con 200 µl del reactivo de bloqueo UltraCruz® en cada pocillo durante 1 hora. Trascurrido el tiempo requerido se retiró el reactivo de bloqueo y en su lugar se colocó 200µl del anticuerpo primario anti-GFR α 1 diluido en el reactivo de bloqueo UltraCruz en una proporción 1:100. Las placas se envolvieron externamente en papel toalla mojado y papel aluminio para mantener una atmosfera húmeda y se incubaron las placas durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se retiró el anti-GFR α 1 y en su lugar se colocó 200 µl del anticuerpo secundario anti-mouse HRP, igualmente diluido en el reactivo de bloqueo UltraCruz en una proporción 1:100 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurridas las dos horas, se continuó con el revelado de los resultados.

Para el revelado, se agregó 500 µl de la solución de trabajo DAB (25µl DAB solución stock + 5ml de buffer Tris +0,85µl de peróxido de hidrogeno al 30%) en cada pocillo y se dejó actuar al reactivo durante 5-7 minutos mientras se observaban cambios con un microscopio invertido. Se detuvo la reacción retirando la solución de DAB e inmediatamente se colocó 1ml de agua destilada. Finalmente se observó la placa en el microscopio invertido para recolectar los resultados experimentales.

6.6 Determinación de la confluencia celular

Para estimar la confluencia en cada pocillo donde se realizó previamente inmunohistoquímica, se realizó una tinción con hematoxilina. Primero se retiró el etanol

contenido en cada pocillo y se colocó 1000µl de agua destilada. Después se retiró el agua destilada y en su lugar se añadió 200µl de Hematoxilina de Harris sin diluir durante 30 segundos. Para detener la reacción se colocó 1000µl de agua destilada y se realizaron 2 lavados adicionales con agua destilada. Paso siguiente se colocó 1000µl de agua del grifo y se incubó durante 10 minutos para fijar el colorante. Finalmente se colocó 1000 µl de etanol al 70% para preservar la muestra ya tenida.

Una vez las células en el fondo del pocillo se encontraron teñidas, se observaron bajo un estereomicroscopio y se tomó una fotografía. Después la fotografía se analizó en el computador bajo una grátícula conformada por zonas de 25µm². Finalmente se estimó el porcentaje de zonas confluentes que se hallaron en la grátícula.

6.7 Inclusión de las muestras en parafina

Para comenzar con estos ensayos las muestras de tejido se almacenan dentro de un casete de plástico. El primer paso consiste en deshidratar las muestras, para ello se sumergieron los casetes en etanol 70% por 15 minutos 2 veces. Paso siguiente se sumergen las muestras en etanol al 80% durante 20 minutos dos 2. Se realiza el mismo proceso con etanol al 96%. Siguiendo a esto, las muestras fueron sumergidas en etanol absoluto durante 20 minutos 3 veces. Una vez transcurrido el tiempo en etanol absoluto, las muestras fueron sumergidas 1 vez en xilol por 10 minutos y 2 veces en xilol por 5 minutos.

Los pasos a continuación se realizaron en una estufa manteniendo la temperatura de la solución a 60°C. Después del xilol, las muestras se sumergen en soluciones crecientes de xilol junto con medio de inclusión (Paraplast Plus). La primera solución que se utilizó fue xilol junto con el medio de inclusión en una proporción 50% (volumen xilol/volumen de medio de inclusión) y las muestras se sumergieron durante 45 minutos. Una vez transcurrido este tiempo las muestras se cambiaron a otra solución de xilol y medio de inclusión al 75%

(v/v) nuevamente durante 45 minutos. Las muestras se sumergieron en medio de inclusión puro 2 veces durante 30 minutos.

Una vez terminado el tiempo de las muestras en el medio de inclusión, se retiró el trozo de tejido del casete y se colocó en el molde, posteriormente se agregó parafina líquida sobre el molde teniendo cuidado que el trozo de tejido no se mueva. La parafina líquida se agregó hasta que desborde ligeramente del molde y finalmente se colocó una parte del casete de plástico.

6.8 Histología del tejido testicular.

Una vez el tejido testicular fue montado en parafina correctamente, se realizaron cortes de 5µm de grosor. Se tiñó cada corte con Hematoxilina de Harris sin diluir durante 30 segundos y cada placa se colocó en agua del grifo para fijar el colorante. Se dejó correr el agua del grifo sobre las placas, cuidando que el chorro no caiga directamente sobre las muestras, durante 10 minutos.

7 RESULTADOS

7.1 Estructura del tejido testicular post-congelación.

La estructura de los túbulos seminíferos cuando el tejido fue criopreservado se mantuvo intacta. Hacia la base de los túbulos seminíferos se encontraron células con la morfología típica de células de Sertoli. En el espacio intertubular se encontraban células que presentaban una morfología similar a células de Leydig, mientras que el único tipo de célula germinal apreciable en este periodo de desarrollo fueron gonocitos (Figura 1 y 2).

7.2 Aislamiento celular de tejido fresco (control) y criopreservado.

La Tabla 1 muestra los resultados del aislamiento de SSCs obtenidas a partir de tejido fresco sin criopreservar (Control), así como de tejido previamente criopreservado utilizando dos criopreservantes distintos (Tratamiento A y B, con sacarosa, DMSO y FCS o BSA respectivamente). En la Figura #3 se puede observar que existe una clara diferencia en la supervivencia de las células somáticas cuando el tejido es criopreservado. Las células somáticas presentan una supervivencia promedio de 56.65% cuando al ser aisladas a partir de tejido fresco; mientras que cuando provienen de tejido testicular previamente criopreservado descienden hasta el 18.40% cuando se utilizó el tratamiento A y 11.08% con el tratamiento B. Es posible determinar con un 90% de confianza que existe diferencia estadística en la supervivencia de las células somáticas al ser extraídas de tejido testicular fresco o criopreservado. Sin embargo, no existe diferencia significativa en la supervivencia celular somática entre el tratamiento A o B, ambos son estadísticamente iguales (Ver Figura 4). Se observan resultados que contrastan con los anteriores cuando se analiza la supervivencia de las espermatogonias tipo A (células germinales). La supervivencia de estas células germinales muestra una ligera reducción cuando son aisladas a partir de tejido testicular

criopreservado (post-congelación) en comparación a tejido fresco, pero no es significativa estadísticamente ($p>0,05$), (Ver Figura 5). Sin embargo, se observa un alto porcentaje de supervivencia, muy similar en las espermatogonias tipo A cuando el tejido es preservado bajo el tratamiento A o B (~93% vs ~81%, $p>0,05$). La supervivencia de las espermatogonias tipo A es estadísticamente similar si provienen de tejido fresco a criopreservado ($p>0,05$), (Ver Figura 5). Sin embargo, se encontró que en promedio si existe diferencia en el rendimiento del aislamiento con respecto al número de espermatogonias vivas totales conseguidas. De esta manera, cuando se utilizó tejido testicular fresco se obtuvo en promedio 40.60% de espermatogonias vivas, mientras que cuando se utilizó tejido criopreservado la pureza de espermatogonias viva descendió hasta 6.31% y 3.40% para el tratamiento A y B, respectivamente ($p<0,01$), (Ver Figura 3).

7.3 Densidad celular de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ alcanzada durante cultivo corto

La cantidad de espermatogonias positivas para el receptor $GFR\alpha 1$ (SSCs) detectadas en cada pocillo de cultivo fue normalizada con respecto a su área de crecimiento celular alcanzada durante el cultivo a corto plazo. Se determinó con un 95% de confianza que no existe diferencia estadística en la densidad de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ alcanzada durante el cultivo corto, sin importar si el aislamiento de células testiculares se realizó con tejido fresco o criopreservado ($p>0,05$) (Ver Figura 6).

