

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Efecto de medios de cultivo enriquecidos sobre la integridad
acrosomal de espermatozoides bovinos obtenidos de tejido
testicular y epididimario mantenidos en refrigeración**

Asiria Belén Sevilla Arteaga

Ingeniería en Proceso Biotecnológicos

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

**Efecto de medios de cultivo enriquecidos sobre la integridad acrosomal de
espermatozoides bovinos obtenidos de tejido testicular y epididimario
mantenidos en refrigeración**

Asiria Belén Sevilla Arteaga

Nombre del profesor, Título académico:

Pedro Manuel Aponte García, MV, 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:	Asiria Belén Sevilla Arteaga
Código:	00132417
Cédula de identidad:	1724210503
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UNPUBLISHED DOCUMENT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>.

RESUMEN

En este trabajo se analizó el efecto de medios de cultivo enriquecidos sobre la integridad acrosomal espermática de bovinos mantenidos bajo condiciones de refrigeración. De igual manera, este estudio se complementó con el análisis de la motilidad y morfología espermática. La preservación del material genético bovino representa una gran importancia económica y social dentro del sector pecuario y determinar la integridad acrosomal espermática bovina *postmortem*, provee información básica para posteriores estudios relacionados a la preservación de la línea germinal en esta especie o en otras especies que se encuentren en peligro de extinción. Por ende, es necesario definir un medio de cultivo enriquecido para preservar este organelo. Uno de estos medios es el medio MEM, el cual promueve el crecimiento celular y aumenta la expresión proteica al igual que el SFB, el cual es un medio rico en lípidos, azúcares y varios factores de crecimiento. Se inició realizando una identificación y conteo de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo y testículo bovino a través de observación microscópica para diferenciar mediante gráficas de barras la integridad acrosomal, motilidad y morfología de los espermatozoides obtenidos en cada una de las muestras mantenidas en medio MEM y MEM+ 10% SFB (Suero Fetal Bovino). Con esto, se obtuvieron porcentajes de acrosomas íntegros tomando en cuenta dos puntos temporales $t = 0$ h y $t = 4$ h. Igualmente, se registró las diferentes morfologías espermáticas observables, así como el porcentaje de espermatozoides móviles e inmóviles bajo estos mismos puntos temporales. Así, se obtuvo que los tejidos del epidídimo y del testículo mantenidos únicamente en medio MEM mostraron un porcentaje $\geq 90\%$ en cuanto a integridad acrosomal en $t = 4$ h. Por otro lado, al añadir SFB al medio MEM, el porcentaje de integridad acrosomal disminuyó hasta 92-94% en $t = 4$ h. Porcentajes similares se obtuvieron al analizar la morfología y motilidad. Por lo tanto, los resultados señalan que con el medio nutritivo MEM a 4°C después de 4 horas, se logró conservar la integridad acrosomal, motilidad y morfología espermática en relación al $t = 0$ h.

Palabras claves: medios de cultivo enriquecidos, integridad acrosomal, morfología, línea germinal, espermatozoides, epidídimo, testículo, MEM, Suero Fetal Bovino, motilidad.

ABSTRACT

This work analyzed the effect of the enriched culture media on the acrosomal integrity in bovine spermatozoa kept under refrigeration conditions. Likewise, this study was complemented by the analysis of motility and sperm morphology. The preservation of bovine genetic material represents great economic and social importance within the livestock sector and determining the acrosomal integrity of *postmortem* bovine sperm, provides basic information for subsequent studies related to the preservation of the germline in this species or other endangered species. Therefore, it is necessary to define an enriched culture medium to preserve this organelle. One of these media is the MEM medium, which promotes cell growth and increases protein expression, as well as Fetal Bovine Serum (FBS), which is a medium rich in lipids, sugars, and various growth factors. It began by performing identification and counting of sperm obtained from the tail of the epididymis and bovine testis through microscopic observation to how through bar charts the acrosomal integrity, motility, and morphology of the sperm obtained in each of the samples kept in MEM medium and MEM + 10% FBS. With this, percentages of intact acrosomes were obtained taking into account two-time points $t = 0$ h and $t = 4$ h. Likewise, the different observable sperm morphologies were also registered, as well as the percentage of motile and immotile sperm on these same time points. Thus, it was obtained that the tissues of the epididymis and testis maintained in only MEM medium showed a percentage $\geq 90\%$ in terms of acrosomal integrity at $t = 4$ h. On the other hand, when adding FBS to MEM medium, the percentage of acrosomal integrity decreased to 92-94% at $t = 4$ h. Similar percentages were obtained when analyzing morphology and motility. Therefore, the results indicate using MEM nutrient medium at 4°C for 4 hours, it was possible to preserve acrosomal integrity, motility, and sperm morphology compared to $t = 0$ h.

