

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Cultivo de tejido testicular bovino *in vitro* en hidrogeles
Proyecto de Investigación

Marco Andrés Jarrín Suárez
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 08 de mayo de 2019

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Cultivo de tejido testicular bovino *in vitro* en hidrogeles

Marco Andrés Jarrín Suárez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte García, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 08 de mayo de 2019

Derechos de Autor

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

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Marco Andrés Jarrín Suárez

Código: 00112156

Cédula de Identidad: 1003317516

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2019

RESUMEN

En este trabajo de investigación se realizó una técnica de cultivo de tejido testicular bovino *in vitro* en hidrogeles de pectina y quitosano para monitorear la espermatogénesis, analizar la viabilidad espermática en un sistema tridimensional, la morfología del tejido testicular y del biomaterial a base de hidrogel en la espermatogénesis y una estimación de la relación área poros hidrogel-área sección transversal de los túbulos seminíferos bovinos durante el transcurso de 14 días (n= 3 animales). El monitoreo de la espermatogénesis se hizo a través de técnicas histológicas (fijación en solución de Bouin e inclusión en parafina). La viabilidad espermática mediante la técnica de azul tripán. La morfología del tejido testicular con imágenes microscópicas del hidrogel y la relación espacial área poro hidrogel-área sección transversal túbulo seminífero se realizó mediante el programa morfométrico ImageJ. La microscopia óptica mostró el mantenimiento celular de las células en los 14 días de investigación, así como un porcentaje de espermatozoides vivos del 55%. Los análisis estadísticos en cuanto a la morfología testicular y del biomaterial a lo largo del tiempo no fueron significativos ($p>0.05$). El análisis espacial indicó que pueden abarcar 4,43 túbulos en cada poro del hidrogel. Se logró mantener la viabilidad espermática en un sistema tridimensional, la morfología de los túbulos y del hidrogel lo cual nos ayuda a entender la biocompatibilidad para el mantenimiento de las células en cultivo *in vitro*, sin embargo, esta técnica sigue en desarrollo para obtener una completa diferenciación en proceso de la espermatogénesis *in vitro*.

Palabras clave: Cultivo de tejido *in vitro*, hidrogel, sistema tridimensional, espermatogénesis, viabilidad espermática, relación tejido-hidrogel.

ABSTRACT

In this research work, a bovine testicular tissue culture technique was performed *in vitro* in pectin and chitosan hydrogels to monitor spermatogenesis, analyze sperm viability in a three-dimensional system, the morphology of testicular tissue and the hydrogel-based biomaterial in spermatogenesis and an estimate of the pore-area hydrogel-area cross-sectional relationship of the bovine seminiferous tubules over the course of 14 days ($n = 3$ animals). The monitoring of spermatogenesis was done through histological techniques (fixation in Bouin's solution and paraffin inclusion). Sperm viability using the trypan blue technique. The morphology of the testicular tissue with microscopic images of the hydrogel and the spatial relationship area by hydrogel-area, cross-section seminiferous tubule was performed by the ImageJ morphometric program. The optical microscopy showed the cellular maintenance of the cells in the 14 days of investigation, as well as a percentage of live sperm of 55%. Statistical analyzes regarding testicular morphology and biomaterial morphology over time were not significant ($p > 0.05$). The spatial analysis indicated that they can encompass 4.43 tubules in each pore of the hydrogel. The sperm viability was maintained in a three-dimensional system, the morphology of the tubules and the hydrogel, which helps us to understand the biocompatibility for the maintenance of the cells in *in vitro* culture, however, this technique is still under development to obtain a complete differentiation in the process of *in vitro* spermatogenesis.

Key words: *In vitro* tissue culture, hydrogel, three-dimensional system, spermatogenesis, sperm viability, tissue-hydrogel relationship.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Cultivo de tejidos	10
1.2 Historia	10
1.3 Tejido testicular (testículo como órgano)	11
1.4 Espermatogénesis	12
1.5 Espermatogénesis <i>in vitro</i>	13
1.6 Espermatogénesis <i>in vitro</i> utilizando tejido testicular	13
1.7 Hidrogeles	15
<i>Tipos de hidrogeles</i>	15
<i>Aplicaciones en biología</i>	16
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general:	17
2.2. Objetivos específicos:	17
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. ÁREA DE ESTUDIO	18
5. MATERIALES	19
5.1 Procesamiento del material	19
5.2 Obtención del biomaterial (Hidrogel)	19
5.3 Desinfección y Rehidratación del biomaterial (Hidrogel)	20
5.4 Cultivo de tejido testicular	20
5.5 Evaluación de viabilidad de espermatozoides	21
5.6 Análisis Histológico	21
5.7 Inclusión en parafina	21
5.8 Tinción	22
5.9 Análisis de resultados	22
6. MÉTODOS	22
6.1 Recolección y procesamiento de la muestra	22
6.2 Obtención del biomaterial (hidrogel)	23
6.3 Desinfección y rehidratación del biomaterial (hidrogel)	23
6.4 Cultivo de tejido testicular	24
6.5 Evaluación de viabilidad de espermatozoides	24
6.6 Análisis histológico e inclusión en parafina prueba bouin	25

6.7	Tinción hematoxilina	26
6.8	Análisis de resultados	26
7.	RESULTADOS	27
7.1	Análisis seminal de los cortes del tejido testicular	27
7.1.1	Viabilidad de los espermatozoides.....	27
7.2	Análisis de los túbulos seminíferos.....	27
7.2.1	Diámetro de los túbulos seminíferos	28
7.2.2	Área de los túbulos seminíferos	28
7.3	Análisis de las muestras del biomaterial (hidrogel).....	28
7.3.1	Ancho de las fibras del Hidrogel.....	29
7.3.2	Área del poro del hidrogel.....	29
7.4	Estimación de la relación espacial túbulos seminíferos –hidrogel	29
8.	DISCUSIÓN	30
9.	CONCLUSIONES.....	36
10.	RECOMENDACIONES.....	37
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
12.	ANEXO A: TABLAS	42
13.	ANEXO B: FIGURAS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	42
Tabla 2.....	42
Tabla 3.....	43
Tabla 4.....	43
Tabla 5.....	44
Tabla 6.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	45
Figura 2	46
Figura 3	46
Figura 4	47
Figura 5	47

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de tejidos

Un cultivo de tejido se define como un conjunto desarrollado de técnicas que permite mantener en lo posible el tejido, células u órganos vivos con sus respectivas funciones y propiedades bioquímicas y genéticas (Másteres, 2013). Cabe mencionar, que existen varios tipos de cultivo según el grado de preservación del tejido y el tiempo de duración. Por ejemplo, los cultivos de órganos que se caracterizan por ser mantener la organización tridimensional parcial con sus características histológicas del tejido; sin embargo, su crecimiento es limitado. Por otro lado, tenemos los explantes primarios que, principalmente, están constituidos por pequeños fragmentos de tejido y están adheridos a una superficie, esta superficie puede ser un andamiaje para el tejido. En este tipo de cultivo crecen las células de la periferia del explante (Davis, 2012). También tenemos el cultivo de células disgregadas, este tipo de cultivo se forma por células dispersas de un tejido vivo, cultivo primario o de alguna línea celular, teniendo en cuenta una disgregación del tejido por sistemas químicos, enzimáticos o mecánicos (Trowell, 2016). Este cultivo es el más utilizado debido a su propagación mantenida, siendo este cultivo en monocapa (células adheridas sobre un soporte sólido para su proliferación celular) o en suspensión (células dispersas en el medio de cultivo sin la necesidad de un anclaje) (Davis, 2012). Por último, está el cultivo histotípico en el cual las células del tejido se reagrupan en una superficie tridimensional para formar una estructura semejante al tejido original (Stukenborg, J. B., & Wistuba, J., 2015).

1.2 Historia

Los avances con cultivo de tejidos se han ido incrementando con el paso de los años. Este tipo de técnicas no son recientes ya que el cultivo de células comenzó en 1885 cuando el científico Rux consiguió aislar las células de un embrión de pollo en una solución salina, lo

que daría paso a la investigación de varios científicos para comenzar a utilizar técnicas *in vitro*, que tuvo inicios en 1920, sin embargo, no fue sino hasta el periodo 1986-1998 que se pudieron aislar y cultivar células madres embrionarias pluripotenciales en ratones y humanos (Freshney, 2000).

Desde ese entonces la investigación con tejidos ha ido incrementando, sobre todo en tejido testicular en ratones las cuales se basan en métodos convencionales y modernos con sistemas de tres dimensiones como matriz de colágeno u otros sistemas de adherencia.