7.4 Dinámica del crecimiento de SSCs durante cultivo corto.

En la Figura 5 se muestra la dinámica de crecimiento de las espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ obtenidas a partir de tejido testicular fresco, durante 12 días. Durante los primeros 3 días del cultivo, se observa un crecimiento más rápido de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ cuando el medio de cultivo contenía FCS 10% en comparación cuando contenía 1%, encontrando 2.00 SSCs por cm^2 y 0.1 SSCs por cm^2 respectivamente ($p<0,05$). Sin embargo, la cantidad de

espermatogonias tipo A GFR α^+ presentes en el cultivo se iguala para ambas concentraciones de FCS a medida que avanza el cultivo en el tiempo (Día 6), encontrándose 2.36

espermatogonias tipo A GFR α^+ por cm² en el medio con FCS 10% y 2.18 en el que contenía 1% ($p>0,05$). En el día 12 ocurre un descenso en la cantidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ tanto para el medio que contenía FCS 1% y 10%, encontrándose en ambos una densidad de 0.78 espermatogonias tipo A GFR α^+ por cm² ($p>0,05$).

En la Figura 8 se muestra la dinámica de crecimiento de espermatogonias tipo A GFR α^+ utilizando tejido criopreservado bajo el tratamiento A, en la cual de forma general se observa que en promedio hay mayor cantidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ cuando se utiliza medio de cultivo con FCS 1%, especialmente en el día 6 ($p>0,05$). En el día 6, el medio con FCS 1% presenta una cantidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ constante en relación con el día 3, mientras que hay una reducción en el medio al 10%. Al final del cultivo la cantidad de SSCs desciende en ambos medios, cuando se utilizó FCS 1% se encontraron 0,63 espermatogonias tipo A GFR α^+ por cm² mientras que en FCS 10% se encontraron 0.28. ($p>0,05$).

En la Figura 9 se presenta la dinámica de crecimiento de las SSCs obtenidas a partir de tejido criopreservado bajo el tratamiento B. Se observa que, al cultivar las células testiculares aisladas bajo este tratamiento, con FCS 10% se produce en promedio una cantidad superior de espermatogonias tipo A GFR α^+ en el día 3 en comparación a cultivarlas con 1%, 2.4 contra 1.42 espermatogonias tipo A GFR α^+ por cm², pero sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p>0.05$). En el día 6 ambas condiciones de cultivo muestran una reducción en la cantidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ ($p>0,05$). En el día 12, en el tratamiento con FCS 10% continuó la tendencia a la reducción de la cantidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ presentes en el cultivo hasta no encontrarse ninguna. Por otro lado, en los cultivos con FCS 1% el crecimiento de SSCs se mantiene ya que en el día 12

hubo 0.92 SSCs por cm². No existe una tendencia clara en este tratamiento con respecto al porcentaje de FCS ni el día óptimo para el cultivo de espermatogonias tipo A GFR α^+ .

Tanto en los grupos control y el tratamiento A, cultivar las células bajo FCS 1% y 10% resulta en una reducción de la densidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ en el cultivo hacia el día 12 (Ver Figuras 7,8 y 9). Esta tendencia solo es observada en el tratamiento B cuando se utilizó FCS 10% para el cultivo, mientras que cuando se utilizó FCS 1% el crecimiento se mantuvo estable a partir del día 6 hasta el día 12 (Ver Figura 9).

8 DISCUSION

8.1 Estructura del tejido testicular post-congelación.

En el presente trabajo, la estructura celular del tejido criopreservado se mantiene morfológicamente intacta posiblemente debido al alto poder de penetración del DMSO. El DMSO protege a los túbulos seminíferos y al ADN del daño criogénico, por lo que es especialmente utilizado en protocolos de congelación lenta no controlada de tejido testicular de humanos (Pothana et al., 2015). La presencia de células con morfologías similares a las de Sertoli y de células germinales aparentemente normales en los cortes histológicos al descongelar el tejido (Figura 1 y 2) orienta a que es posible obtener tener un cultivo competente de SSCs. Para que las células espermatogoniales puedan mantenerse *in vitro* es necesario que los túbulos seminíferos contengan tanto células de Sertoli como SSCs (Kim et al., 2015).

8.2 Aislamiento celular de tejido fresco (control) y criopreservado.

Las células que había muerto debido al proceso de criopreservación y aislamiento celular fueron identificadas utilizando el colorante vital azul tripán. El azul tripán es un colorante impermeable para la membrana de células viables, pero no para aquellas muertas, por lo tanto, las células muertas resultaban teñidas y fue posible diferenciarlas. El proceso de criopreservación resultó en una elevada tasa de muerte celular, especialmente en la población de células somáticas. Aunque la supervivencia de las espermatogonias es muy similar al utilizar tejido fresco versus criopreservado se observa una considerable disminución general en el porcentaje de espermatogonias vivas en la muestra, lo cual indica un bajo rendimiento en la obtención de este tipo celular. Existen varias razones por las cuales pudo suceder este fenómeno. Primero es posible que muchas de las espermatogonias tipo A no hayan sobrevivido el proceso de criopreservación y sus restos celulares se hayan perdido durante los

pasos de lavado y centrifugación durante el aislamiento a partir del tejido ya descongelado y por lo tanto su muerte no pudo ser reflejada en el análisis de supervivencia realizado en las suspensiones celulares obtenidas después del plaqueo diferencial. También esto se puede haber debido a limitaciones en la metodología de evaluación de la supervivencia de las espermatogonias que fue realizada después del plaqueo diferencial. Realizar la evaluación de la supervivencia antes y después del plaqueo diferencial, ayudaría a determinar de forma más precisa el porcentaje de espermatogonias que murió durante la criopreservación.

La muerte celular puede atribuirse a sucesos comunes durante el proceso de criopreservación como la formación de cristales, los cuales dañan la estructura celular, desbalance osmótico y la toxicidad en sí del criopreservantes utilizado (Best, 2015; Pegg, 2007). En el escenario de esta investigación, tanto el tratamiento A y B bajo los cuales fueron criopreservados los tejidos, contenían una baja concentración de DMSO (2.4M). Según la literatura una concentración de DMSO hasta 4M es óptima ya que produce 75% de células viables después de la congelación (Campbell, Brockbank, & Sato, 2007). Es importante recalcar que el DMSO es un criopreservantes permeable al interior de las células, pero su ingreso es más lento que el agua, por lo que ocurre un desbalance osmótico y este desbalance es mayor a medida que se aumenta la concentración del DMSO y el cambio en el volumen celular es más dramático, lo que puede afectar la viabilidad celular (Campbell et al., 2007). Para evitar este desbalance osmótico se suelen emplear soluciones no permeables como el manitol, y se aplican antes de del tratamiento con el criopreservantes (Campbell et al., 2007). En todo caso, en nuestro trabajo, tanto el criopreservante A como el B tuvieron como constituyente sacarosa, lo que pudiera haber contribuido a equilibrar la carga osmótica de los mismos. Estudios demuestran que mantener un balance iónico e hidráulico en la célula, facilita el mantenimiento de la homeostasis y permiten obtener células y tejidos más viables después del almacenamiento (Campbell et al., 2007). Criopreservantes similares a los usados en el

presente trabajo han sido exitosamente utilizados en la crio preservación de células germinales en suspensión (Izadyar 2002). Además, existe evidencia de procesos moleculares que explica la muerte celular más allá del daño celular producido por la congelación. Estos mecanismos están relacionados con la apoptosis, la cual es activada debido al estrés celular. En células criopreservadas se ha demostrado que añadir inhibidores de la apoptosis como el Inhibidor V de la Caspasa I aumenta la viabilidad de las células después de la congelación (Baust, Buskirk, & Baust, 2000). Se ha observado que la criopreservación utilizando DMSO diluido en MEM, contribuye al desencadenamiento de procesos de muerte celular como la apoptosis y la necrosis (Baust et al., 2000).

