

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

¿Cuál es el efecto del empleo de un medio enriquecido sobre la viabilidad de espermatozoides bovinos obtenidos a partir de la cola del epidídimo?

Ana Gabriela Espinosa Paladines

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de ciencias biológicas y ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

¿Cuál es el efecto del empleo de un medio enriquecido sobre la viabilidad de espermatozoides bovinos obtenidos a partir de la cola del epidídimo?

Ana Gabriela Espinosa Paladines

Nombre del profesor, Título académico

Pedro Manuel Aponte, PhD

Quito, 4 de mayo de 2020

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.

Nombres y apellidos: Ana Gabriela Espinosa Paladines

Código: 00113102

Cédula de identidad: 1716135189

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

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

UNPUBLISHED DOCUMENT

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

AGRADECIMIENTOS

Principalmente un especial agradecimiento a Pedro Aponte García por su apoyo incondicional, tutoría y guía en el transcurso de este proyecto. Así mismo, agradezco al Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales de la USFQ

RESUMEN

La preservación de espermatozoides ha dado cabida a poder preservar el germoplasma masculino de animales de un importante valor zootécnico como lo son los animales rumiantes. A través de la inseminación artificial y otras técnicas de reproducción asistida, se alcanza un alto número de descendencia partiendo de un animal con excelentes cualidades tanto genéticas como reproductivas. Debido a la importancia de la preservación en la reproducción animal, este estudio evalúa el efecto de un medio enriquecido constituido por el medio de cultivo celular común (MEM) combinado con suero fetal bovino (SFB) frente a un medio de cultivo constituido únicamente del medio MEM durante 4 horas y un control inicial (hora 0), en donde la viabilidad es el factor principal para evaluar. Se trabajó con el testículo proveniente de un toro, los gametos se extrajeron de la cola del epidídimo y se los preservó en ambos medios señalados anteriormente. Se realizó la tinción con eosina nigrosina en muestras espermáticas, con la que se valoró a los espermatozoides vivos. La muestra de espermatozoides provenientes del empleo del medio MEM presentó un resultado de alrededor del 93%, valor superior en el parámetro a evaluar comparado con el porcentaje de espermatozoides viables obtenidos del empleo del medio enriquecido MEM+SFB que fue de alrededor del 64%, siendo el SFB más bien un factor deletéreo, lo que hace que el medio de preservación MEM sea el óptimo para mantener la viabilidad de los espermatozoides, pudiendo ser empleado en técnicas de reproducción

Palabras clave: Espermatozoides, preservación, bovinos, epidídimo, viabilidad, germoplasma.

ABSTRACT

The preservation of sperm has made it possible to preserve the male germplasm of animals of important zotechnical value such as ruminants. Through artificial insemination and other assisted reproduction techniques, a high number of offspring is reached starting from an animal with excellent genetic and reproductive qualities. Due to the importance of preservation in animal reproduction, this study evaluates the effect of an enriched medium consisting of the common cell culture medium (MEM) combined with fetal bovine serum (SFB) compared to a culture medium consisting solely of the medium MEM for 4 hours and an initial control (hour 0), where viability is the main factor to evaluate. The testis from a bull was worked, the gametes were extracted from the tail of the epididymis and they were preserved through the treatments indicated above. Eosin-nigrosin staining was performed on sperm samples in order to quantify live sperm. The sample of sperm preserved in MEM presented around 93% viability, a higher value in the parameter to be evaluated compared to the percentage of viable sperm obtained from the use of the enriched MEM + SBF medium, which was around 64 %, being the SFB rather a deleterious factor, which makes the MEM preservation medium the optimal one to maintain the viability of the sperm, with potential to be used in reproduction techniques.