1.3 Tejido testicular (testículo como órgano)

Los testículos o gónadas masculinas son dos órganos simétricos de forma ovoide localizados fuera de la cavidad abdominal en la mayoría de los mamíferos, que están sujetos y envueltos en una bolsa de piel llamada escroto. Adicionalmente, los testículos están revestidos por una membrana fibrosa, la túnica albugínea, que se proyecta al interior de estos, dividiéndolos en numerosos lóbulos, los cuales constan de una serie de conductos muy delgados rodeados de tejido conectivo. Dentro de cada túbulo se asienta el epitelio seminífero y por esta razón se denominan túbulos seminíferos, que se repliegan sobre sí mismos formando una especie de red (*rete testis*), (Robaire et al., 2006). En el tejido conectivo intertubular (intersticial) se encuentran unas células especializadas denominadas células de Leydig, que son las encargadas de producir la testosterona y otros andrógenos (Robaire et al., 2006). Los túbulos de la *rete testis* confluyen entre sí, dando origen a unos conductos mayores, conductos eferentes, que, a su vez, convergen en un solo ducto grueso: conducto del epidídimo. Este cumple funciones como maduración, motilidad, almacenamiento de los espermatozoides, así como la obtención por parte de estos de la capacidad de fertilizar al óvulo (Srivastava, 2017). Cabe indicar, que dentro de los túbulos seminíferos, en su epitelio seminífero, se forman de los espermatozoides en un proceso llamado espermatogénesis con el apoyo de las células de Sertoli (células somáticas) (Zirkin & Papadopoulos, 2018).

1.4 Espermatogénesis

Los testículos presentan un papel central en la reproducción siendo el lugar de la espermatogénesis. La espermatogénesis se encarga de la producción de espermatozoides. Este es un proceso celular complejo, continuo y prolífico en la diferenciación de células germinales que ocurren en el macho. El proceso tiene como elementos fundamentales la división de las células madres espermatogoniales (mitosis), la meiosis y la espermiogénesis (metamorfosis de la espermátidas a espermatozoide maduro); este proceso no es autónomo sino que requiere de las células somáticas (Sertoli) y las células peritubulares mioideas así como de otras células del intersticio (Aponte, Soda, van de Kant, & de Rooij, 2008).

La fase de la proliferación de las espermatogonias (células madre en proliferación) se caracteriza por presentar una división mitótica rápida para su diferenciación. La primera generación de espermatogonias tipo A se genera de las células madre espermatogoniales. Estas cohortes de espermatogonias A en vías de diferenciación se transforman sucesivamente en espermatogonias A1, A2, A3, A4, espermatogonias intermedias y espermatogonias B. Esta fase es la responsable de incrementar las espermatogonias para amplificar el número de células germinales que darán una gran eficiencia a los pasos subsiguientes de la espermatogénesis. No obstante, la dinámica celular de las espermatogonias difiere entre especies y el número de generaciones puede variar (Zini & Agarwal, 2014).

La segunda fase de la espermatogénesis es la meiosis, la cual se caracteriza por reducir el número de cromosomas y la recombinación del material genético dando como resultado final células germinales haploides. Antes de la meiosis, las espermatogonias tipo B (doble carga cromosómica, $2n$) dan origen a los espermatocitos en pre-leptoteno, cuyo ADN se duplica sin que haya división celular. Los espermatocitos en pre-leptoteno ($4n$) entran en la meiosis I (en esta fase ocurre la sinapsis, crossing-over o recombinación y la separación de los cromosomas homólogos) para generar espermatocitos secundarios (células resultantes de la

meiosis I, $2n$). Esto permite dar paso a la meiosis II la cual da origen las espermátidas redondas (haploides, $1n$) (Comizzolli, 2015).

Por último, la fase de la metamorfosis tiene como objetivo la transformación de las espermátidas en espermatozoides. En esta fase se forma la cabeza, la pieza media y la cola de los espermatozoides y también intervienen activamente las células de Sertoli para que puedan las espermátidas alimentarse y dar paso a la formación del acrosoma, condensación de la cromatina nuclear y eliminación de la mayor parte del citoplasma, para finalmente pasar al epidídimo donde ocurre su maduración y almacenamiento (Zini & Agarwal, 2014).

1.5 Espermatogénesis *in vitro*

Las espermatogénesis *in vitro* es definida como la proliferación de células germinales y generación de espermatozoides fuera del organismo (Komeya y Ogawa, 2018). Sin embargo, este todavía representa un desafío ya que se presentan diversas variables tales como: animal, uso de sistemas de cultivo, tiempo y la obtención de espermatozoides maduros (Lee., et al, 2013). No obstante, la espermatogénesis *in vitro* muestra un avance real y potencial en la biología celular y la biotecnología; proporcionado estrategias prometedoras desde diferenciación de células germinales hasta la preservación de germoplasma e incluso su inclusión en programas de fertilidad (Aponte y Franca, 2013).

1.6 Espermatogénesis *in vitro* utilizando tejido testicular

Dentro del campo de biología celular, reproducción animal y la biotecnología, existen investigaciones innovadoras para lograr la espermatogénesis *in vitro* de forma adecuada. Es por eso que, en este sentido, se han realizado numerosos experimentos con tejido testicular de diferentes animales como ratones, ratas, ovejas y bovinos que han generado resultados prometedores (Stukenborg, J. B., & Wistuba, J., 2015). Por ejemplo, en ratones se han estudiado cómo funciona la espermatogénesis y como un proceso *in vitro* podría ayudar a ratones con problemas de infertilidad que tengan baja proliferación y desarrollo de la

espermatogénesis que pueden tener. Por otro lado, la espermatogénesis *in vitro* en ovejas también ayuda en el proceso de fecundación *in vitro* o de inseminación artificial en bovinas, equinas, etc. Además, se sujeta a buscar soluciones viables para mantener especies en peligro de extinción, lo cual se fundamenta en la biología de la conservación.

Desde 1960 hasta la actualidad, se han realizado experimentos con tejido testicular cultivado con el fin de evaluar su desarrollo y supervivencia (Komeya y Ogawa ,2018). En consecuencia, ha habido ciertos factores a considerar como la temperatura, la edad del donante (puberales o adultos), presencia de sueros fetales, distribución del tejido, medio y métodos de cultivo con el fin de obtener efectos positivos en la diferenciación y proliferación de las células que dan pasó a los procesos de la espermatogénesis fuera del organismo (Komeya y Ogawa, 2018).

Actualmente, hay algunos métodos que se ha utilizado para el cultivo de tejido testicular. Los métodos convencionales de dos dimensiones eran característicos para el cultivo testicular, pero se vio que las señales intercelulares y la viabilidad eran muy bajas; concluyendo así que la proliferación de células germinales no era como se esperaba (Stukenborg, J. B., & Wistuba, J., 2015). Es por eso, que se comenzaron a realizar sistemas de cultivos tridimensionales con el objetivo de potenciar la actividad de las células germinales, de Sertoli, la matriz extracelular y una biocompatibilidad entre el sistema y el tejido testicular. En este momento hay dos sistemas tridimensionales que se trabajan en tejido testicular como son el agar blando (a baja concentración) y matriz de colágeno (Komeya y Ogawa, 2018). Estos dos sistemas tratan de mantener las características del tejido u órgano *in vivo*. Por lo que en el cultivo de agar blando existe la formación de diferentes tipos de células (en vías de diferenciación), mientras que el cultivo con la matriz de colágeno su objetivo principal es observar un solo tipo de células diferenciadas en específico (Lee., et al, 2013). Sin embargo,

cada uno de estos presenta una funcionalidad de proliferar y perdurar la espermatogénesis *in vitro* siendo un mecanismo a largo plazo (Curaba et al., 2011).

1.7 Hidrogeles

Los hidrogeles se definen como biomateriales que presentan una estructura tridimensional conformada por polímeros que se caracterizan por ser hidrófilos, elásticos, presentar resistencia mecánica, permeabilidad, porosidad, una consistencia suave y almacenar gran contenido de agua (Arredondo y Londoño, 2014). Los hidrogeles también son considerados como geles físicos o químicos ya que actúan las fuerzas iónicas, hidrofóbicas, enlaces covalentes y otras propiedades mecánicas que forman una especie de red en el biomaterial y conforme a las condiciones ambientales pueden sufrir cambios y adaptación al medio en el que se encuentre.

Tipos de hidrogeles

Existen diversos tipos de hidrogeles, algunos que pueden ser hechos de silicona o hechos a base de biopolímeros naturales ya sea almidón, pectina, quitosano, entre otros, aunque también se pueden realizar mediante otros polímeros que sean de interés, pero se necesita de una polimerización de los mismos y formación de enlaces cruzados entre las macromoléculas debido a que, una mezcla de ambos daría consistencia y la característica de interés deseada para el hidrogel (Caló y Khutoryanskiy, 2015).