La muerte celular además de impactar el número de espermatogonias viables que se van a obtener (rendimiento) del aislamiento, puede haber influenciado su recuperación después de realizar el plaqueo diferencial. Con la muerte y lisis celular debido al proceso de criopreservación la viscosidad de la solución puede haberse aumentado por la liberación de ácidos nucleicos hacia el medio. Al aumentar la viscosidad del medio, es posible que al menos un porcentaje de las espermatogonias no hayan podido ser recolectadas después del plaqueo diferencial debido a su permanencia unidas a la monocapa somática descartada (Ver Figura # 12 y 13). La cantidad de DNAsa que se añadió al medio de cultivo durante el plaqueo diferencial esta estandarizada para tejido testicular fresco, por lo que probablemente no fue suficiente para neutralizar el ADN libre proveniente de la digestión enzimática durante el aislamiento y así evitar que el medio se vuelva demasiado viscoso.

Para superar el bajo rendimiento de espermatogonias tipo A obtenidas a partir de muestras criopreservadas sería necesario realizar al menos un método más de purificación post - plaqueo diferencial. En la literatura se sugiere que el resultado de la digestión enzimática del tejido testicular debe pasar por al menos un método de purificación (Aponte, 2015), pero en el caso de tejido criopreservado sería necesario realizar un método adicional como gradientes

de concentración discontinuo, como por ejemplo alguno basado en el uso de Percol®. Células testiculares de ratón, rata, conejo e inclusive de animales silvestres como los babuinos, han sido criopreservados por al menos 11 años obteniendo una viabilidad post-descongelación entre 2.8 y 17% y se logró el aumento de su viabilidad hasta el 90% o más utilizando gradientes de Percol® (Wu et al., 2012).

La diferencia entre la composición del tratamiento A y B para la criopreservación del tejido testicular estuvo basada en la presencia de FCS y BSA, respectivamente. Ambos son utilizados como criopreservantes externos (Lima et al., 2017), que no penetran en la célula y se encargan de brindar estabilidad a la membrana celular. Como se muestra en la Figura 1, la viabilidad celular obtenida después de la criopreservación es bastante similar tanto al utilizar el tratamiento A como el B. Sin embargo, las espermatogonias tipo A criopreservadas bajo el tratamiento A se encontraban más saludables (morfológicamente) en comparación a las del tratamiento B, ya que estas últimas presentaban vacuolación (Ver Figura 10 y 11). La vacuolación es una respuesta de las células frente al estrés y una forma de limitar el daño que sufrieron durante la congelación y descongelación (Shubin, Demidyuk, Komissarov, Rafieva, & Kostrov, 2016) lo cual por alguna razón afecto mayormente a las espermatogonias tipo A bajo el tratamiento B. Las células espermatogoniales criopreservadas bajo este tratamiento aparentemente necesitan ser cultivadas para que puedan lograr adaptarse y recuperar su capacidad de proliferación y funcionalidad. El FCS presente en el tratamiento A quizás ayudó a las espermatogonias a manejar mejor las condiciones adversas de la criopreservación, posiblemente debido a su rica cantidad de proteínas y factores de crecimiento.

8.3 Dinámica del crecimiento de SSCs durante el cultivo corto

El descenso de la densidad espermatogonias tipo A GFR α^+ alcanzada hacia el día 12 tanto si el tejido fue previamente criopreservado o no, podría sugerir que estas células se comprometieron hacia una vía de diferenciación. Un estudio similar que evaluó la

supervivencia y proliferación de SSCs bovinas durante su cultivo *in vitro* después de ser criopreservadas demostró que al mantener el cultivo por 2 semanas la proliferación celular al ser xenotransplantadas a los túbulos seminíferos de ratones, disminuía significativamente en comparación a si las células provenían de la primera semana del cultivo (Oatley et al., 2017). Esto es consistente con los resultados de este estudio, al encontrarse que en el día 3 y 6 de cultivo celular proveniente de tejido criopreservado, en promedio se encontró una mayor cantidad de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ en comparación al día 12.

A pesar de la reducción considerable de la viabilidad celular al someter al tejido testicular a la congelación y posterior descongelación, el hecho de haberse determinado que no existe diferencias significativas en la densidad de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ alcanzada a lo largo del cultivo, sugiere que las células pudieron recuperarse del daño que sufrieron durante la congelación y mantuvieron su gran capacidad de proliferación. Una posible explicación puede darse al analizar la regulación del número de espermatogonias en los testículos.

Cuando existe alguna situación que afecte el número de espermatogonias (ej. Radiación) y este se reduce, las espermatogonias sobrevivientes a esta situación centran sus esfuerzos en formar más células madre y dan menor prioridad a formar células comprometidas con al espermatogénesis (de Rooij & Russell, 2000). Este mismo proceso puede haber sido causado por la criopreservación, y así la población de espermatogonias posiblemente se recuperó durante el cultivo, siendo sus números estadísticamente igual que las espermatogonias A provenientes de tejido fresco.

Las espermatogonias no diferenciadas en los ratones representan el 0.03% de todas las células germinales (Tegelenbosch & de Rooij, 1993), extrapolarlo estos datos al contexto de este experimento se esperaría encontrar una densidad de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ de 0,001 SSCs por cm^2 . Comparando con la densidad promedio de espermatogonias $GFR\alpha$ positivas ≈ 1.0 y 1.2 para el tratamiento A y B respectivamente, existe una amplia diferencia

en las densidades de espermatogonias no diferenciadas. Posiblemente esta diferencia en número se debe a diferencias interespecíficas y el contexto en el que se determinó la densidad de SSCs, el estudio de Tegelenbosch lo realizó a partir de tejido testicular montado en placas mientras que este estudio se realizó a partir de un cultivo de células testiculares.

Este estudio evaluó la proliferación espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ después haber sido criopreservadas dentro de su contexto tisular, pero no se realizaron pruebas funcionales para determinar que aun poseían características de células madre. Un estudio en el cual se criopreservaron células testiculares murinas durante 14 años, obtuvo una viabilidad celular después de la descongelación del 17.0%, utilizando gradientes de Percol® se purificaron estas muestras hasta el 93.0% y fueron implantadas en ratones receptores, sin la realización de un cultivo celular como en este estudio o el de Oatley en 2004, logrando igualmente resultados satisfactorios al restaurar la espermatogénesis y hasta generar progenie viva y saludable post trasplante (Wu et al., 2012); demostrando que ciertas poblaciones de espermatogonias tipo A retienen su funcionalidad de célula madre después de la congelación, incluso después de muchos años.

Como se mencionó anteriormente, no existe diferencia significativa en la densidad de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ entre los tratamientos de criopreservación A y B, pero si existen diferencias en la dinámica del crecimiento bajo distintas condiciones de FCS. Esto se puede explicar al comparar cuan saludables (morfológicamente) se encontraban las espermatogonias tipo A vivas después de la descongelación. Con el tratamiento A las células espermatogoniales tipo A $GFR\alpha^+$ proliferaron mejor bajo 1% de FCS, debido a que el 10% estimuló más bien la diferenciación celular hacia otros linajes $GFR\alpha$ negativos. En la literatura se señala que el FCS contiene complejos factores aun no identificados que ocasionalmente determinan el destino de las células (diferenciación) (Kim et al., 2015).