Key words: Sperm, preservation, bovine, epididymis, viability, germplasm.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	11
Animales Rumiantes.....	11
Importancia a nivel mundial.....	12
Rumiantes en Ecuador.....	13
Reproducción Asistida.....	14
MÉTODOS	17
Recolección de muestras testiculares	17
Extracción de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo.....	17
Tratamientos y Diseño Experimental	17
Dilución de material espermático	18
Análisis Espermático	18
<i>Tinción de espermatozoides.....</i>	<i>18</i>
<i>Evaluación de la Viabilidad Espermática.....</i>	<i>18</i>
Análisis Estadístico	19
RESULTADOS.....	20
Tinción de Espermatozoides.....	20
Evaluación de la Viabilidad Espermática.....	20
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	25
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
TABLAS	29
FIGURAS.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides vivos vs muertos	29
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. porcentaje de espermatozoides vivos vs muertos.	30
--	----

INTRODUCCIÓN

Animales Rumiantes

Se define como “rumiante” a un animal perteneciente al taxón Ruminantia, con una alimentación totalmente herbívora que posee un sistema digestivo único bastante especializado poligástrico. Alrededor de todo el planeta se encuentran aproximadamente 250 especies. No obstante, las especies más relevantes conocidas son las vacas y toros, ovejas, cabras y venados (Yamila, 2011). La anatomía del sistema digestivo de este animal está conformada de la boca; lengua; el esófago; las glándulas salivales que producen la saliva que regulariza el pH de la panza y poseen las enzimas necesarias para descomponer la grasa y el almidón; el estómago conformado por cuatro compartimientos (rumen, retículo, omaso y abomaso); el hígado, y los intestinos delgado y grueso (Yamila, 2011).

Su sistema digestivo se encuentra adaptado para digerir los alimentos en dos fases: en primera instancia, traga el alimento masticado a través del empleo de su boca y lengua; y en segunda fase, el proceso de rumiar; en donde el forraje u alimento vegetal se devuelve a su boca para poder ser remasticado y mezclarse con la saliva formando un bolo alimenticio que va a volver a ser digerido y va a pasar al retículo a través del esófago. (Cabildo de Gran Canaria, 2018). Posteriormente, la parte sólida pasa al rumen; estomago más grande, para fermentarse formando una capa sólida en donde los microorganismos emplean los alimentos con fibra como un precursor de energía; y la parte líquida pasa del retículo a la cavidad del abomaso (Yamila, 2011). Estos animales tienen la facultad de poder extraer gran parte de la energía de los vegetales al tiempo que muerden su alimento alrededor de 25 000 a 40 0000 veces diariamente (Cabildo de Gran Canaria, 2018).

Importancia a nivel mundial

La ganadería desde tiempos remotos ha venido siendo una actividad elemental en la vida del ser humano, y ha contribuido por alrededor de 450 años al desarrollo económico, agropecuario, comercial y social (Carrillo, et al., 2019). Los rumiantes como las vacas y toros, venados, cabras y ovejas representan un rubro importante a nivel económico en el sector ganadero mundial. Es debido al acelerado desarrollo de la tecnología y a la creciente población mundial en conjunto con el consumo per cápita que es cada vez mayor, que se ha producido un aumento en la demanda de productos de origen animal en el mundo (Myers, 2018).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), reporta que esta actividad representa alrededor del 40% del total de la producción agrícola total en países desarrollados y el 20% en países que se encuentran vías de desarrollo. Es decir, este sector apoya de forma económica alrededor de 1300 millones de personas a nivel global (FAO, 2020). Es importante a su vez recalcar que alrededor del 35% del suministro de proteínas para la alimentación tiene su procedencia a partir del ganado (FAO, 2020). Los rumiantes domésticos empleados en la ganadería poseen una ingesta del 86% de recursos comestibles no aprovechables para el ser humano, como son los pastos. A nivel global, la carne viene a ser el producto obtenido a partir de la ganadería que posee el mayor valor en el mercado. La FAO estima que para el año 2050, la producción de carne a nivel mundial proveniente de la ganadería en países en desarrollo se habrá duplicado, por ende representará una de las fuentes económicas de mayor importancia (FAO, 2016). Así mismo, la FAO proyecta que el crecimiento del consumo de carnes rojas en los países desarrollados, será igual a una quinta parte en comparación a los países en vías de desarrollo como lo es el Ecuador; teniendo como factor de impulso a la creciente demográfica y la urbanización (FAO, 2020). Según la FAO, el país que

lidera el mayor consumo de carne roja per cápita es Estados Unidos con un consumo de 120.2 kg por año (FAO, 2020).