Keywords: enriched culture media, acrosomal integrity, morphology, germline, sperm, epididymis, testicle, MEM, Fetal Bovine Serum, motility.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos	16
Recolección y procesamiento de muestra	16
Evaluación de espermatozoides	17
Análisis histológico del tejido	17
Procesamiento de datos y análisis estadístico	18
Resultados	19
Integridad acrosomal.....	19
Movimiento espermático.....	20
Morfología espermática	21
Análisis histológico.....	22
Discusión	23
Conclusiones	27
Referencias bibliográficas.....	28
Anexo A: Regiones principales del acrosoma	30
Anexo B: Muestras testiculares previo al procesamiento.....	31
Anexo C: Patologías más significativas encontradas en los espermatozoides bajo diferentes condiciones	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de integridad acrosomal espermática testicular y epididimaria a diferentes tiempos y condiciones	19
Tabla 2. Porcentaje de motilidad de espermatozoides del epidídimo a diferentes tiempos y condiciones	21
Tabla 3. Morfología espermática del tejido epididimario a diferentes tiempos y condiciones	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de integridad acrosomal espermática del tejido epididimario y testicular a diferentes condiciones y tiempos	2020
Figura 2. Porcentaje de motilidad espermática del tejido epididimario a diferentes condiciones y tiempos	211
Figura 3. Comparación de morfología espermática a condiciones y tiempos diferentes de incubación	222
Figura 4. Corte histológico de la estructura del tejido testicular bovino teñido con hematoxilina	22

INTRODUCCIÓN

Dentro del sistema pecuario los bovinos representan un papel sociocultural y económico fundamental como una fuente de empleo, impulsor agrícola y como suministro de alimento en muchas partes del mundo (Bettencourt, et al., 2015). De esta forma, la gran necesidad por obtener alimentos inocuos y de calidad, busca destinar una gran parte de la economía de un país al desarrollo de nuevas tecnologías que permitan el crecimiento de la producción pecuaria y agrícola de forma segura y sostenible (Fonseca, Manosalva & Vargas, 2011). Por lo tanto, la importancia de realizar estudios espermáticos en bovinos se basa principalmente en la necesidad que surge por preservar su línea germinal para futuras aplicaciones dentro de este sistema pecuario.

Actualmente el uso de semen mantenido en refrigeración o congelación ha aumentado significativamente para realizar futuras inseminaciones artificiales en bovinos. Sin embargo, existen muy pocos estudios realizados en la especie bovina, tomando en cuenta su gran valor dentro de la producción pecuaria como se mencionó previamente. Por ende, garantizar una posible inseminación artificial en esta especie aumentará la producción de sus crías y mejorará su acervo genético. A pesar de esto, la tasa de concepción en esta especie es relativamente baja en la primera inseminación artificial, ya que se encuentra influenciada directamente por la capacidad y viabilidad de los espermatozoides que se encuentran en la pajilla de semen para lograr fecundar el ovocito de la especie (Cabrera & Pantoja, 2012).

Estos espermatozoides son los gametos encargados de transportar el material genético de una generación a otra a través de la fecundación asegurando su fusión con el óvulo para dar lugar a un nuevo embrión (Olivera, et al., 2006). Por ende, es necesario implementar un protocolo de valoración de la calidad del líquido espermático para lograr determinar de forma fácil y rápida la capacidad fecundante de los espermatozoides. Esto conlleva analizar la

morfología, vitalidad e integridad acrosomal de dichos espermatozoides (Cabrera y Pantoja, 2012). La morfología espermática es uno de los factores más estudiados en el análisis del líquido seminal, ya que a partir de este parámetro se determina la fertilidad del macho (Maya & Walter, 2017).