Debido a que las espermatogonias criopreservadas bajo el tratamiento A se encontraban más

saludables, necesitaron una menor cantidad de FCS y porcentajes mayores de estas células probablemente se comprometieron hacia la vía de la diferenciación. Muchas de las espermatogonias procedentes del tratamiento B se encontraban vacuoladas; la vacuolación es una respuesta homeostática celular para limitar el daño, pero cuando no se logra regular adecuadamente el daño las células mueren rápidamente (Shubin et al., 2016). Debido a este estado fisiológico alterado de las espermatogonias provenientes del tratamiento B, el efecto del FCS sobre la proliferación de células $GFR\alpha^+$ no fue decisivo y por lo tanto existió mucha variabilidad en la dinámica de mantenimiento de las SSC.

9 CONCLUSIONES

La tasa de mortalidad celular claramente afectó el rendimiento en la obtención de espermatogonias tipo A vivas partir de tejido criopreservado. A pesar de esto, no existió diferencia significativa en el crecimiento de espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ durante el cultivo lo que demuestra que este linaje celular aún conserva su capacidad de proliferación aun después de ser sometidas a tratamientos de criopreservación. Esto abre las puertas a llevar este procedimiento hacia aplicaciones más prácticas y funcionales como espermatogénesis *in vitro* o trasplante de células madre espermatogoniales y a su utilización en la preservación de tejido testicular en animales silvestres.

Bajo el tratamiento A, es posible obtener espermatogonias tipo A más saludables al limitar el daño y estrés celular durante la criopreservación en comparación al tratamiento B. Aunque durante el cultivo se alcanzaron densidades de células $GFR\alpha^+$ similares en ambos tratamientos, el tratamiento A permite obtener resultados menos variables y más predecibles. El mejor momento para recolectar las espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ y utilizarlas tanto para trasplante de células madre espermatogoniales o en espermatogénesis *in vitro* es durante la primera semana del cultivo después de la descongelación, debido a que aparentemente se encuentran en activa división mitótica mientras que en la segunda semana de cultivo la tendencia general observada es la disminución de su densidad celular, indicando que se comprometieron hacia la vía de diferenciación celular.

10 RECOMENDACIONES

Con el objetivo de aumentar la cantidad de espermatogonias tipo A viables después del aislamiento celular, se recomienda utilizar una mayor concentración de DNAsa en el medio de cultivo durante los lavados para retirar al criopreservante, así como también durante el plaqueo diferencial, a fin de eliminar los ácidos nucleicos liberados al homogenizar los tejidos y durante la digestión enzimática.

Es importante añadir al menos un método más de purificación. Un bajo rendimiento de espermatogonias tipo A vivas en la muestra limitó el número de ensayos a realizarse. Además la evaluación de la viabilidad de las espermatogonias debería hacerse tanto antes como después del plaqueo diferencial a fin de determinar el porcentaje de espermatogonias que murieron durante la criopreservación.

Se recomienda utilizar el tratamiento A de criopreservación sobre el tratamiento B, ya que permitió obtener espermatogonias tipo A más saludables y un comportamiento más predecible y reproducible durante los cultivos.

Con el objetivo de mejorar la variabilidad encontrada en este experimento y dilucidar con mayor exactitud diferencias significativas entre los distintos tratamientos, así como las condiciones de cultivo, se recomienda utilizar al menos 4 réplicas del experimento.

Es recomendable ampliar los resultados de este trabajo realizando pruebas funcionales de las espermatogonias tipo A $GFR\alpha^+$ obtenidas bajo las condiciones experimentales de este trabajo.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbdelHafez, F. F., Desai, N., Abou-Setta, A. M., Falcone, T., & Goldfarb, J. (2010). Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive Biomedicine Online*, 20(2), 209-222. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.11.013>
- Aponte, Pedro 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, Pedro Manuel. (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>
- Baust, J. M., Buskirk, R. V., & Baust, J. G. (2000). Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 36(4), 262-270. [https://doi.org/10.1290/1071-2690\(2000\)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0262:CVIFIO>2.0.CO;2)
- Best, B. P. (2015). Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Research*, 18(5), 422-436. <https://doi.org/10.1089/rej.2014.1656>
- Campbell, L. H., Brockbank, K. G. M., & Sato, J. D. (2007). Serum-free solutions for cryopreservation of cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 43(8 & 9), 269-275. <https://doi.org/10.1007/s11626-007-9039-z>
- Curaba, M., Verleysen, M., Amorim, C. A., Dolmans, M.-M., Van Langendonck, A., Hovatta, O., ... Donnez, J. (2011). Cryopreservation of prepubertal mouse testicular tissue by

vitrification. *Fertility and Sterility*, 95(4), 1229-1234.e1.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.062>

Curry, M. (2007). Cryopreservation of Mammalian Semen. En *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (2da Edición, pp. 303-313). New Jersey: Humana Press.

Day, J., & Stacey, G. (2007). Preface. En *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Segunda, p. 5). New Jersey: Humana Press.

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.

Devi, L., & Goel, S. (2016). Fertility preservation through gonadal cryopreservation. *Reproductive Medicine and Biology*, 15(4), 235-251. <https://doi.org/10.1007/s12522-016-0240-1>

Embryo Transfer in Pigs - Management and Nutrition. (s. f.). Recuperado 9 de octubre de 2017, a partir de <http://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/embryo-transfer-in-farm-animals/embryo-transfer-in-pigs>

FAO. (2012). *Cryopreservation of Animal Genetic Resources* (12.^a ed.). Rome: FAO.

FAO. (2013). User Guidance. En *In Vivo Conservation of Animal Genetic Resources* (14.^a ed.). Rome: FAO Animal Production and Health Guidelines.

Herrid, M., Olejnik, J., Jackson, M., Suchowerska, N., Stockwell, S., Davey, R., ... Hill, J. R. (2009). Irradiation Enhances the Efficiency of Testicular Germ Cell Transplantation in Sheep. *Biology of Reproduction*, 81(5), 898-905.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078279>

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., Matthijs-Rijsenbilt, J. J., Den Ouden, K., Creemers, L. B., Woelders, H., & de Rooij, D. G. (2002). Development of a Cryopreservation Protocol for Type A Spermatogonia. *Journal of Andrology*, *23*(4), 537-545.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02276.x>
- Kim, K.-J., Kim, B. G., Kim, Y.-H., Lee, Y.-A., Kim, B.-J., Jung, S.-E., ... Ryu, B.-Y. (2015). In Vitro Spermatogenesis Using Bovine Testis Tissue Culture Techniques. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *12*, 314-323. <https://doi.org/10.1007/s13770-015-0045-z>
- Lima, D. B. C., Silva, L. D. M. da, Lima, D. B. C., & Silva, L. D. M. da. (2017). Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. *Ciência Rural*, *47*(11). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170135>
- McGuire, P. (1985). Importance of Genetic Resources. En *Genetic Resources Conservation Program Annual* (pp. 30-39). California: University of California Genetic Resources.
- MIAO, X. (2011). Production of Transgenic Animals Using Spermatogonial Stem Cells. *Agricultural Sciences in China*, *10*(5), 762-768. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60060-6](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60060-6)
- National Research Council. (1993). Biotechnology and Germplasm Conservation. En *Managing Global Genetic Resources: Agricultural Crop Issues and Policies*. (p. 189). Washington, DC: The National Academies Press.
- Oatley, J. M., Reeves, J. J., & McLean, D. J. (2004). Biological Activity of Cryopreserved Bovine Spermatogonial Stem Cells During In Vitro Culture. *Biology of Reproduction*, *71*(3), 942-947. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028894>
- Overview of Embryo Transfer in Farm Animals - Management and Nutrition. (s. f.).
 Recuperado 9 de octubre de 2017, a partir de

<http://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/embryo-transfer-in-farm-animals/overview-of-embryo-transfer-in-farm-animals>