Así mismo, otra de las industrias que se desarrolla a partir de la ganadería de animales rumiantes como las vacas, ovejas o cabras, es la producción de leche. La importancia de cada especie tiende a variar entre países debido a factores como las tradiciones alimenticias, la demanda de mercado o la economía social. Generalmente las personas que no poseen tantos recursos dependen mayormente de los pequeños rumiantes (FAO, 2020). El ganado vacuno aporta al 81% de la producción de leche a nivel mundial, seguido por la leche de búfalo con el 15%, las cabras el 2% y las ovejas el 1%, siendo el bovino el que produce tres cuartos de la producción lechera a nivel global. Son los países desarrollados los que producen leche proveniente de vaca en su mayoría y más de 6000 millones de personas consumen leche o productos lácteos (FAO, 2020). Se recomienda un consumo per cápita de alrededor de 150 litros anuales; sin embargo, en países en desarrollo esta cifra no llega a cumplirse debido a una suma de factores entre ellos la economía y la educación (FAO, 2020).

Rumiantes en Ecuador

La actividad ganadera en el Ecuador posee una gran importancia a nivel económico, con un mayor énfasis en los sectores rurales y en la producción de carnes y sus productos derivados. Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), la producción de carne bovina en el Ecuador es de aproximadamente 200 mil toneladas métricas anuales, llegando a cubrir la demanda nacional de este producto (MAG 2020). Es importante recalcar que en el año 2019 el Ecuador volvió a permitir la compra de reses de alta calidad desde Brasil, con la intención de diversificar la población ganadera (MAG, 2020). Por otro lado, la industria láctea en el Ecuador produce alrededor de \$1 400 millones al año, y el consumo per cápita es inferior a los 90 litros anuales (MAG, 2020).

Reproducción Asistida

La perpetuación de la especie es el fin principal de todo ser vivo. Esta finalidad llega a cumplirse siempre y cuando el ser vivo pueda llegar a reproducirse, es decir, que posea la capacidad de producir un individuo semejante. Siendo así la reproducción un hecho trascendente de suma importancia que dicta la supervivencia de las distintas especies, perpetuando la vida más allá de un solo individuo (Baldassarre, 2007). Cada organismo posee características que lo llevan a distinguirse de entre los demás individuos, estas características están dictadas por su un material genético (ácido desoxirribonucleico) (Guevara, 2004).

El potencial reproductivo de un animal llega a ser superior a su capacidad de procreación en una condición de cría natural durante toda su vida (Capote, 2015). Es dada esta circunstancia que la biotecnología reproductiva se desarrolló con la finalidad de poder llegar a incrementar esta capacidad reproductiva en las hembras y en la difusión del genotipo de los machos, para obtener una mejora en su eficacia reproductiva (Baldassarre, 2007). La reproducción asistida es una tecnología que ha permitido acelerar la velocidad del progreso genético, para poder acceder a animales de altas producciones en un tiempo relativamente corto generando competitividad en un mercado estrecho como lo es la ganadería (Baldassarre, 2007)

Importancia de la preservación de gametos masculinos.

La preservación del material biológico ha sido altamente empleada en campos de la ciencia como: la biología, la medicina y biotecnología; a partir de esta preservación se han podido llegar a crear bancos de células y programas de conservación de especies a través de la preservación del germoplasma (Flores, et al., 2010). El germoplasma animal se refiere a todos los recursos de tipo genético que pueden ser empleados como material de partida en la generación de nuevos individuos, transmitiendo información genética de

una generación a la siguiente, siendo una fuente de variación genética (Cabrera, Caicedo, & Aponte, 2019). Este tipo de preservación se lo realiza para fines de investigación, conservación y reproducción de una especie determinada. Ahora bien, cuando se trata exclusivamente de un fin reproductivo, su uso se ve limitado a la posibilidad de poder almacenar y manipular estos gametos. (Cabrera, et al., 2019). Por ende, una de las opciones para poder almacenar el germoplasma de los animales, se realiza a través de la colecta de espermatozoides provenientes del epidídimo (Ribeiro, et al., 2014).