Se considera que un espermatozoide se encuentra en buen estado cuando su cabeza es ovalada y lisa con un ancho aproximado de 2.5 a 3.5 μm y un largo de 5 a 6 μm aproximadamente con un acrosoma que abarque un 40 a un 70% del volumen de dicha cabeza (Montoya, 2009). El cuello del espermatozoide se ubica entre la cabeza y el flagelo, y debe ser más ancho que la base de la cola con un ancho menor a 1 μm (Montoya, 2009). Por último, la cola espermática no debe estar doblada, debe brindar buena motilidad al espermatozoide al encontrarse dispuesta de forma derecha y uniforme con un largo aproximado de 45 μm (Montoya, 2009). Sin embargo, al observar la morfología espermática, es posible determinar una serie de anomalías que posee el espermatozoide. Entre los defectos más comunes de los espermatozoides se encuentran las anomalías de la cabeza y cola. Los defectos de la cabeza pueden encontrarse como espermatozoides de cabeza doble, de tipo vacuolada (vacuola ocupa un porcentaje mayor al 20% en la cabeza), cabeza grande y cabezas sin cola. Por último, los defectos de la cola se pueden presentar como cola corta, cola doble, cola enrollada, cola doblada, gota distal y con defecto Dag (Kruger, et al., 1988).

Por otro lado, la integridad acrosomal es igualmente un parámetro importante a la hora de estudiar una muestra espermática. El acrosoma es un órgano vesicular ubicado en la región apical de la cabeza de los espermatozoides que, mediante la liberación y posterior acción de enzimas hidrolíticas (tripsina, acrosina y hialuronidasa) almacenadas en esta vesícula, se genera la ruptura de la zona pelúcida del óvulo para ayudar al espermatozoide a que ingrese al mismo para fecundarlo (Manosalva, et al., 2005). Así se produce la reacción acrosómica, la cual está

basada en una exocitosis del contenido acrosomal como resultado de la fusión de la membrana acrosomal exterior y la membrana plasmática para dejar expuesta la membrana acrosomal interna. Dentro del acrosoma se puede visualizar claramente tres regiones fundamentales: zona acrosomal interna, zona post acrosomal y el segmento ecuatorial (Anexo A). La primera zona se caracteriza por recubrir toda la cabeza del espermatozoide. La zona post acrosomal llega a fusionarse con la membrana plasmática del ovocito luego de la reacción acrosómica. Por último, el segmento ecuatorial cubre la zona del acrosoma, pero durante la reacción acrosómica no se llega a fusionar con la membrana acrosomal exterior (Cánovas & Coy, 2008).

Así, la importancia de este acrosoma en la fecundación animal es directamente proporcional a la reactividad membranal del mismo. Es decir, que únicamente los espermatozoides con un acrosoma íntegro y por ende capaces de realizar la RA (reacción acrosomal) de forma uniforme durante la penetración del óvulo, serán aptos para traspasar la región pelúcida y lograr su fusión con la misma para genera un nuevo embrión (Cabrera & Pantoja, 2012).

Es impredecible que el método para evaluar el estado del acrosoma en los espermatozoides sea inocuo, exacto y rápido. De igual forma, se puede emplear distintos medios o fluidos que enriquezcan la muestra de espermatozoides y así diferenciar claramente su efecto sobre la integridad de este organelo; el cual puede estar asociado a una buena reacción acrosómica y posterior fecundación exitosa (Ugarelli, Evangelista & Santiani, 2017). Sin embargo, también es importante complementar este tipo de estudio, analizando la viabilidad y morfología de los espermatozoides.