- Paytner, S., & Fuller, B. (2007). Cryopreservation of Mammalian Oocytes. En *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Segunda, pp. 313-325). New Jersey: Humana Press.
- Pegg, D. (2007). Principles of Cryopreservation. En *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (Segunda, pp. 39-59). New Jersey: Humana Press.
- Pothana, L., Makala, H., Devi, L., Varma, V. P., & Goel, S. (2015). Germ cell differentiation in cryopreserved, immature, Indian spotted mouse deer (*Moschiola indica*) testes xenografted onto mice. *Theriogenology*, *83*(4), 625-633.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.028>
- Sadri-Ardekani, H., & Atala, A. (2014). Testicular tissue cryopreservation and spermatogonial stem cell transplantation to restore fertility: from bench to bedside. *Stem Cell Research & Therapy*, *5*(3), 68. <https://doi.org/10.1186/scrt457>
- Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., ... Ogawa, T. (2011). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature*, *471*, 504-7. <https://doi.org/10.1038/nature09850>
- Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M., & Kostrov, S. V. (2016). Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget*, *7*(34), 55863-55889. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10150>
- Singh, S. R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., & Hou, S. X. (2011). Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(3), 468-483. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01242.x>

- 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.
- Thibier, M. (2005). The zootechnical applications of biotechnology in animal reproduction: current methods and perspectives. *Reproduction Nutrition Development, 45*(3), 235-242. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005016>
- Trounson, A., Peura, A., & Kirby, C. (1987). Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertility and Sterility, 48*(5), 843-850.
- Universidad Nacional de Cordoba. (2013). Clase 1: 4.1.2. Espermiogénesis. Recuperado 17 de diciembre de 2017, a partir de <http://www.fca.proed.unc.edu.ar/mod/book/view.php?id=5302&chapterid=874>
- Wilkes, G. (1989). Germplasm preservation: objectives and needs. En *Biotic Diversity and Germplasm Preservation, Global Imperatives* (pp. 13-41). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-009-2333-1_2
- Wu, X., Goodyear, S. M., Abramowitz, L. K., Bartolomei, M. S., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2012). Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human Reproduction (Oxford, England), 27*(5), 1249-1259. <https://doi.org/10.1093/humrep/des077>
- Yokonishi, T., & Ogawa, T. (2016). Cryopreservation of testis tissues and in vitro spermatogenesis. *Reproductive Medicine and Biology, 15*(1), 21-28. <https://doi.org/10.1007/s12522-015-0218-4>

12 ANEXO A: TABLAS

Tabla 1: supervivencia celular después del aislamiento pre y post-congelación

Aislamiento	Pre congelación		Post congelación			
	Control		Tratamiento A		Tratamiento B	
	2	3	2	3	2	3
% Células somáticas vivas	50.3%	63%	17.7%	19.1%	9.3%	12.85%
% Supervivencia de Espermatogonias	88.6%	97.5%	92%	70.0%	80.0%	83.0%
% Espermatogonias vivas en muestras	26.0%	55.2%	9.5%	3.11%	3.6%	3.2%

Tabla 2: Preparación del medio de criopreservación

Compuesto	Tratamiento A	Tratamiento B
DMSO	2 ml	2 ml
MEM	6 ml	6 ml
FCS	2 ml	0 ml
BSA 2%	0 ml	2 m

13 ANEXO B: FIGURAS

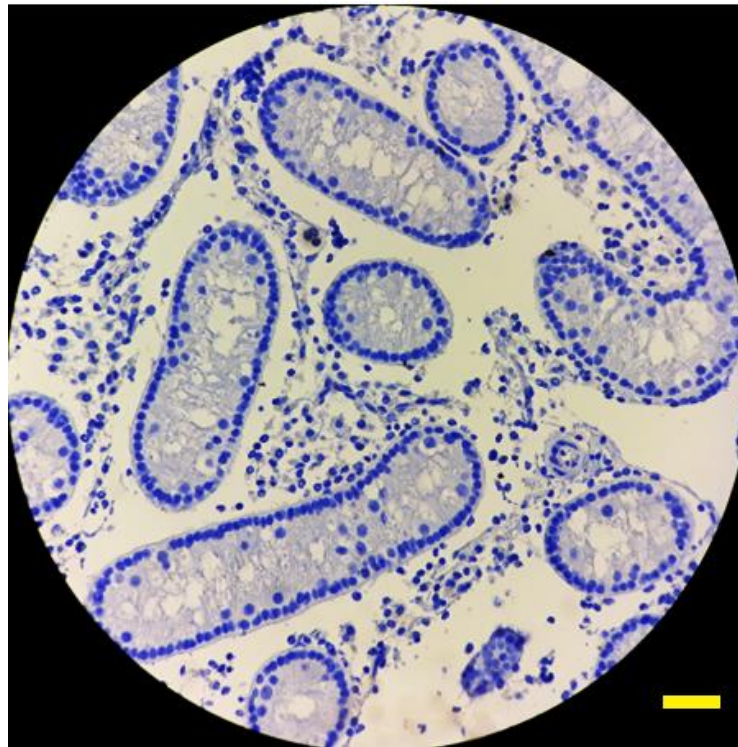


Figura 1: Corte histológico del tejido testicular criopreservado bajo el tratamiento A. Tinción hematoxilina. Barra = 100 μ m

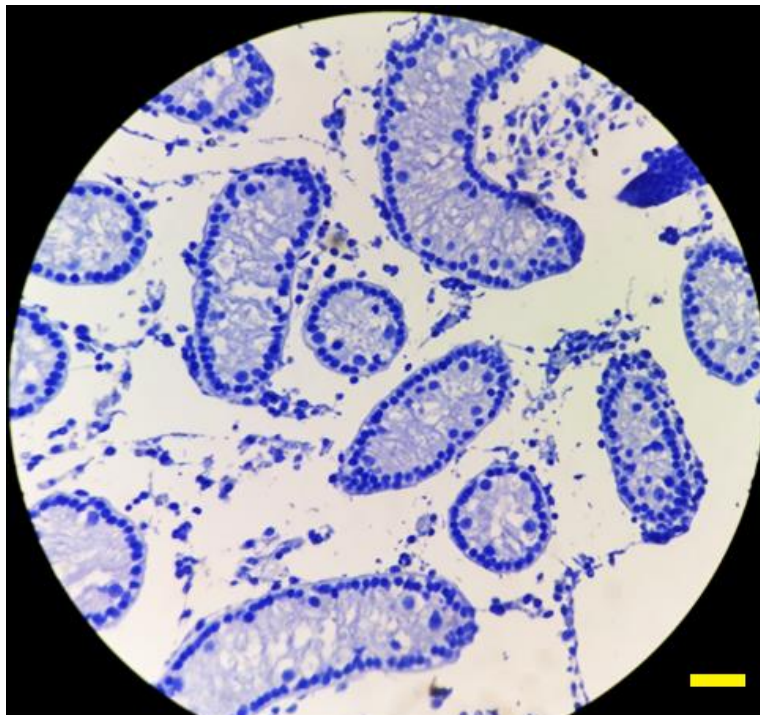


Figura 2: Corte histológico del tejido testicular criopreservado bajo el tratamiento B. Tinción hematoxilina. Barra = 100 μ m