Los espermatozoides colectados del epidídimo pueden ser empleados para tres fines: criopreservación, emplearlos de forma inmediata en procesos de fecundación *in vitro* o en procedimientos de inyección intracitoplasmática en los oocitos (Ribeiro, et al., 2014). El epidídimo es un órgano sexual del sistema reproductor masculino en los rumiantes. Esta estructura próxima al testículo tiene la función de transportar y almacenar los espermatozoides. Está constituido por tres partes: cuerpo, cola y cabeza. La cola, es el sitio de almacenamiento de los espermatozoides que conecta con el conducto deferente que transporta a los espermatozoides hacia la uretra en el proceso de la eyaculación (Ribeiro, et al., 2014).

El interés cada vez mayor por este tipo de manipulación artificial para la reproducción de rumiantes tales como los bovinos, da cabida a la búsqueda de un protocolo de preservación de semen que posibilite la obtención de espermatozoides con un mayor porcentaje de viabilidad y a su vez, se puedan reducir las colecciones de semen provenientes de animales machos de alto valor genético (Flores, et al., 2010). Debido a que este material seminal se usaría habitualmente fuera del ambiente testicular por la ubicación de las fincas productoras, la verdadera importancia de este protocolo resulta en que las distintas muestras de semen obtenidas de la cola del epidídimo puedan ser

transportadas hacia estos lugares geográficamente distantes conservando el potencial fecundante de estos espermatozoides por largos periodos (Berríos, et al., 2010).

La conservación de estos gametos masculinos de rumiantes resulta favorable económicamente y es importante para poder preservar la diversidad genética y mejorar la eficacia reproductiva del ganado (Carpio, Cadillo, & Mellisho 2008). Hasta la actualidad se sigue teniendo una preferencia por el empleo del semen fresco directo o después de ser conservado en refrigeración (Flores, et al., 2010). Esta forma de empleo de espermatozoides refrigerados provenientes del epidídimo o del eyaculado, es el elemento esencial en un procedimiento de inseminación artificial. La finalidad de poder refrigerar o congelar estas células espermáticas es poder contar con un banco de semen para futuras prácticas de reproducción animal (Carpio et al., 2008).

El objetivo general de este estudio fue evaluar la viabilidad espermática de espermatozoides extraídos a partir de la cola del epidídimo en rumiantes almacenados a una temperatura de 4°C por un periodo de 4 horas. El objetivo específico fue comparar el efecto de dos medios enriquecidos: medio MEM y medio MEN + SFB, sobre la viabilidad de espermatozoides bovinos obtenidos a partir de la cola del epidídimo al transcurrir 4 horas a una temperatura de 4°C.

MÉTODOS

Recolección de muestras testiculares

Se empleó un par de epidídimos (2 epidídimos) de 1 toro, colectado en el camal del Distrito Metropolitano de Quito. Estos testículos fueron colectados incluyendo su cordón espermático, la túnica vaginal y la túnica albugínea. A continuación, se los colocó en una bolsa plástica, almacenados en una caja térmica de espuma flex con hielo para mantener una temperatura apropiada para ser trasladados en un lapso de 20 minutos hasta el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad San Francisco de Quito.

Extracción de espermatozoides a partir de la cola del epidídimo

Los testículos fueron retirados de la caja térmica donde fueron transportados, se procedió a lavarlos con agua corriente y jabón con la finalidad de retirar los residuos de sangre y otros contaminantes. De forma posterior se procedió a aislar asépticamente la cola del epidídimo del testículo y sus tejidos conectivos adyacentes, a través del empleo de un bisturí y una tijera quirúrgica. Se realizaron cortes en el tejido testicular (slicing) y en la cola del epidídimo de un tamaño aproximado de 0,5 cm³, los espermatozoides fueron extraídos por maceración mecánica en una caja Petri que contenía 2 ml de medio PBS a 4°C. Finalmente estos trozos del epidídimo se los depositó en un tubo Falcon.

Tratamientos y Diseño Experimental

El diseño de tratamientos que se empleó fue un proceso simultáneo para dos muestras provenientes de una misma unidad experimental (muestra de semen del mismo bovino) frente a un control (h = 0). La primera muestra fue sometida a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) y la segunda muestra a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) más Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, ambas muestras fueron llevadas de forma inmediata a refrigeración a 4°C por un lapso de 4

horas. Mientras que para la muestra control inicial, la evaluación de calidad seminal se realizó en fresco inmediatamente.