Como se mencionó anteriormente, los biopolímeros se utilizan de manera prometedora en la fabricación de los biomateriales entre los principales se encuentra la pectina y el quitosano (Peelman & Devlieghere, 2013). El quitosano se caracteriza por ser un biopolímero derivado de la quitina, siendo esta el exoesqueleto principal de crustáceos como el cangrejo además de estar presentes en las paredes celulares de hongos (Peelman & Devlieghere, 2013). El quitosano, se obtiene mediante un proceso unitario denominado desacetilación, en este

caso la quitina. Además, el quitosano posee actividades antimicrobianas y antifúngicas para patógenos no deseados, así como algunas buenas propiedades mecánicas.

Por otro lado, la pectina es un heteropolisacárido y se encuentra en gran proporción en las paredes de las células vegetales, por lo que su extracción proviene de los desechos de frutas (Crispín, 2012). La pectina tiene como características principal formar geles en agua, utilizándolo en gran manera en industrias alimenticias y farmacéuticas (Chia, 2015). La pectina también tiene propiedades no tóxicas para el organismo y la inhabilidad de que esta pueda ser digerida en la parte superior del tracto intestinal, por lo que contribuye a que puedan desarrollar fármacos con pectina para liberar en zonas del colon y tratar enfermedades como la diverticulitis aguda (Crispín, 2012).

Aplicaciones en biología

Al ser el hidrogel un biomaterial este tiene grandes aplicaciones en campos relacionados con las ciencias de la salud como biología celular, biomedicina, biofarmacología, ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, técnicas de diagnóstico, entre otras (Sosa, 2010).

Al momento el uso de hidrogeles tiene un alcance limitado, pero su desarrollo en un futuro podrá promover aplicaciones a gran escala por lo que es cuestión de tiempo para puedan constituir nuevos materiales biocompatibles con los tejidos de seres vivos, biodegradables, amigables con el medio ambiente y así potenciar sus usos en futuras investigaciones, sobretodo en ámbitos de cultivo de tejidos (Caló y Khutoryanskiy, 2015). Los hidrogeles pueden conformar scaffolds en sistemas de cultivo celular y de tejidos *in vitro*, ya que este tipo de sistemas de tres dimensiones permiten un andamiaje al tejido promoviendo así la proliferación de las células madre y la interacción con otras células, por lo que mimetiza lo que ocurriría *in vivo*.

Por lo anteriormente expuesto, el presente proyecto de investigación busca utilizar herramientas biotecnológicas aplicadas a animales bovinos, particularmente la espermatogénesis *in vitro* por medio de la realización de un cultivo de tejido testicular *in vitro* en hidrogeles hechos de pectina y quitosano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Cultivar tejido testicular bovino *in vitro* en hidrogeles hechos de pectina y quitosano.

2.2 Objetivos específicos:

- Monitorear la espermatogénesis a partir de cortes de tejido testicular en un sistema de biomaterial de hidrogel a través de técnicas histológicas.
- Analizar la viabilidad de los espermatozoides durante el transcurso de cultivo.
- Evaluar la morfología del tejido testicular y del biomaterial a base de hidrogel en la espermatogénesis al final de los experimentos.

3. JUSTIFICACIÓN

En la actividad ganadera, generadora de productos cada vez más solicitados por los consumidores, se requiere salvaguardar el material genético valioso de la especie (bovina) y así aumentar la producción y generar ganancias económicas para el país. En consecuencia, el estudio en reproducción en animales bovinos permitirá comprender, obtener y evaluar su valor real y potencial en el Ecuador (FAO, 2017).

Por esta razón, el cultivo de tejido celular *in vitro* en hidrogeles podrá ayudar de manera significativa al estudio de la espermatogénesis incluyendo sus fases de diferenciación y

proliferación, siendo una alternativa para animales con problemas de fertilidad, baja calidad de semen, o para mejoramiento genético y que las características productivas puedan ser pasadas a siguientes generaciones y así conservar sus valores genéticos.

Finalmente, un proceso adecuado de espermatogénesis *in vitro* en tejido testicular permitirá la generación de espermatozoides viables disponibles para aplicaciones biotecnológicas en reproducción animal; de tal manera, que en futuro se puedan realizar diseños para tratar problemas de infertilidad en animales y en humanos que pueden ser originados en defectos de la espermatogénesis.

Por último, el desarrollo de aplicaciones reproductivas y la utilización de herramientas innovadoras biotecnológicas permitirán evaluar crecimientos comerciales en sectores ganaderos ecuatorianos con el fin de obtener ganancias económicas a gran escala, siendo de gran utilidad en el Ecuador. Los estudios reproductivos y el uso de técnicas con nuevos sistemas en tres dimensiones (hidrogeles) en base a la fisiología testicular de los bovinos podrán generar diversas aplicaciones en cuanto a la preservación de fertilidad, calidad del espermatozoides e infertilidad, con especial interés potencial para la agricultura, medicina veterinaria, biotecnología animal e incluso a los seres humanos.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Testículos de tres toros adultos fueron donados por parte del Camal Metropolitano del Sur de Quito. Los protocolos de análisis espermáticos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito, USFQ, COCIBA. Las técnicas histológicas (procesamiento de las muestras de tejido testicular) fueron llevadas a cabo en Agrocalidad (Tumbaco) en el área de Sanidad Animal y en Laboratorio de Biotecnología Animal de la USFQ, COCIBA. La elaboración de los biomateriales

(hidrogeles) se realizó en los laboratorios de Ingeniería Química, USFQ y los cultivos en el área de Virología del Instituto de Microbiología de la USFQ.

5. MATERIALES

5.1 Procesamiento del material

- 3 diferentes testículos de toros adultos
- Cooler
- 2 placas de 12 pocillos
- Bisturí
- Pinzas
- Pipetas
- Tubos Falcon de 15 mL
- Cámara de flujo laminar

5.2 Obtención del biomaterial (Hidrogel)

- Mortero
- 1 gramo de quitosano
- 1 gramo de pectina lavada
- Solución buffer de acetato
- Hidróxido de sodio
- Centrifuga
- Cámara a temperatura ambiente
- Congelador a -80°C
- 2 placas de 12 pocillos

5.3 Desinfección y Rehidratación del biomaterial (Hidrogel)

- Agua destilada
- Etanol 70%
- PBS
- Pipetas
- Medio Mínimo Esencial (Minimum Essential Medium, MEM) 1X:
 - 10% MEM 10X
 - 1.7% Bicarbonato de sodio
 - 2% L-glutamina
 - 1% Aminoácidos no esenciales
 - 1% Penicilina/Estreptomicina
 - 3% HEPES buffer
 - 0.4% Gentamicina (10 mg/mL)
- Suero Fetal Bovino
- Shaker
- Papel aluminio autoclavado

5.4 Cultivo de tejido testicular

- Pinzas autoclavadas
- Placas de 12 pocillos
- Tejido testicular de 0,25 cm³
- Medio Mínimo Esencial (Minimum Essential Medium, MEM) 1X
- Pipetas
- Fungizone (amfotericina B)
- Cámara de flujo laminar
- Incubador de CO₂

5.5 Evaluación de viabilidad de espermatozoides

- Cajas Petri
- Pinzas
- Pipetas
- Bisturí
- PBS
- Tubos Eppendorf
- Azul Tripán
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio óptico

5.6 Análisis Histológico

- Solución de Bouin (fijación):
 - 70% Ácido pícrico saturado
 - 25% Formaldehído
 - 5% Ácido acético glacial
- Tubos Falcon de 15 mL
- Congeladores

5.7 Inclusión en parafina

- Etanol 70%, 95% y 100%
- Xilol
- Xilol: Paraplast (1:1)
- Xilol:Paraplast (1:2)
- Parafina 100%
- Moldes para inclusión en parafina

5.8 Tinción

- Micrótopo
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pinzas
- Agua destilada
- Xilol
- Etanol 95% y 100%
- Agua destilada
- Hematoxilina
- Agua grifo
- Xileno
- 1 gota/ placa medio de montaje
- Microscopio óptico

5.9 Análisis de resultados

- Programa ImageJ
- Programa Estadístico SPSS v.17
- Microsoft Excel

6. MÉTODOS

6.1 Recolección y procesamiento de la muestra

Primeramente, se recolectó tres testículos de tres bovinos donados por el Camal Metropolitano de Quito. Luego se transportó los testículos en un cooler a 4° C hasta el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito donde fueron lavados con agua normal del grifo y se les retiró el escroto, la túnica vaginal parietal y

visceral y el epidídimo. Se tomó el peso de los testículos, se los identificó y se les asignó un número a cada testículo. Se realizó 3 cortes transversales de 6 cm de los 3 testículos de tres bovinos con pinzas y bisturí, previamente esterilizados (autoclave), para luego realizar 4 cortes más pequeños en total de aproximadamente $0,25 \text{ cm}^3$ y que en total sean 12 cortes de tejido, es decir 4 cortes de $0,25 \text{ cm}^3$ por los 3 bovinos y se utilizaron 3 tubos falcón (1 por cada animal) de 15 ml con 3 ml de Medio Mínimo Esencial (Minimum Essential Medium, MEM) a 5°C para guardar las muestras hasta el momento del cultivo. Muestras adicionales fueron colocadas en fijador de Bouin por 48 horas y colocadas en etanol 70% hasta el momento del procesamiento histológico.