Para llevar a cabo dicho tipo de análisis en rumiantes domésticos, se pueden tomar muestras de espermatozoides del testículo o de la cola del epidídimo. El epidídimo, en esta especie bovina, es un órgano en forma de coma que mide de 10 a 12 cm y que presenta

internamente un conducto enrollado sobre sí mismo en la zona posterior-lateral del testículo (Reiriz, s.f.). Dentro de este órgano se puede distinguir células epiteliales altas y redondas, las cuales se encuentran en contacto con la membrana basal. A pesar de que la estructura de los espermatozoides se considera completa dentro del testículo, se ha demostrado que estos muchas veces están estériles y su fertilidad va a aumentando conforme van atravesando el epidídimo. Por ende, es importante mencionar que los espermatozoides mueren luego de 1 a 7 días fuera del epidídimo, con excepción de que estos sean mantenidos en congelación (Alba, 1964, p 40).

La calidad del semen que se obtenga va a depender de la época de recolección y del método utilizado. Sin embargo, para llevar a cabo un análisis rápido sobre la integridad acrosomal en una muestra espermática de rumiantes, es factible obtener espermatozoides luego de pasado cierto tiempo una vez sacrificado el animal. Esta muestra puede ser obtenida directamente del testículo o de la cola del epidídimo. Para la recolección de muestra espermática del testículo, es necesario abrir aproximadamente 2 a 3 cm de la piel del testículo para la obtención de muestras de tejido testicular, el cual deberá ser fraccionado para obtener la muestra espermática (Instituto Bernabeu, 2020). Por otro lado, el líquido espermático también puede ser obtenido de la cola del epidídimo, ya que los espermatozoides permanecen con capacidad fecundante y con motilidad poco tiempo después de la muerte del animal. Esto se debe a que el proceso de almacenamiento y maduración espermática se da en el epidídimo. Por lo tanto, la obtención de espermatozoides fértiles a partir de la cola del epidídimo, puede presentarse como una opción para llevar a cabo la preservación del material genético en machos (Benítez, et al., 2018).

Para la evaluación de la membrana acrosomal se utiliza tinciones simples y posterior observación en un microscopio óptico, siendo este un método sencillo que brinda información sobre cualquier daño ocurrido en la membrana acrosomal plasmática (Rubio, Quintero &

Villalobos, 2009). El tipo de tinción más utilizada para observar la integridad acrosomal es la tinción Giemsa. Esta se caracteriza por ser una tinción de tipo diferencial capaz de caracterizar varios aspectos morfológicos de frotis sanguíneos, muestras biológicas o cortes histopatológicos (Abbas et al., 2015). Este tipo de coloración está constituida por un 63.6% de azul de metileno, 28.6% de azure B, 4.4% de azure A y 1.9% de eosina (Perea, 2003). Por lo tanto, al observar la integridad acrosomal en los espermatozoides de rumiantes, se observará de color morado la membrana acrosomal y de azul claro la base cuando los espermatozoides presenten un acrosoma intacto. Por otra parte, cuando los espermatozoides presenten su acrosoma dañado, la coloración se torna de rosa pálido (Cabrera & Pantoja, 2012).

Por otro lado, la importancia del uso de medios de cultivo enriquecidos, se basa en la importancia de suplir los requerimientos básicos que las células necesitan para crecer a una temperatura, osmolaridad y un pH óptimo. Por lo cual, es importante definir un medio de cultivo artificial adecuado para preservar de mejor forma la membrana acrosómica en los espermatozoides. Uno de estos medios artificiales son los medios basales como el medio MEM (Minimum Essential Medium Eagle). Este se considera como parte de los medios que no poseen proteínas, pero que se usan para promover el crecimiento celular y un aumento en la expresión proteica. Se encuentra constituido por glucosa, una serie de 13 aminoácidos, 6 sales y 8 vitaminas (Arora, 2013).

Otro medio o componente utilizado para preservar el contenido de muestras espermáticas es el suero fetal bovino (SFB). Está basado en una fracción líquida de sangre ya coagulada que no posee fibrina, factores de coagulación ni células y las inmunoglobulinas junto con el sistema de complemento se encuentran en baja concentración. Además de poder inactivarse a 60°C por 30 min, según las indicaciones de varias casas fabricantes. Sin embargo, el SFB es rico en factores nutricionales, aminoácidos, lípidos, factores de crecimiento, azúcares,

hormonas y macromoléculas esenciales para dar paso al crecimiento celular, siendo la albúmina sérica bovina la que se encuentra en mayor cantidad. Por lo tanto, el SFB ha sido ampliamente utilizado para el cultivo celular, ya que sus proteínas le confieren estabilidad a la membrana celular (Johnson, 2012).