Dilución de material espermático

Al transcurrir el tiempo de refrigeración de 4 horas, se procedió a raspar ambas muestras por separado con el fin de que caigan los espermatozoides en la nueva caja Petri a la que se le agregó la solución tampón fosfato salino (PBS), con el fin de diluir el material espermático.

Análisis Espermático

Tinción de espermatozoides.

Una vez que el semen fue extraído y diluido, sobre un portaobjetos empleando una micropipeta, se agregó una gota de 5 μ l de suspensión de espermatozoides y a continuación otra gota de 5 μ l de solución colorante eosina nigrosina a una placa portaobjetos, esta tinción fue preparada según Barth y Oko (1989). Se homogenizó la mezcla empleando la misma micropipeta y de manera concurrente, se volvió a tomar otra gota de 5 μ l de esta solución final para depositarla sobre el extremo de una nueva placa portaobjetos, se la dejó reposar por 30 segundos y con la ayuda de otro portaobjetos, se procedió a realizar el extendido o frotis de la muestra que fue fino y uniforme. El secado se realizó rápidamente al aire.

Evaluación de la Viabilidad Espermática.

Una vez que se obtuvo la lámina de ambas muestras anteriormente teñidas con eosina nigrosina, las células vivas o muertas fueron contadas en el microscopio bajo un objetivo de 40X. Se procedió a contar 200 espermatozoides distribuidos en la placa preparada en el microscopio óptico, evitando el contaje en zonas con muy alta concentración espermática. Se consideraron células muertas a aquellas que estaban coloreadas de un tono rosa y por lo contrario, células vivas a las que presentaban una

tonalidad blanca. Los resultados obtenidos se presentaron en porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Análisis Estadístico

Para poder describir los datos obtenidos del conteo de los espermatozoides observados al microscopio. Se realizó un promedio con el que se pudo obtener un porcentaje de espermatozoides vivos vs muertos en cada una de las tres muestras.

RESULTADOS

Tinción de Espermatozoides

Los espermatozoides vivos no se tiñeron al momento de la coloración con la tinción de eosina nigrosina. Mientras que los espermatozoides muertos, se observaron de color rosado.

Evaluación de la Viabilidad Espermática

La muestra de espermatozoides pertenecientes al medio MEM sometida a refrigeración por 4 horas, presentó el mayor resultado en el parámetro de interés de viabilidad espermática con tinción eosina nigrosina, alcanzando un porcentaje del 93% de espermatozoides vivos en comparación a la muestra perteneciente al medio MEM + SFB, que fue sometida al mismo tiempo de refrigeración y presentó el porcentaje más bajo de 64% de espermatozoides vivos. Por otro lado, la muestra de espermatozoides frescos (control inicial) que no fue sometida a refrigeración, presentó un porcentaje de 89%. En el parámetro realizado, las muestras de espermatozoides que fueron sometidas a refrigeración por un período de 4 horas presentaron diferencias al ser comparadas entre sí (Grafica 1) (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se logró evidenciar algunas condiciones para el mejor mantenimiento de espermatozoides bovinos de la cola del epidídimo. Este órgano es el principal lugar en donde se almacenan los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación; es decir, es justamente en este órgano sexual masculino que los espermatozoides permanecen viables e inmóviles por un largo de tiempo que puede durar hasta semanas (Carpio, et al., 2008). Como sostiene Valverde, en este órgano sexual se pueden acumular una gran cantidad de espermatozoides que podrían abastecer algunas eyaculaciones; por ende, la cola del epidídimo viene a ser una fuente de germoplasma. Son pocos los estudios que se han realizado acerca de las técnicas de criopreservación o inseminación artificial empleando espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, aún si en algunas situaciones esta es la última estrategia para la preservación de gametos masculinos en rumiantes (Valverde, 2016).

Es por esta razón que este estudio tomó en cuenta la capacidad que posee el epidídimo para almacenar una gran cantidad de espermatozoides, para poder establecer un medio enriquecido que resulte beneficioso en la manutención del parámetro de viabilidad en el esperma obtenido de animales rumiantes como el bovino en este caso específico. Ahora bien, es importante considerar que el epidídimo de un animal no puede ser empleado como control de otro ya que pueden existir diferencias en relación a la calidad y cantidad de espermatozoides de un individuo al otro, por ende, se empleó el método del promedio/animal; es decir, se realizó el estudio de la viabilidad de la muestra de un solo toro, evaluado a tres diferentes condiciones que arrojó 3 resultados porcentuales distintos en cuanto a la viabilidad.