6.2 Obtención del biomaterial (hidrogel)

Para la obtención del biomaterial, primeramente, se obtuvieron 1 gramo de quitosano y 1 gramo de pectina provenientes del departamento de Ingeniería Química de la Universidad San Francisco de Quito. A esta cantidad se le puso en un mortero de porcelanato de 90 mm de diámetro y manualmente se refregó sobre el mortero durante 20 minutos. Una vez que el proceso terminó se recolectó el polvo y se agregó un buffer de solución acetato de 0.1M y se ajustó el pH a 2; además, se mezcló 0.1 gramos en 10 mL de esta solución buffer para que fueran disueltos y se lo guardó en una cámara agitadora en temperatura ambiente hasta que exista una homogenización. Después el pH de esta solución se ajustó a 7 utilizando NaOH (0.5M) formándose el hidrogel, el cual se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm para separar el hidrogel de la fase líquida. Finalmente, se congeló los hidrogeles a -80°C y luego se los liofilizó (deshidratación) en 2 cajas de 12 pocillos.

6.3 Desinfección y rehidratación del biomaterial (hidrogel)

Una vez que los hidrogeles fueron liofilizados en 2 cajas de 12 pocillos se desinfectó y se rehidrató mediante un lavado de agua destilada durante 2 minutos por 3 veces y luego por etanol al 70 % durante 30 minutos y el líquido se lo descartó. También se lavó con agua

estéril una vez durante 15 minutos. Después se utilizó PBS dos veces durante 15 minutos, para ello se utilizó un shaker, por último, se descartó el líquido y se agregó MEM (Minimum Essential Medium), y se dejó reposar durante toda la noche en el área de cultivo celular del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito en un incubador de CO₂. Cabe mencionar, que los hidrogeles fueron transferidos a 2 cajas con 12 pocillos nuevas, con los hidrogeles esterilizados durante su desinfección y rehidratación.

6.4 Cultivo de tejido testicular

Para el cultivo testicular, primeramente, se extrajo las cajas con los hidrogeles del incubador del CO₂ a 37 °C hacia una cámara de flujo laminar en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, antes de comenzar los cultivos se realizó una limpieza con alcohol 100% del área de trabajo dentro de la cámara de flujo laminar, también se introdujo pinzas autoclavadas, 3 tubos falcon de 15 ml con los cortes del tejido testicular, medio MEM y Fungizone, todo esto previamente rociado con alcohol. Después, se colocó los pedazos del tejido testicular sobre los hidrogeles mediante pinzas estériles en cada uno de los pocillos identificándolos en cuanto al animal (1, 2,3) y a los días a ser analizados (3, 6, 10,14) y se agregó alrededor de 1500 µL de MEM para mantener el tejido hidratado conteniendo 1µL/mL de Fungizone para evitar contaminación por hongos en cada pocillo y se lo incubo en la cámara de CO₂ a 37 °C. Finalmente, cada 3-4 días se cambió el medio MEM de cada pocillo y se tomó muestras de cada animal (1, 2,3) con su respectivo tejido-hidrogel desde el día 3 hasta el día 14 en nuevos tubos falcón de 15 ml (1 para cada animal y para cada día) para sus posteriores análisis como viabilidad y análisis histológico.

6.5 Evaluación de viabilidad de espermatozoides.

Para la evaluación de viabilidad de espermatozoides, primeramente, se utilizó los tubos falcón identificados con la información de los animales y días respectivos, pinzas para extraer el material tejido-hidrogel y se colocó en cajas Petri, luego se empleó un bisturí para

cortar la mitad del conjunto tejido-hidrogeles. La primera mitad se utilizó para el análisis de viabilidad y la otra mitad en tubos falcón para una fijación en Bouin y para-formaldehído 4% y se guardó en refrigeración. Para el análisis de viabilidad en el día 0 solo se utilizó el tejido y no el sistema tejido-hidrogeles para observar la viabilidad sin el sistema. Después solo se empleó el tejido testicular y se utilizó 1 gota de PBS en el tejido y mediante pinzas se realizó un maceración hasta obtener un líquido blanco –amarillento; también, en tubos Eppendorf se agregó 15 µL de azul tripán, y se mezcló con el líquido blanco –amarillo. Una vez mezclado se puso 15 uL de la mezcla en un portaobjetos con su respectivo cubreobjetos. Finalmente, se observó mediante microscopía óptica en 10X (magnificación total 100X) en cada frotis alrededor de 125 espermatozoides, se contabilizó y se anotó en Excel para sacar un porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Los espermatozoides muertos fueron los observados de color azul.

6.6 Análisis histológico e inclusión en parafina prueba bouin

Una vez que se agregó los cortes de tejido testicular en los tubos falcón con solución Bouin y para-formaldehído 4% se dejó 48 horas, se cambió el fijador por etanol 70%. y se dejó por 2 semanas en refrigeración para luego ser incluidos en parafina. Para su inclusión en parafina se utilizó PBS para remover el fijador, adicionalmente, se lavaron las muestras con etanol 70 % (2 veces), la primera se lavó por 1 hora y la segunda se lavó por 15 minutos con el fin de seguir removiendo la solución de Bouin. Después se siguió una serie de protocolos de deshidratación en la cual se utilizó etanol al 95% por 40 minutos (1 vez), etanol al 100 % por 20 minutos (3 veces). Una vez lavado con etanol se procedió a 3 lavados con xilol: por 10 minutos (1 vez) y 2 veces más por 5 minutos, luego se utilizó xilol:paraplast (1:1) por 45 minutos, xilol:paraplast (1:2) por 45 minutos. Por último, se incluyó parafina al 100 % en moldes y se fijaron en casetes histológicos previamente identificados y se mantuvieron en un congelador.

6.7 Tinción hematoxilina

Una vez armados los casetes histológicos, se pasó al uso de micrótopo, para lo cual se utilizó esta herramienta en las instalaciones de Agrocalidad en el área de Sanidad Animal en Tumbaco, con el fin de realizar cortes de 5µm en los casetes histológicos que tenía tanto el tejido testicular como el hidrogel. Para ello se los cortes obtenidos del micrótopo se colocaron en láminas portaobjetos en un baño de maría a 41 °C. Las láminas fueron guardadas en cajas con su identificación respectiva. Al día siguiente, se realizó la tinción de hematoxilina en que se utilizó el tejido en portaobjetos y se lo lavo con xilol por 3 minutos (3 veces) y se rehidrató con etanol 100% y 95 % ambos por un minuto y agua destilada 3 minutos (2 veces) y mediante un gotero se puso la hematoxilina y se dejó 15 segundos para luego retirar el excedente mediante un lavado de agua destilada y un delgado chorro de agua de grifo por 10 minutos. Luego, se volvió a deshidratar con etanol al 100% y 95% 1 minuto (2 veces) para luego utilizar xileno 1 minuto (3 veces). Una vez, lavado se utilizó 1 gota de medio de montaje en el portaobjetos con su respectivo cubreobjetos, se dejó secar y se observó con microscopia óptica (Figura 1).

6.8 Análisis de resultados

Una vez finalizado con la parte experimental se realizó el análisis de resultados. Para ello se observó con el microscopio óptico los túbulos seminíferos de cada animal y día con su respectivo hidrogel en 10 x y 40 x; también, se tomaron fotos de los túbulos y del hidrogel, se observó las células presentes, la contextura de los túbulos. Se empleó el programa ImageJ para realizar mediciones morfológicas y previa calibración del software con una gráticula graduada, se midió el eje mayor y menor secciones transversales de los túbulos y se sacó un promedio para obtener su diámetro, así como el área del hidrogel por cada muestra. Una vez finalizado, se procedió a ordenar los datos y se utilizó el programa estadístico SPSS con la opción One-Way ANOVA para obtener diferencias significativas entre los tratamientos,

además se utilizó Microsoft Excel con el fin analizar los resultados mediante gráficos y así obtener conclusiones.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis seminal de los cortes del tejido testicular

A partir de las muestras se buscó determinar si existen diferencias significativas mediante One- Way ANOVA, en cuanto a los porcentajes de viabilidad espermática en diferentes días.

7.1.1 Viabilidad de los espermatozoides

Las muestras de tejido testicular de los 3 bovinos diferentes nos demuestran que no hubo cambios significativos en la viabilidad conforme el paso de los días (3, 6, 10,14) como se observa en la Figura 2, siendo el día 6 con mayor porcentaje de espermatozoides vivos, aproximadamente, del 58% y el día 14 con un menor porcentaje viabilidad de espermatozoides vivos del 50 % con un promedio general del 55%. Además, en la Tabla 1 se observa un valor ($p > 0.05$) lo cual nos indica que no hay diferencias significativas y la viabilidad del tejido testicular entre los tres animales bovinos se mantiene, sin embargo, el coeficiente de variación muestra un porcentaje del 12 % siendo este mayor del 10% de variación considerado en pruebas biológicas. También se puede observar en la Figura 3 con flecha roja los espermatozoides vivos y flecha azul para los espermatozoides muertos través del microscopio óptico.