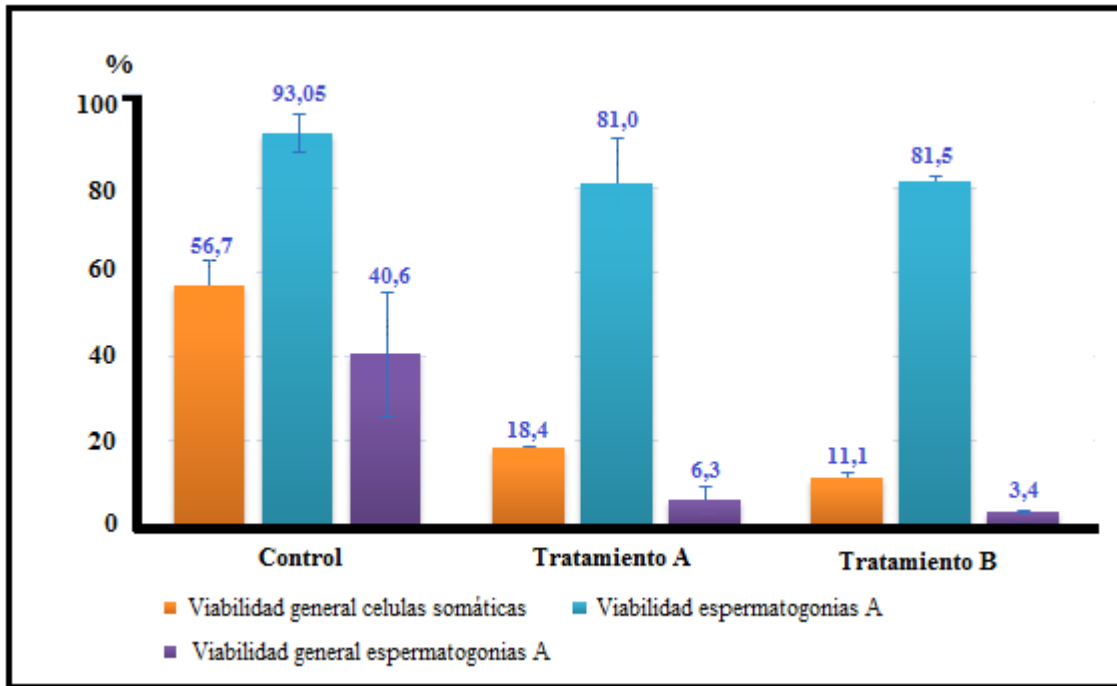


Figura 3: Evaluación de la supervivencia celular del aislamiento proveniente de tejido testicular fresco (control) o criopreservado (Post-descongelación, tratamientos A y B).

Los resultados se presentan como la media \pm SEM. Los tratamientos A y B incluyeron criopreservantes con sacarosa y DMSO, además de FCS (tratamiento A) o BSA (tratamiento B). La viabilidad se refiere al porcentaje de células azul tripán negativas. La viabilidad general se basa en el número total de células. La viabilidad de espermatozonias tipo A se establece en base al total de espermatozonias tipo A.

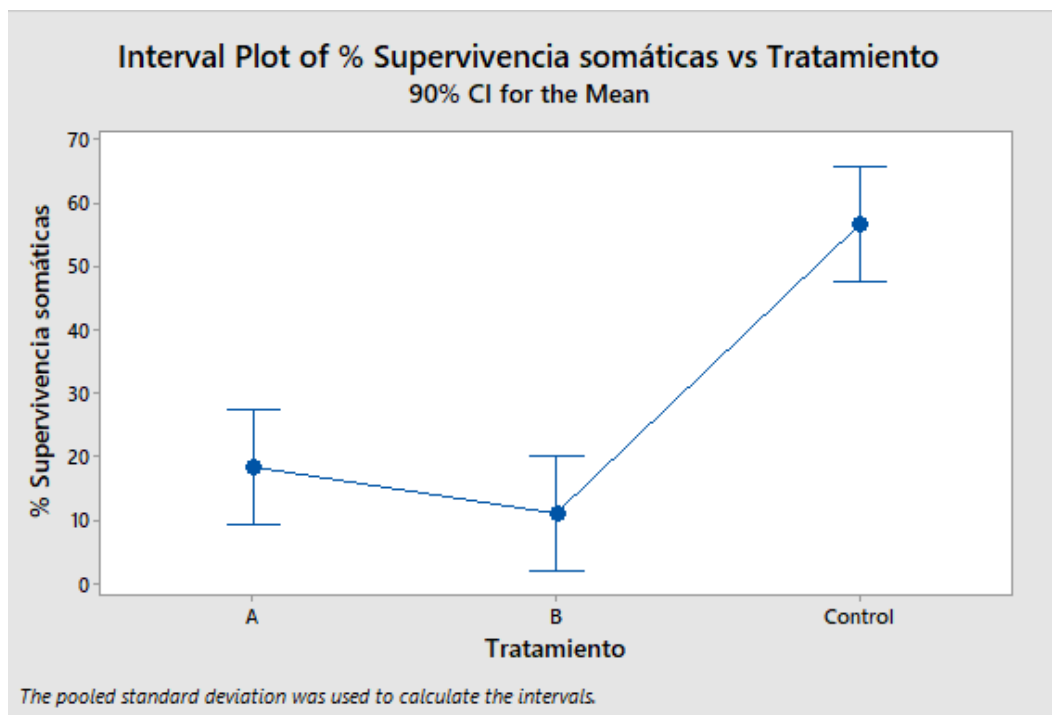


Figura 4: Intervalos de confianza para diferencias en la media en la supervivencia de las células somáticas aisladas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza= 90%.

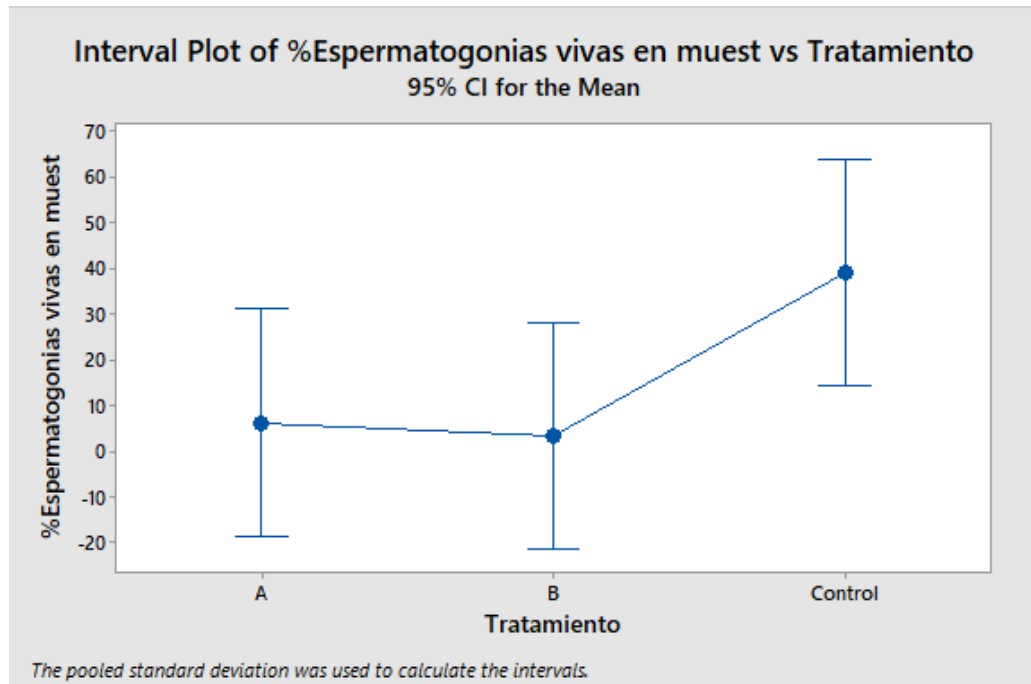


Figura 5: Intervalos de confianza para diferencias en la media en la cantidad de espermatogonias tipo A aisladas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza=95%.