El parámetro de viabilidad espermática en este estudio fue valorado indirectamente a través del estado de la membrana plasmática del espermatozoide,

empleando la tinción eosina nigrosina, misma que permite la diferenciación de los espermatozoides vivos de los muertos (González, et al., 2013). Cuando el espermatozoide presenta una condición normal en donde no ha sufrido ningún deterioro de su membrana, este colorante no va a penetrar en el espermatozoide por lo que no va a presentar tinción alguna. No obstante, cuando la célula está muerta debido a un daño en su membrana plasmática, el colorante ingresará hasta el citoplasma y por ende el espermatozoide se teñirá de tonalidad rosa (González, et al., 2013).

Como se puede evidenciar en el gráfico 1, una vez que se realizó el conteo al microscopio de ambas muestras provenientes de los distintos medios enriquecidos y el control, tomando en cuenta el color de tinción de los espermatozoides, se obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad del 93% en el medio compuesto únicamente por MEM, durante 4 horas a 4°C. Por otro lado, la viabilidad obtenida en el medio MEM + SFB sometido a las mismas condiciones anteriormente mencionadas, resultó en un 64%, valor que demuestra que el componente suero fetal bovino al 10%, es más bien un factor deletéreo en este medio de enriquecimiento para la preservación de los espermatozoides de bovino.

El suero fetal bovino es una fracción líquida de sangre coagulada que no posee células, factores de coagulación o fibrina (Johnson, 2012). Por el contrario, este resultado no esperado generó intriga, ya que este compuesto se caracteriza por contener abundantes factores macromoleculares y nutricionales que se esperaba resultaran en un elemento esencial para el mantenimiento celular, en este ámbito de la supervivencia de los espermatozoides específicamente (Johnson, 2012). El SFB está mayormente constituido por albumina sérica bovina, que posee una gran cantidad de factores que estimulan el crecimiento de las células en cultivo y otras pequeñas moléculas como aminoácidos, azúcares, hormonas y lípidos (Johnson, 2012). Una de las hipótesis probables que explique este resultado obtenido es que el SFB está compuesto por una baja cantidad de

inmunoglobulinas y proteínas pertenecientes al sistema del complemento, que producen lisis en células en cultivos (Johnson, 2012). Si bien, el suero posee estos componentes en una baja cantidad, puede que al no haberse realizado una centrifugación o algún método de purificación, estas proteínas del complemento del SFB sea el causante del deterioro de las membranas de los espermatozoides y por ende su muerte en el medio con SFB y no en el medio de enriquecimiento exclusivo de MEM. La alternativa que presenta este estudio para disminuir esta concentración de proteínas en la muestra de semen es someter la muestra a la técnica de centrifugación con la finalidad de separar estas proteínas del SFB y facilitar su remoción para poder agregar la proporción adecuada de nutrientes y crio protectores al semen (Carpio, et al., 2008).

Ahora bien, otra posible hipótesis es que ciertos factores como el tiempo y la temperatura a la que fue expuesto el epidídimo en el proceso de transporte desde el camal al laboratorio de biotecnología vegetal tuviesen alguna influencia directa sobre el parámetro de la viabilidad de los espermatozoides (Ribeiro, et al., 2014). Sin embargo, en este caso puntual el resultado del porcentaje en la viabilidad debería haber sido bajo para las tres muestras de haber sucedido esto, por ende al obtener porcentajes relativamente altos tanto en la muestra control como en la del medio de enriquecimiento MEM, se puede aludir que estos factores estuvieron bastante bien controlados en este estudio.

Otro aspecto para discutir en este estudio es que otros estudios realizados como el de Carrillo, et al. (2009), han reportado la viabilidad de espermatozoides de toros colectados del epidídimo y tratados con medio MEM en donde se estudió este parámetro a partir de espermatozoides de bovinos extraídos de la cola del epidídimo de forma casi inmediata al sacrificio del animal y se los refrigeró a 4°C por 24 horas y existió un porcentaje

de viabilidad del 63%, y aluden a que factores como la manipulación de la muestra y el almacenamiento tienen alguna incidencia en la viabilidad (Ribeiro, et al., 2014).