Por consiguiente, la necesidad que surge de preservar la integridad del acrosoma en rumiantes domésticos como bovinos está basada en la preservación de la línea germinal de dichas especies u otras especies emparentadas que se encuentren en peligro de extinción, como la oveja palmera, el búfalo de agua, el borrego de desierto, la gacela dama, entre otros rumiantes en peligro de extinción (UICN, 2019). También el estudio de esta integridad acrosomal sirve de base para estudios posteriores para tratar problemas de fertilidad en animales. Por ende, es pertinente estudiar la biología reproductiva mediante el desarrollo de técnicas biotecnológicas asociadas a la reproducción antes de que todo este grupo de especies consideradas como parte de los rumiantes y otras alcancen un nivel crítico de extinción (Roldán & Garde, 2004).

Sin embargo, también es necesario realizar un estudio y análisis de la morfología e integridad acrosomal de espermatozoides en una muestra espermática conservada en distintos medios enriquecidos para observar bajo qué condiciones el espermatozoide se mantiene más viable en términos de integridad acrosomal. De esta forma, dicho análisis podrá servir de base o complementar a futuros estudios que se desee realizar en relación a la preservación de la línea germinal de rumiantes. Por lo tanto, el objetivo general de esta investigación es identificar el efecto de medios de cultivo enriquecidos sobre la integridad del acrosoma espermático bovino mantenido en refrigeración. De este modo, se utilizará SFB y medio MEM para aportar a las membranas de los espermatozoides estabilidad y nutrición para determinar el tiempo de incubación adecuado en el que los espermatozoides mantendrán una buena motilidad, morfología e integridad acrosomal.

MÉTODOS

Recolección y procesamiento de muestra

Se recolectó muestras testiculares bovinas una vez sacrificados los animales en El Camal Metropolitano de Quito y fueron procesados inmediatamente luego de la llegada de las mismas al laboratorio (tiempo *postmortem*: máximo 2 horas). Los testículos se colocaron en bandejas junto a una regla, que sirvió como referencia para determinar el tamaño de cada uno de estos a través del programa ImageJ (Anexo B). Se cortó la membrana que recubre el testículo y se realizaron pequeñas incisiones del testículo y la cola del epidídimo con un bisturí quirúrgico estéril para obtener trozos de tejido de aproximadamente 0.5 cm³. Luego, se colocó a los mismos dentro de tubos falcon de 15 mL y se reservó una parte de los tejidos cortados para el análisis histopatológico de los mismos.

Por otro lado, para la evaluación de la integridad acrosomal se preparó los medios de enriquecimiento MEM y MEM + 10% de SFB. El medio MEM 10X (aminoácidos no esenciales (10 ml – 50X), estreptomycin (10 µg/mL), bicarbonato de sodio, buffer HEPES (3 mM), penicilina (10 iU/ml), L-glutamina (4 mM) y 50 mL MEM 10X) se diluyó en 470 mL de agua destilada estéril. En cuanto al medio MEM + 10% de SFB, fue necesario realizar una dilución de 1 mL de SFB en 9 mL de medio MEM en una probeta de 100 mL. Así, parte de los pedazos de los tejidos previamente cortados y depositados dentro de los tubos falcon, fueron sometidos a un tratamiento con medio MEM y otra parte de estos se sometieron a un tratamiento con medio MEM + 10% de SFB. Estas muestras fueron conservadas a 4°C por 4 h para luego extraer las muestras de los tubos y se colocarlas en cajas Petri. Se añadió unas gotas de PBS (buffer salino fosfato) en las mismas para la obtención del líquido espermático. Para esto, se realizó un raspado de los tejidos cortados sobre el PBS con ayuda de una pinza y un bisturí quirúrgico previamente esterilizados para obtener una muestra de líquido espermático diluido en PBS.