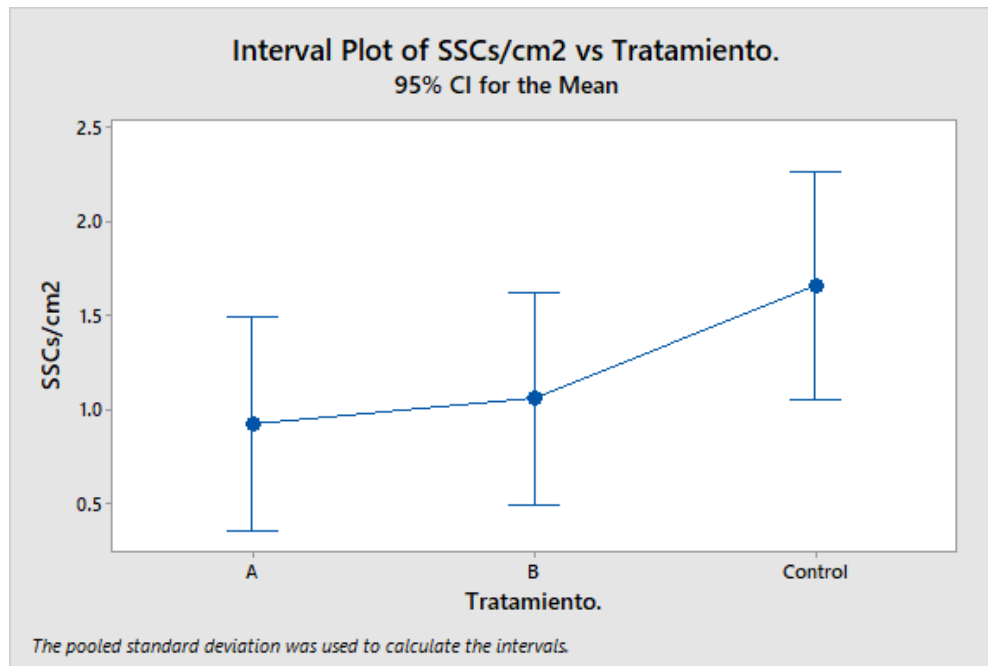


Figura 6: Intervalos de confianza para diferencias en la media de la densidad de espermatogonias tipo A GFR α^+ cultivadas a partir de tejido testicular fresco o criopreservado. Nivel de confianza=90%.

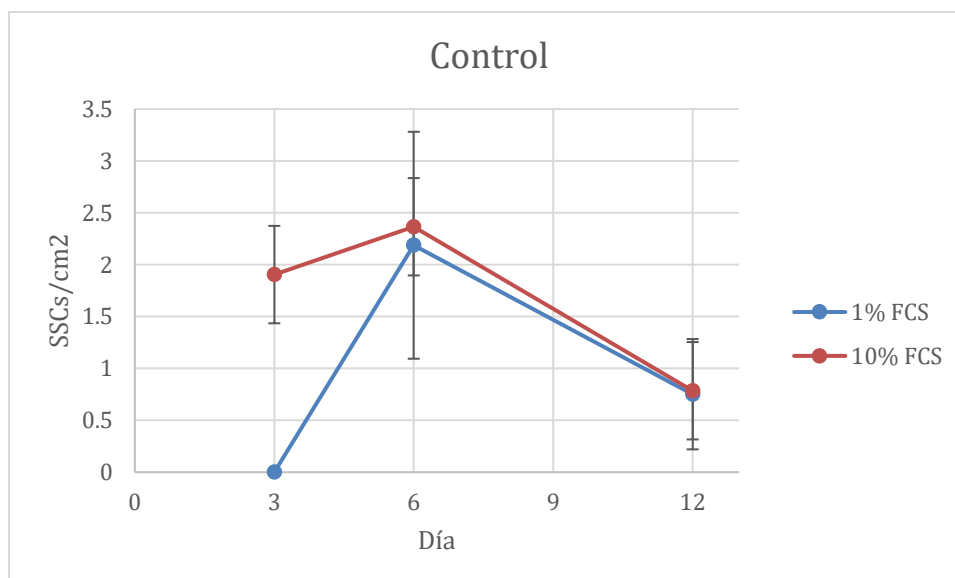


Figura 7: Dinámica del crecimiento de espermatogonias GFR α^+ obtenidas de tejido testicular fresco. Los resultados están expresados como la media \pm SEM

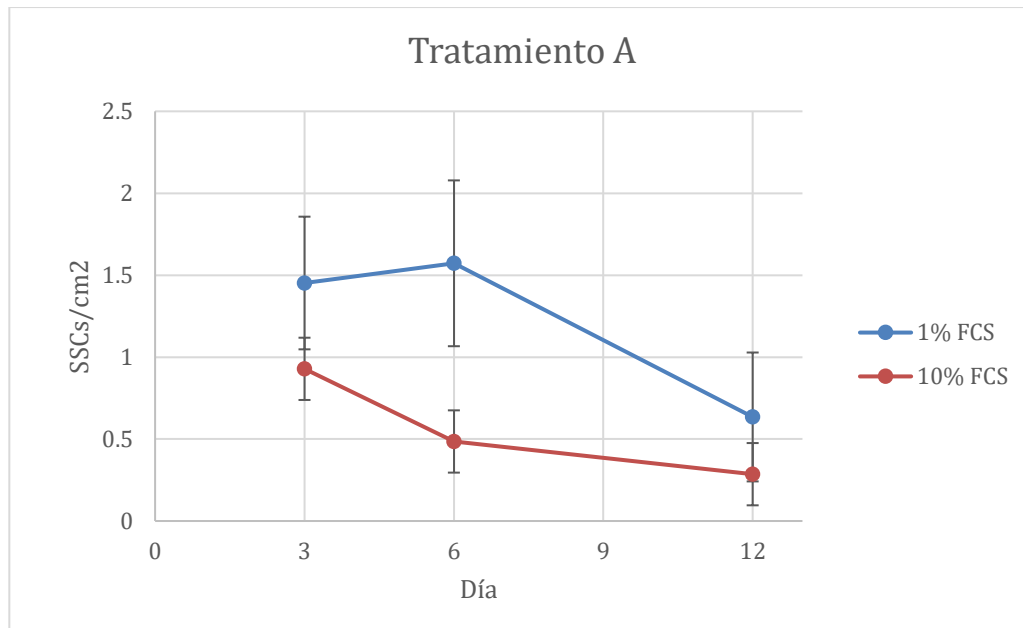


Figura 8: Dinámica del crecimiento de espermatozonias $GFR\alpha 1+$ obtenidas de tejido testicular criopreservado con el tratamiento A. Los resultados están expresados como la media \pm SEM

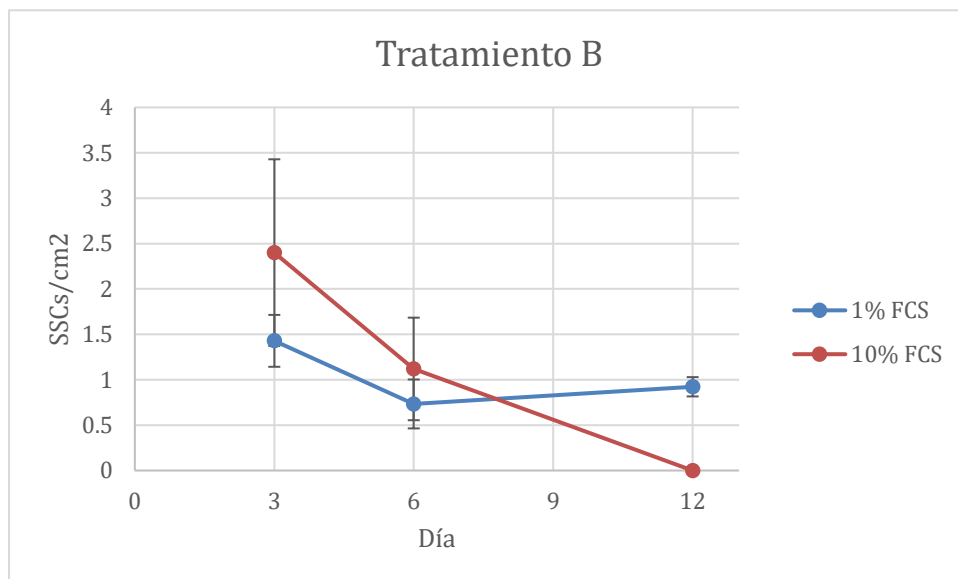


Figura 9: Dinámica del crecimiento de espermatozonias $GFR\alpha 1+$ obtenidas de tejido testicular criopreservado con el tratamiento B. Los resultados están expresados como la media \pm SEM.