Las aplicaciones del estudio realizado son amplias, considerando la importancia del empleo de espermatozoides frescos o refrigerados como elemento indispensable para un programa de reproducción asistida, como lo es la inseminación artificial (Martins, et al., 2007). Uno de los principales objetivos de encontrar un medio enriquecido que facilite la supervivencia de los espermatozoides de animales rumiantes, es la producción de un banco de estos. Otro punto importante para mencionar es la importancia del estudio para el Ecuador, ya que, al ser un país con diversas regiones climáticas, la recolección y conservación de los espermatozoides del epidídimo resulta ser difícil debido a factores como la temperatura del ambiente, falta de técnicos u equipos para su procesamiento (Martins, et al., 2007). Una de las mayores limitaciones a su vez, es la falta de estudios o informes acerca de la recuperación de gametos masculinos exclusivas para estas condiciones ambientales (Martins, et al., 2007).

CONCLUSIÓN

En cuanto al parámetro analizado en donde se midió la viabilidad de espermatozoides extraídos a partir de la cola del epidídimo de bovino, las muestras de espermatozoides con distintos medios enriquecidos que fueron sometidas a refrigeración por un periodo de 4 horas presentaron diferencias al ser comparadas entre sí. A través de este estudio se pudo concluir que la forma más óptima para la preservación de espermatozoides extraídos a partir de la cola del epidídimo en refrigeración es a través de un medio nutritivo; en este caso un medio MEM, con el que se obtuvo una mayor viabilidad, la más alta en comparación a los demás. Se determinó a su vez, que el SFB es un factor deletéreo, lo que se atribuye a su composición de proteínas del complemento que al producir lisis en las células causa una reducción en la viabilidad espermática. Finalmente, el medio MEM al resultar el más óptimo para la preservación de la viabilidad, puede ser empleado en técnicas de reproducción asistida como la inseminación artificial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldassarre, H. (2007). Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(2), 274-282.
- Barth, A. D., & Oko, R. J. (1989). *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press.
- Berríos, O, Valdebenito, I, Treulén, F, & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(3), 179-186
- Cabildo de Gran Canaria. (27 de Septiembre de 2018). Así funciona el sistema digestivo de los rumiantes. Recuperado el 15 de Abril de 2020, de <https://www.mataderograncanaria.com/asi-funciona-el-sistema-digestivo-de-los-rumiantes/>
- Cabrera, F., Caicedo, A., & Aponte, P. M. (2019). Usos potenciales de germoplasma animal masculino con fines de preservación de fauna silvestre. *Bionatura*, 2(4), 465-467.
- Capote, B. (5 de Febrero de 2015). *Técnicas reproductivas en ganadería*. Recuperado el 15 de Abril de 2020, de http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/05_10_29_ATT00154.pdf
- Carpio C., M., Cadillo C., J., & Mellisho S., E. (2008). Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 19(1), 15-19.

- Carrillo, J., Castro, A., & Urbina, A. (2019). La ganadería en el contexto agroalimentario, la generación de empleo y los retos del cambio climático: hacia una nueva política de sostenibilidad competitiva. *MAG, 1*, 1-74.
- FAO. (2020). *Milk Facts*. Recuperado el 15 de Abril de 2020, de <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/273893/>
- Flores A., Fernández A., Huamán U., Ruiz G., & Santiani A.(2010). Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 21*(1), 26-34.
- González S., Tadeo C., Ortega C., Toledano A., Vergara M., Avalos A. (2013). Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tiempos post-mortem en caninos. *Revista de Salud Animal, 35*(2), 137-141.
- Guevara, G (2004). ADN: historia de un éxito científico. *Revista Colombiana de Filosofía de la Ciencia, 3*(11), 9-40.
- Johnson, M. (2012). Suero fetal bovino. *Labome, 1*, 1-6
- MAG. (2020). *Bovinos*. Recuperado el 15 de Abril de 2020, de <https://www.agricultura.gob.ec/?s=bovino>
- Martins, C. F., Rumpf, R., Pereira, D. C., & Dode, M. N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science, 101*(4), 326–331.
- Myers, M. (2018). *Ganadera y cria de animales*. Bogotá: Sumario.
- Ribeiro, A, Munita, L, Yumi, M, Mello, M, & Ferreira, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los

métodos convencional y automatizado. *Archivos de medicina veterinaria*, 46(1), 31-38.