7.2 Análisis de los túbulos seminíferos

Se estudiaron las diferencias estadísticas entre los promedios de cada muestra de tejido testicular en relación al diámetro y área de los túbulos seminíferos al comparar su crecimiento

tubular en un sistema de tres dimensiones (tejido-hidroge). Mediante Image J y One-Way ANOVA se determinó que no hay diferencias significativas en los túbulos seminíferos en un sistema de tres dimensiones conforme el paso de los días.

7.2.1 Diámetro de los túbulos seminíferos

Se observó que no existen diferencias significativas en un sistema tridimensional, ya que el diámetro de los túbulos seminíferos permaneció estadísticamente constante ($p > 0.05$) al paso de los días como se observa en la Tabla 2, además de un promedio de 140 μm por cada túbulo en cada muestra de tejido testicular en un sistema de 3 dimensiones. Adicionalmente, podemos observar en la Figura 4 la variación del diámetro de los túbulos durante el periodo experimental, siendo el día 10 con menor diámetro a comparación de los otros días; sin embargo, este no muestra una diferencia estadísticamente significativa.

7.2.2 Área de los túbulos seminíferos

En la Tabla 3 se observa que no existe diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las áreas y durante los días de experimentación en un sistema tridimensional, ya que el área es estadísticamente igual a pesar de que, en el día 10 hay una disminución en el área (NS) como se observa en la Figura 5. El promedio general del área de los túbulos en un cultivo de sistema tridimensional es de 16560 μm^2 .

7.3 Análisis de las muestras del biomaterial (hidroge).

En las muestras con hidroge, siendo parte de una biocompatibilidad tejido – hidroge, se buscó determinar diferencias significativas, es decir crecimiento o adaptación del hidroge con el tejido testicular con el paso de los días.

7.3.1 Ancho de las fibras del Hidrogel

Se observa que no hay una diferencia significativa. Aunque existe un ligero aumento en el ancho de las fibras del hidrogel por cada día, como indica la Tabla 4, también muestra un valor (NS, $p > 0.05$) de tal manera que el ancho del hidrogel, estadísticamente, es igual en todas las muestras y constante durante el periodo experimental, por lo que no hubo variación de tamaño en el sistema tridimensional. El promedio general del ancho de una fibra de hidrogel en el sistema tridimensional fue de $100 \mu\text{m}$ en el transcurso de 14 días.

7.3.2 Área del poro del hidrogel

La Tabla 5 muestra valores de aumento micrométricos por cada día en los poros o cavidades del hidrogel, con un valor promedio $73455 \mu\text{m}^2$ en los 14 días. No obstante, no hay aumentos ni reducciones significativas teniendo en cuenta un valor de $p > 0.05$. Cabe mencionar, que el área de los poros del hidrogel es mucho mayor que el área de un túbulo seminífero.

7.4 Estimación de la relación espacial túbulos seminíferos –hidrogel

Tras los resultados obtenidos en cuanto al análisis tubular e hidrogeles, y su compatibilidad espacial en un sistema tridimensional de cultivo testicular, podemos establecer que cada área de poro promedio del hidrogel ($73455 \mu\text{m}^2$), tomando en cuenta que cada área promedio de sección transversal de los túbulos seminíferos ($16560 \mu\text{m}^2$) puede alojar alrededor de 4,43 túbulos seminíferos tal y como indica la Tabla 6 por lo que su compatibilidad como un scaffold o andamiaje es prominente y factible.

8. DISCUSIÓN

Según la FAO existe programas de conservación para mantener poblaciones *ex situ*, por lo que técnicas innovadoras son necesarias (FAO, 2017). Así mismo, esta herramienta permitirá obtener altos valores económicos realmente importantes para la industria ganadera. El cultivo de explantes de tejido testicular bovino *in vitro* mediante el uso de hidrogeles de pectina y quitosano es una técnica nueva con el fin de poder establecer nuevos protocolos para los procesos de proliferación y diferenciación en la espermatogénesis, permitiendo así que el éxito de esta técnica sea útil para animales infértiles y también permita mantener la variabilidad genética mediante la preservación de germoplasma en un futuro sobre todo en aquellos animales que se encuentren en peligro de extinción (Roldán, 2010). En consecuencia, el estudio en reproducción en animales bovinos permitirá comprender, obtener y evaluar su valor real y potencial en el Ecuador. Tras los resultados obtenidos podemos establecer algunos parámetros que influyeron, directamente, con este sistema tridimensional de cultivo *in vitro*.

La viabilidad espermática es uno de los parámetros que se toman en cuenta para la calidad seminal a través de la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide. Del mismo modo, este parámetro basado en la integridad funcional de la membrana de un espermatozoide es importante para una correcta evaluación de fertilidad en los bovinos (Muiño Otero, 2008). En el presente trabajo de investigación, la viabilidad se hizo mediante una técnica de tinción con azul tripán que se caracteriza por teñir a las células muertas siendo este colorante impermeable para las células vivas por lo cual estas no se tiñen (Filipiak, 2012). Los resultados de viabilidad espermática en el sistema tridimensional (hidrogel) utilizado comprende un rango de 50 - 58% (NS, $p > 0.05$) de espermatozoides vivos durante los 14 días de experimentación, lo cual indica que la variabilidad es bastante óptima, además de ser

mayor que otros cultivos como celular o cultivo sin el uso de sistema de soporte que oscilan entre 40-50% de espermatozoides vivos en el mismo tiempo de experimentación. (Januskauskas & Rodriguez, 2003). El uso de un sistema tridimensional o una adherencia por parte del tejido testicular al hidrogel , permite que el tejido no pierda el valor tridimensional de sus túbulos y mantenga el desarrollo de espermatozoides vivos; a diferencia de un cultivo de células o cultivos sin un sistema de soporte que pierde su valor tridimensional de los túbulos afectando directamente al desarrollo de la espermatogénesis provocando un fenómeno denominado necrozoospermia, complicando la detección de los espermatozoides en el epitelio seminífero (Yeung & Ming, 2015). Adicionalmente, el factor correlativo que contribuye a un porcentaje de viabilidad espermática promedio obtenido (aprox. 55%) puede deberse a factores como: el medio de cultivo, el tejido y el andamiaje; es decir que, su biocompatibilidad. La presencia de un hidrogel a base de pectina y quitosano no interviene en una muerte celular, sino más bien genera estabilidad, tal como ha sido sugerido previamente (Lee et al, 2014). A su vez, se puede comparar con un proceso posterior al del cultivo *in vitro* que es la criopreservación. Esta técnica se caracteriza por preservar el germoplasma de cualquier animal y así contribuye a mantener su variabilidad genética (Talukdar, 2016). Sin embargo, en esta técnica la variación de la viabilidad espermática se ve afectada notoriamente. Investigaciones realizadas indican que en esta técnica la viabilidad espermática oscila en un rango de 45-50% (Talukdar, 2016). En consecuencia, si en el cultivo testicular *in vitro* en hidrogeles hay una superveniencia del 55% y se emplea después la criopreservación esta viabilidad de espermatozoides vivos se verá aún más afectada. Esto puede deberse a factores asociados a la susceptibilidad de la membrana plasmática, la membrana externa acrosomal y la membrana mitocondrial del espermatozoide debido a las bajas temperaturas que se emplean; además, de ser más susceptibles a shock térmicos, estrés osmótico lo cual alteraría la membrana si no se emplea un control y un agente crioprotector adecuado.

Para que este proceso sea de lo más eficiente sería necesario utilizar el sistema de cultivo *in vitro* en base a hidrogeles de pectina y quitosano, optimizar su multiplicación celular para preservar las células, es decir que se produzca más espermatozoides *in vitro*, y así poder aplicar métodos posteriores como criopreservación de mejor manera para conservar el germoplasma y que la viabilidad no se vea afectada de manera considerable. Cabe indicar, que se necesitan más pruebas de funcionalidad espermática puesto que, la membrana espermática participa activamente en el transporte de moléculas para que los espermatozoides se adapten al medio en el que se encuentran (Baumchen, 2009).