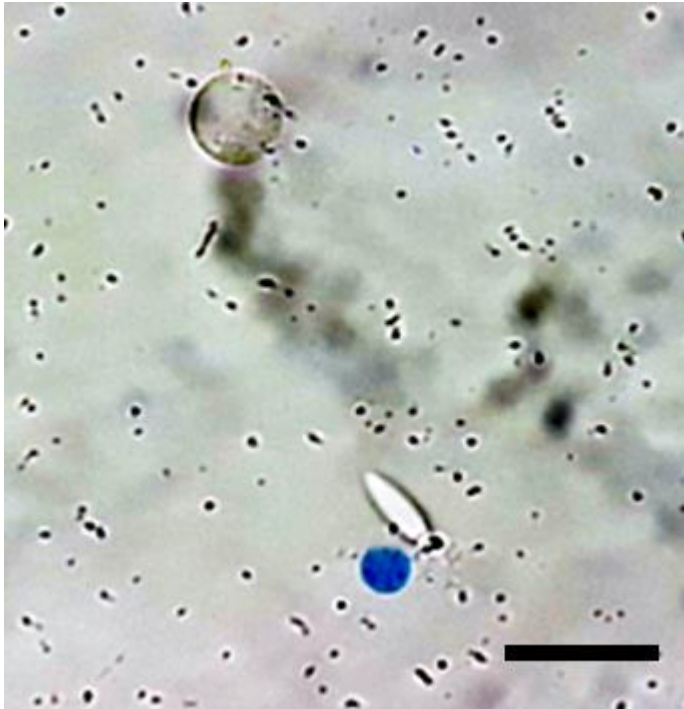


Figura 10:Espermatogonia tipo A viva en el tratamiento A. Tinción azul tripan. Barra = 20 μm

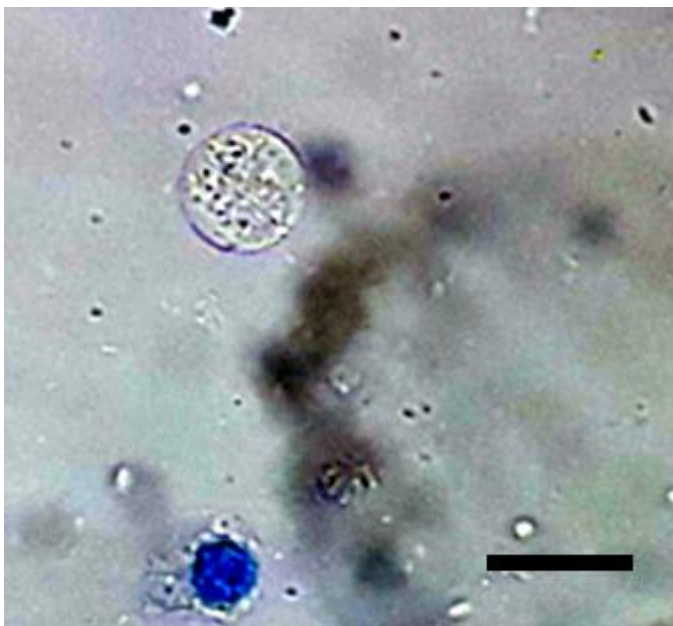


Figura 11: Espermatogonia tipo A viva en el tratamiento B. Tinción azul tripan. Barra = 15 μm

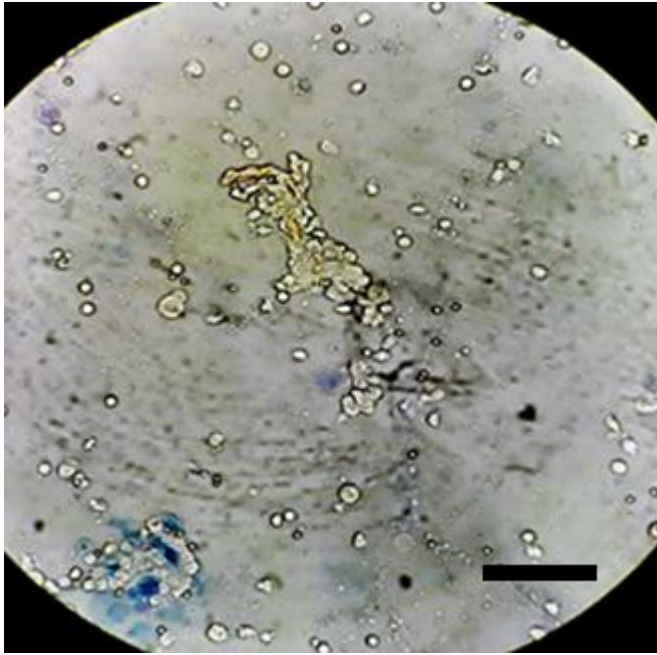


Figura 12: Celulas adheridas al flask de cultivo despues de plaqueo diferencial en el tratamiento A. Tinción azul tripan. Barra = 50 μm

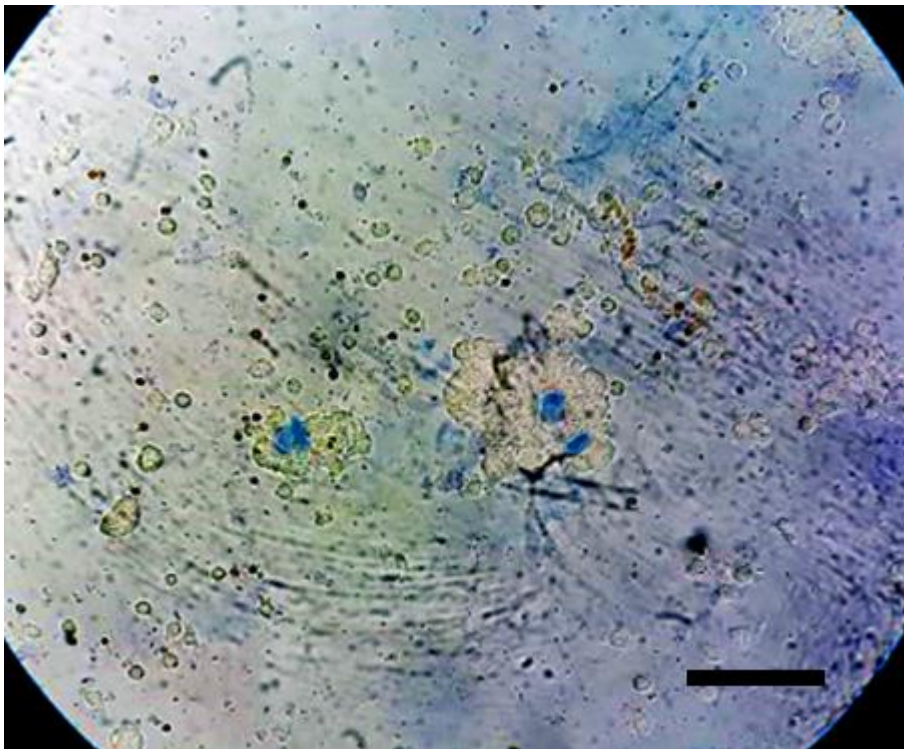


Figura 13: Celulas adheridas al flask de cultivo despues de plaqueo diferencial en el Tratamiento B. Tinción azul tripan. Barra = 50 μm