Valverde, E. (2016). *Efecto de dos temperaturas de almacenamientos (5 y 20 °C) de epidídimos provenientes de toros de matadero sobre la calidad y congelabilidad de espermatozoides* (Tesis de maestría). Universidad de Cuenca, Ecuador.

Yamila, P. (2011). ¿Qué son los animales rumiantes? Recuperado el 15 de Abril de 2020, de <https://misanimales.com/que-son-los-animales-rumiantes/>

TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides vivos vs muertos en los tratamientos experimentales.

Muestra espermatozoides a partir del epidídimo	Vivos	Muertos	Total
CONTROL INICIAL	162	32	194
Muestra epidídimo bovino con medio MEM (+4h)	189	15	204
Muestra epidídimo bovino con medio MEM + SFB (+4h)	56	32	88
Porcentaje			
control inicial	84%	16%	100%
Muestra epidídimo bovino con medio MEM(+4h)	93%	7%	100%
Muestra epidídimo bovino con medio MEM + SFB (+4h)	64%	36%	100%

Muestra sometida a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM), a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) más Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, durante 4 horas a 4°C y un Control inicial realizado en fresco inmediatamente.

FIGURAS

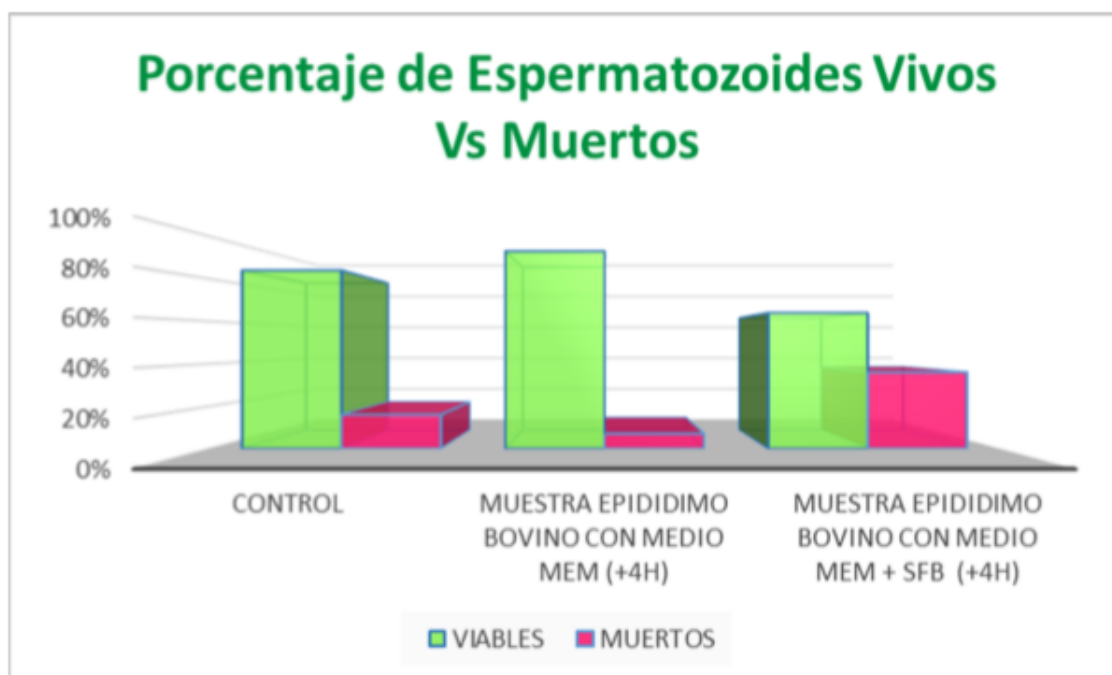


Figura 1. Porcentaje de Espermatozoides Vivos vs Muertos. Muestra sometida a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM), a un tratamiento con 15ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) más Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%, durante 4 horas a 4°C y a un Control inicial (t=0).