En cuanto al análisis de los túbulos seminíferos, se pudo observar que no hubo un cambio sustancial en los diámetros de los túbulos, con un promedio de 142 μm de diámetro. Este valor se encuentra por debajo de los rangos normales de los túbulos seminíferos en bovinos ya que, el rango normal se encuentra entre 200 μm – 250 μm en bovinos adultos, por lo que los valores obtenidos corresponden por ejemplo a la etapa puberal y no existió información de la edad exacta de los animales de los que se obtuvo el material biológico en el camal. En la literatura se reporta el diámetro de los túbulos seminíferos en bovinos a las 28 semanas (7 meses) de aproximadamente 150 μm (Fosslund, 1961), por tanto, los valores promedio de los diámetros tubulares que se realizaron indican que, probablemente, son animales cerca de los 7 meses y que aún no habían alcanzado el tamaño adulto. Cabe mencionar, que no solo la edad podría estar ligada a estos valores de los diámetros tubulares, ya que la alimentación también influye a que los animales obtengan un buen desarrollo en sus órganos testiculares en su diámetro y área tubular promoviendo el desarrollo de procesos hormonales y de espermatogénesis. Cabe recalcar que se desconoce esta información en las muestras provenientes del camal. Adicionalmente, el análisis del área de sección transversal de los túbulos seminíferos mantiene un promedio de 16560 μm^2 lo cual nos indica que el área de los túbulos es suficiente grande para que en los túbulos pueda existir numerosas células

somáticos (Sertoli) que permiten proporcionar un soporte nutricional a células germinales y crear un microambiente ideal para que estas den lugar a los espermatogénesis y que por lo tanto puedan avanzar a etapas de proliferación y diferenciación como espermatocitos en fase de paquiteno, espermatidas redondas, espermatidas elongadas y espermatozoides (Parks & Huang, 2011).

Por otra parte, tenemos el resultado el ancho de las fibras y el área de los poros o cavidades del hidrogel mediante el programa ImageJ. Se pudo observar que el promedio del ancho de las fibras de este hidrogel es de 100 μm y un promedio general del área porosa es de 73455 μm^2 . No obstante, para estos dos parámetros existe variabilidad en el ancho y el área sobre todo en el día 10, esto puede deberse a varios factores: primero el hidrogel tiene una forma irregular, por lo que valores exactos no se podrían obtener, a su vez, la capacidad de absorción del hidrogel (Nam & Park, 2014). Una de las características fundamentales de un hidrogel es su absorción en agua u otros medios líquidos (Baumchen, 2009). El uso del medio MEM que se cambió cada tres días durante un lapso de 14 días pudo influir en la absorción del medio por parte del hidrogel, por lo que al cambiar el medio en donde se encontraba el hidrogel y el tejido testicular este puede absorber mayor cantidad de medio en el sistema generando cambios en su estructura (Chia, 2015). Al ser geles con propiedades hidrofílicas (afinidad con el agua) estos tienden a hincharse, permitiendo así que el ancho de las fibras se expanda o disminuya al igual que el área del poro del hidrogel. Es probable, que a medida que se hizo los pasos del secado y la rehidratación de este, el tamaño de los poros cambiara, existiendo variabilidad en los poros. Aun así, estos poros grandes y pequeños deberían permitir la carga y liberación de nutrientes necesarios hacia el tejido testicular (Canto, 2015). La hinchazón rápida, el ancho de las fibras y el tamaño de poro del hidrogel sugiere que este sistema sea apropiado para tejidos testiculares (Canto, 2015). Aunque, los resultados obtenidos nos indiquen que no existen cambios significativos en el diámetro y área de los

túbulos seminíferos, así como el ancho de las fibras y el área de los poros del hidrogel a lo largo del tiempo, es importante mencionar su relación espacial túbulos-hidrogel. Como se ha mostrado en los resultados el área promedio de un poro del hidrogel es aproximadamente 4 veces más grande que el área de una sección transversal tubular; de manera que podrían abarcar alrededor de 4,43 túbulos, lo suficientemente para que pueda existir una proliferación y diferenciación celular espermática (Potter S, 2017) y pueda desarrollarse un organoide testicular en futuras investigaciones. Esta relación espacial, influye directamente con una correcta proliferación y diferenciación celular, ya que el tamaño de los poros al ser más grandes que los túbulos permitirá la difusión de nutrientes y el oxígeno necesario para la supervivencia de las células (Nakat & Iseki, 2017). Del mismo modo, debe existir una relación adecuada de células germinales con células somáticas presentes en los túbulos, que con la ayuda de un sistema tridimensional favorezca la proliferación, por medio de regulaciones endocrinas, interacciones células-hidrogel, interacciones células-células e interacciones células-matriz extracelular (Rosso & Giordano, 2018). En el presente trabajo, numerosas células espermáticas sobrevivieron en el sistema por dos semanas, lo cual indica la baja toxicidad del biomaterial utilizado. Finalmente, estudios anteriores muestran que, un biomaterial con biodegradabilidad ayudaría al tejido a generar su propia matriz extracelular y así aumentaría la capacidad regenerativa de la células o del tejido (Zhao & Jin, 2013). Cabe mencionar , que la biocompatibilidad del hidrogel de quitosano y pectina proporcionan un entorno amigable con el tejido, estas permiten que las células puedan adherirse y comunicarse fácilmente con los componentes físicos y químicos que lo rodean, a causa de sus propiedades antimicrobianas y no citotóxicas estas ayudan al tejido testicular a inhibir respuestas de muerte celular , infecciones por bacterias y respuestas inflamatorias; de modo que , este sistema tridimensional tiene propiedades sumamente viables para cualquier tejido que se requiera utilizar (Cukierman & Yamada, 2016).

Teniendo en cuenta estos fundamentos del cultivo de tejido *in vitro* y las propiedades de este biomaterial se podría en futuras investigaciones tratar ciertas condiciones patológicas comunes como la hipoplasia testicular (testículos pequeños), criptorquidia testicular (descenso de los testículos en el escroto) o macroorquidismo bovino (desarrollo excesivo de los testículos) (Romero, 2015) ; en consecuencia a estas patologías, el desarrollo de la espermatogénesis no se daría ya que, las interacciones y una correcta proliferación y diferenciación requiere de un correcto órgano funcional , por lo que testículos más pequeños o más grandes se relaciona con la infertilidad del animal. Es por eso, que el uso de técnicas *in vitro* protocolares con andamiajes como hidrogeles no solo puedan promover la espermatogénesis *in vitro*, sino que también las células del tejido testicular puedan formar un órgano funcional, teniendo como fundamento un hidrogel con una estructura similar a la de un testículo (Tesarik, 2014).

Por último, aunque el procedimiento para completar la espermatogénesis, incluida su maduración, aún está por verse, esta investigación parecería ofrecer un potencial bastante competente para el tratamiento de infertilidad. Posteriores estudios en cultivo de explantes testiculares con un sistema tridimensional podrían lograr aumentar efectivamente el desarrollo de células germinales *in vitro* (Champy, 2012); sin embargo, hay que tomar en cuenta el contexto biológico en humanos y en bovinos , debido a que la espermatogénesis humana y la espermatogénesis bovina podrían ser bastante diferentes (Yeung & Ming, 2015) , lo cual implica que todavía existe varias investigaciones por hacer antes de aplicar protocolos o técnicas biotecnológicas en tejidos testiculares humanos y así obtener una mayor reproducibilidad en las investigaciones posteriores.

9. CONCLUSIONES

El cultivo *in vitro* de explantes testiculares con hidrogeles en base a pectina y quitosano es una técnica nueva en la que se permite monitorear la espermatogénesis mediante técnicas histológicas, promoviendo una alternativa para la preservación de germoplasma en bovinos y que podría utilizarse en la reproducción de los animales en peligro de extinción; sin embargo, se mantiene en desarrollo. Adicionalmente, esta técnica mantiene las células germinales y en particular las espermáticas en el tejido.

En base a los parámetros analizados se puede observar que la viabilidad espermática se mantuvo con un mayor porcentaje de espermatozoides vivos (aproximadamente 55%) que espermatozoides muertos durante los 14 días de experimentos por lo que es comparable con otros estudios ya realizados. El diámetro de los túbulos seminíferos se encuentra reducido en comparación con animales adultos, debido a la edad o su alimentación. Un adecuado cultivo *in vitro* mediante el uso de andamiajes permitirá desarrollar soluciones viables en la espermatogénesis sobre todo en ámbitos de infertilidad.

El hidrogel contribuye a un microambiente acuoso similar a una matriz extracelular, lo que puede facilitar la actividad celular, además que los hidrogeles en base a pectina y quitosano no son citotóxicos por lo cual existe un alto índice de supervivencia celular. La pectina y el quitosano, debido a su naturaleza antibacteriana y antiinflamatoria hacen que los hidrogeles sean productos altamente promisorios en aplicaciones biotecnológicas. El uso de hidrogeles biodegradables y biocompatibles es imprescindible para que el tejido pueda adaptarse a su propia matriz celular.

10. RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar más experimentos en cuanto a otros parámetros espermáticos como integridad del acrosoma, integridad del ADN y pH que se analicen en conjunto para tener buenos indicadores de calidad seminal.
- En pruebas de espermatogénesis *in vitro* es necesario trabajar con tejido del epidídimo, ya que es donde ocurre la maduración espermática, por lo que evaluar su tejido en un sistema tridimensional podría ayudar a entender de mejor manera la funcionalidad de espermatogénesis *in vitro*.
- Es recomendable usar colágeno y ácido hialurónico en un sistema de cultivo a base de hidrogel, ya que estos componentes se encuentran presentes en abundancia en las matrices extracelulares a nivel testicular.
- Es importante usar hidrogeles biomiméticos con el fin que permitan la rápida formación, conexión e interacción entre las células del tejido, para imitar la funcionalidad del órgano.
- El uso de microscopio electrónico de barrido o microscopio con focal ayudaría a comprender y a observar las muestras tejido- hidrogel (área-poro, ancho fibras) de mejor manera.
- La inmunotinción en proteínas en las células madre y espermáticas en las diferentes fases de la espermatogénesis podría servir como un mejor indicador visual.

- El uso de vitamina A ha sido prometedor para la diferenciación en la espermatogénesis, por lo que sería un componente útil en un sistema tridimensional.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aponte, P. M., Schlatt, S., & Franca, L. R. D. (2013). Biotechnological approaches to the treatment of aspermatogenic men. *Clinics*, *68*, 157-167.
- Arredondo, A., & Londoño-López, M. E. (2014). Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos.
- Baumchen, F. (2009). The impact of defined polyglycolide scaffold structure on the proliferation of gingival fibroblasts in vitro: a pilot study. *108*: 505–513.
- Canto, L. (2015). *Hidrogeles biodegradables para la regeneración de cartílago articular* (Doctoral dissertation).
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, *65*, 252-267.
- Comizzoli, P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian Journal of Andrology*, *17*(4), 640. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153849>
- 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>
- Cukierman, E., Yamada, K.M. (2016). Taking cell-matrix adhesion to the third dimension. *Science*, **294**(5547), pp 1708-1712.
- Champy, C. (2012). Culture tissue. Testis. *Arch Zool Exptl Gen.* *60*:461-500.
- Chia, H., & Wu, B. (2015). Recent advances in 3D printing of biomaterials. *Journal of biological engineering*, *9*(1), 4.
- Crispín, P. (2012). Pectina: Usos Farmacéuticos y Aplicaciones Terapéuticas. In *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 78, No. 1).
- Davis JM. (2012). Basic Cell Culture. Second Edition. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Fossland, G., & Schultze, B. (1961). A histological study of the postnatal development of the bovine testis.
- Filipiak, Y., & Larocca, C. (2012). Utilización del azul tripán para diferenciar ovocitos bovinos vivos y muertos en fertilización in vitro. *Archivos de zootecnia*, *61*(234), 309-312.
- Freshney RI. (2000). Culture of animal Cells: A manual of basic technique. 4th Edition. John Wiley & Sons.

- Januskauskas, A., Rodriguez, M. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, 60(4), 743-758.
- Komeya, M., Sato, T., & Ogawa, T. (2018). In vitro spermatogenesis: A century-long research journey, still half way around. *Reproductive medicine and biology*, 17(4), 407-420.
- Masters, J. R. (2013). *Animal cell culture: a practical approach* (No. Sirsi) i9780199637966).
- Muñoz Otero, R. (2008). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. Universidad Santiago de Compostela.
- Nakat, H., Sonomura, T., Iseki, S. (2017). *Reproduction*. Three-dimensional analysis of seminiferous tubules and spermatogenic waves in mice. 154:569-579.
- Nam, YS., Park, TG. (2014). A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffold using gas foaming salt as a porogen additive. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 53: 1-7.
- Lee, J. H., Kim, H. J., Kim, H., Lee, S. J., & Gye, M. C. (2013). In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix. *Biomaterials*, 27(14), 2845-2853.
- Lee, J. H., Oh, J. H., Lee, J. H., Kim, M. R., & Min, C. K. (2014). Evaluation of in vitro spermatogenesis using poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) -based macroporous biodegradable scaffolds. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(2), 130-137.
- Parks, JE., Huang, S. (2011). Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology* 59: 73-86.
- Peelman, N., Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 128-141.
- Potter S, DeFalco T. (2017). *Reproduction*. Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. 153:151-162.
- Romero, S. (2015). Diagnóstico, evolución y manejo de la degeneración testicular en el semental bovino. Reporte de caso.
- Roldán, E., & Garde, J. (2010). 14. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. 120:4-50.
- Rosso, F., Giordano, A. (2018). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199: 174-180.
- Sosa, D., & Carrizales, L. (2010). Irritación Dérmica De Membranas De Hidrogel En Conejos. *Revista de Salud Animal*, 32(1), 32-36.

- Srivastava, N., & Pande, M. (2017). *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. Springer.
- Stukenborg, J. B., & Wistuba, J. (2015). New horizons for in vitro spermatogenesis? An update on novel three-dimensional culture systems as tools for meiotic and post-meiotic differentiation of testicular germ cells. *Molecular human reproduction*, *15*(9), 521-529.
- Talukdar, D., & Das, G. (2016). Cryo-capacitation changes during cryopreservation of swamp buffalo spermatozoa. *Indian Journal of Animal Sciences*, *86*(4), 397-400.
- Tesarik, J. (2014). Restoration of fertility by in vitro spermatogenesis. *Lancet* *353*: 555–556.
- Trowell, A. (2016). The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp Cell Res*.*16*:118-147.
- Yeung, T., Ming, W. (2015). Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*, **60**(1), pp. 24-34.
- Zirkin, B., & Papadopoulos, V. (2018). Testis: formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>
- Zhao, W., Jin, X. (2013). Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **88**(3), pp. 327-339

12. ANEXO A: TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de la viabilidad espermática, coeficiente de variación, SEM y Valor p de las respectivas muestras de tejido testicular en los diferentes días.

Días	Viabilidad (%)	Coeficiente de variación (%)	SEM	Valor p
Día 0	59	13	9	0,82
Día 3	57	14	10	
Día 6	58	8	3	
Día 10	53	14	4	
Día 14	50	10	3	
Promedio General	55	12		

Tabla 2. Diámetro de secciones transversales de los túbulos seminíferos, SEM (error estándar de la media) y Valor p de las muestras de tejido testicular (túbulos seminíferos) en los diferentes días.

Días	Diámetro (μm)	SEM	Valor p
Día 0	144	12	0,33
Día 3	148	14	
Día 6	145	9	
Día 10	133	8	
Día 14	143	5	
Prom general	142		

Tabla 3. Área de secciones transversales de los túbulos seminíferos, SEM (error estándar de la media) y valor p de las muestras de tejido testicular (túbulos seminíferos) en los diferentes días.

Días	Área Túbulos (µm²)	SEM	Valor p
Día 0	17655	2998	0,43
Día 3	17966	3233	
Día 6	17860	3145	
Día 10	14074	2074	
Día 14	16339	1004	
Prom general	16560		

Tabla 4. Ancho de las fibras, SEM (error estándar de la media) y valor p de las muestras del biomaterial (hidrogel) en los diferentes días.

Días	Ancho hidrogel (µm)	SEM	Valor p (general)
Día 3	99	9	0,73
Día 6	98	18	
Día 10	96	18	
Día 14	107	7	
Promedio general	100		

Tabla 5. Área, SEM (error estándar de la media) y Valor p de las muestras de los poros o cavidades del biomaterial (hidrogel) en los diferentes días.

Días	Área hidrogel (μm^2)	SEM	Valor p (general)
Días 3	42976	2857	0,65
Días 6	76888	47316	
Días 10	91130	19112	
Días 14	82825	12967	
Promedio general	73455		

Tabla 6. Estimación relación área poros hidrogel-área sección transversal túbulos seminíferos

	Área Hidrogel	Área túbulos	Área hidrogel- túbulos
Promedio general	73455	16560	4,43

13. ANEXO B: FIGURAS

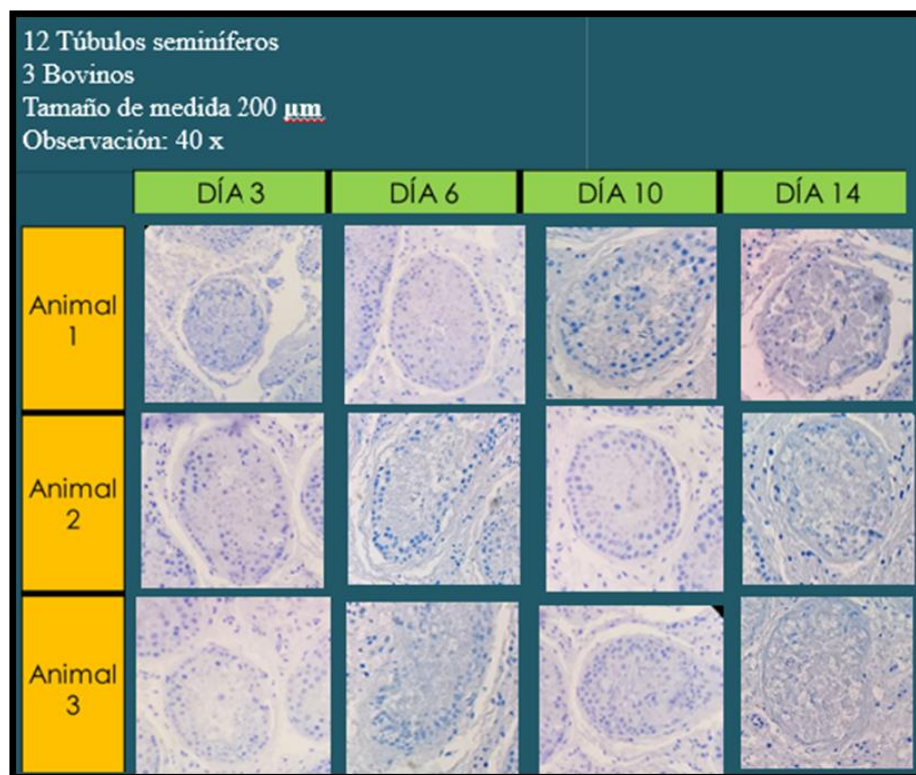


Figura 1. Observación microscópica 40 x de los túbulos seminíferos en un sistema tridimensional en los 14 días de experimentación.

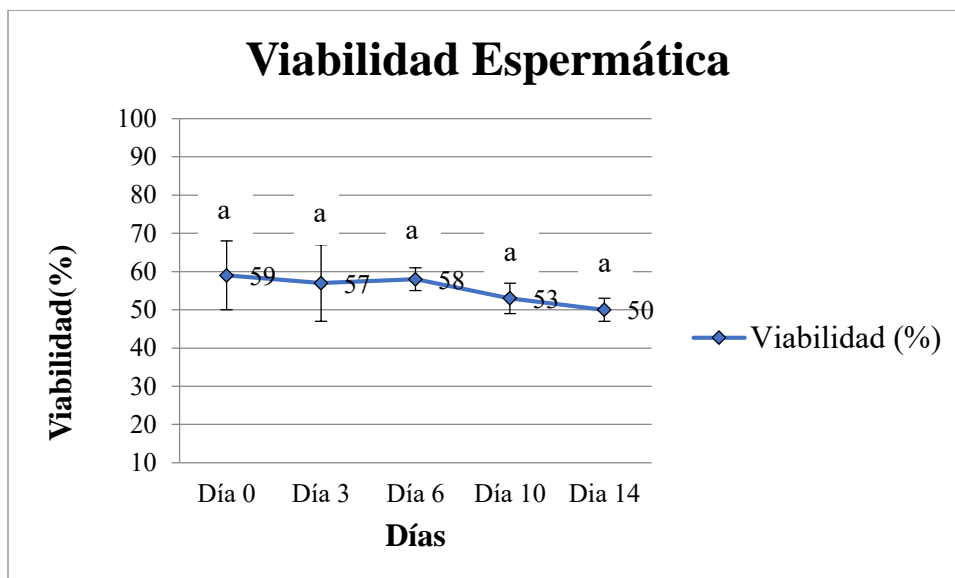


Figura 2. Comparación de viabilidad espermática obtenidos de muestras de tejido testicular *in vitro* por cada día. Las barras indican el SEM (error estándar de la media). Letras diferentes significa medias estadísticamente diferentes.

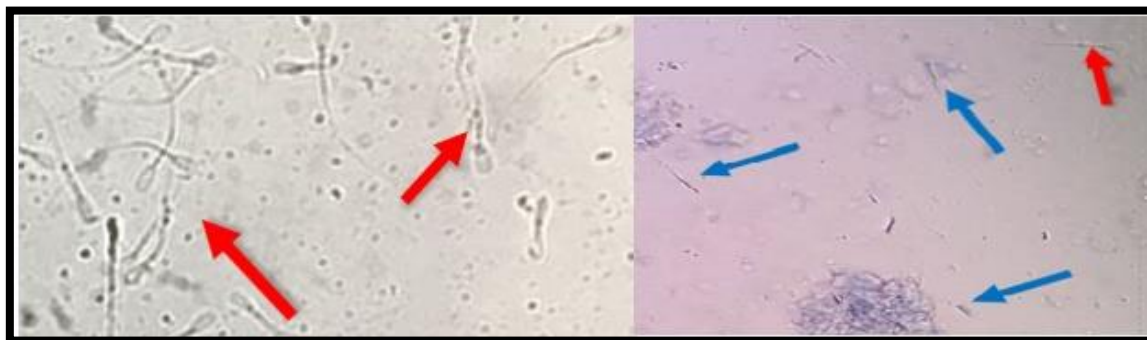


Figura 3. Viabilidad espermática. La flecha roja indica espermatozoides vivos y la flecha azul indica espermatozoides muertos

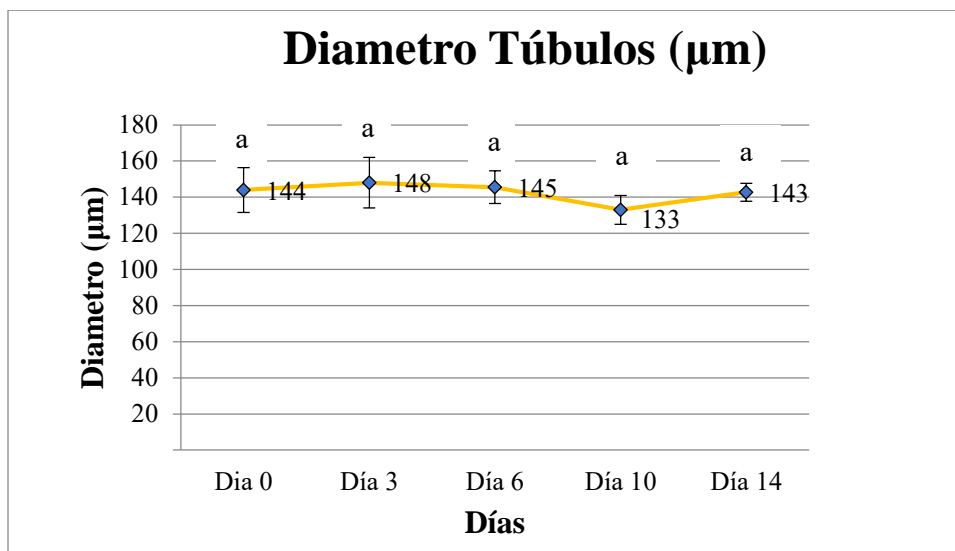


Figura 4. Comparación de los diámetros de lo túbulos seminíferos en un sistema tridimensional de cultivo *in vitro*. Las barras indican el SEM (error estándar de la media). Letras diferentes significa medias estadísticamente diferentes.

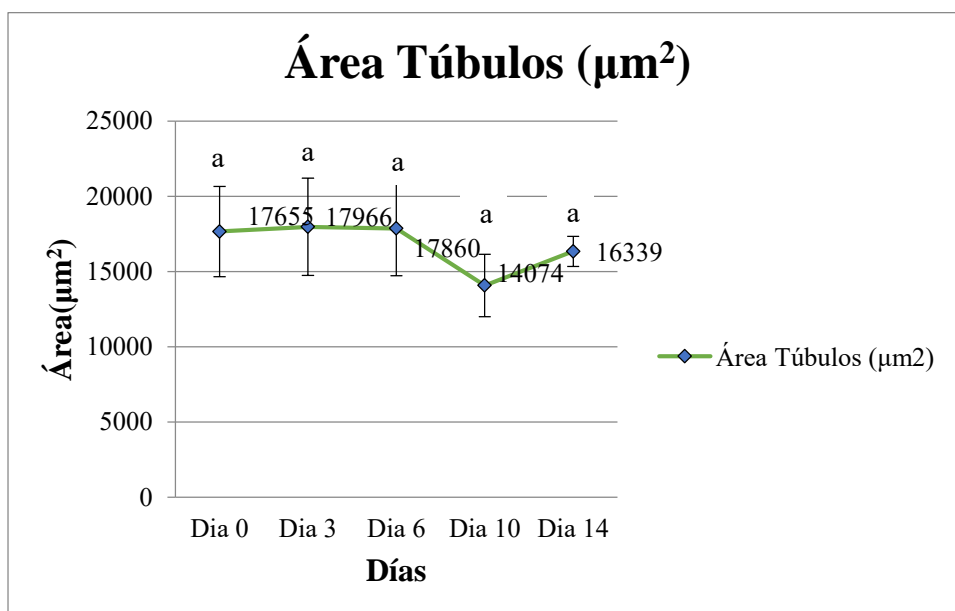


Figura 5. Comparación de las áreas de lo túbulos seminíferos en un sistema tridimensional de cultivo *in vitro*. Las barras indican el SEM (error estándar de la media). Letras diferentes significa medias estadísticamente diferentes.