Evaluación de espermatozoides

Para el análisis de la integridad acrosomal espermática fue necesario iniciar con la realización de frotis espermáticos. Para esto se añadió 5 μ l del líquido espermático mezclado previamente con PBS sobre un porta objetos. Una vez secos al aire, se fijaron los frotis sobre el puente de tinción y se los cubrió con metanol al 95% por 5 min, se lavó en agua destilada y luego se añadió la dilución de Giemsa al 6% durante 12 horas. Pasado este tiempo, se lavó cuidadosamente las placas con agua destilada estéril y se dejaron secar. Finalmente, se realizó la observación de los espermatozoides en un microscopio óptico con amplificación de 400X, registrando al menos 100 espermatozoides para observar la integridad de sus acrosomas (%).

Por otro lado, también se identificó microscópicamente las diferentes morfologías que presentaron los espermatozoides en $t = 0h$ y $t = 4h$ con un objetivo de 40X. De esta forma, se procuró contar 100 espermatozoides en cada uno de los tratamientos y se identificó si existió alguna deformidad en la morfología de los mismos o si estos se encontraban normales.

Análisis histológico del tejido

Algunas de las muestras testiculares previamente cortadas, se colocaron en un cassette con tapa para la inclusión de los tejidos en parafina. Cada trozo de tejido dentro de los cassettes, fue fijado en solución de Bouin durante 48 horas, seguido de etanol al 70%, 95% y 100% por duplicado por 40 min en cada concentración. Luego, se añadió xilol 3 veces durante 10 min y luego se incorporó parafina:xilol (1:1 y 2:1) por 45 cada uno. Finalmente, se añadió parafina pura dos veces por otros 45 min. Una vez deshidratados los tejidos, se añadió los pedazos de tejidos en moldes metálicos de inclusión y se lo relleno con parafina líquida (temperatura igual o mayor a 40°C). Una vez que la parafina enfrió y solidificó se dejó al molde sobre una placa fría por unos minutos hasta que fue posible extraer el bloque de parafina del molde de inclusión con facilidad. Se mantuvo los bloques a temperatura de congelación ($\approx 18^\circ\text{C}$).

Para el corte del tejido se utilizó un micrótopo, el cual se programó para que realice los cortes del tejido a 5 μm . De esta forma, se colocó el bloque de parafina con el tejido sobre el soporte del micrótopo para cortar al tejido en láminas más delgadas mediante movimientos oscilatorios. Con ayuda de lancetas o pinceles, se extendió a los tejidos cortados sobre un baño caliente de agua destilada a una temperatura de 40°C. Enseguida se incorporó el tejido cortado en portaobjetos, “pescándolo” directamente del agua y procurando que el tejido completo de interés quede adherido a la placa.

Para la coloración del tejido, se colocaron las placas con tejido dentro de un puente de tinción, se desparafinaron con xilol (3min), se rehidrataron con soluciones de etanol a concentraciones decrecientes y se incorporó hematoxilina durante 30 segundos. Pasado este tiempo, se sumergió a las placas en agua corriente por 10 min y se deshidrató el tejido con etanol y xilol. Se realizó un montaje permanente en la placa con cubreobjetos y montante. Finalmente, se analizó la placa en un microscopio óptico con objetivo 40X para observar la integridad del tejido.

Procesamiento de datos y análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se tipió los valores obtenidos del conteo de espermatozoides en base a la integridad acrosomal, el movimiento y la morfología en hojas de Excel para obtener porcentajes para compararlos en gráficas de barras. Para la integridad acrosomal, se comparó los porcentajes de acrosomas íntegros observados en las muestras a $t = 0\text{h}$ y a $t = 4\text{h}$ enriquecidas en medio MEM y medio MEM + SFB respectivamente. Por otra parte, en cuanto a la motilidad se comparó el movimiento espermático reportado únicamente en el epidídimo a $t = 0\text{h}$ y $t = 4\text{h}$ enriquecido en medio MEM y medio MEM + SFB por observación directa al microscopio y sobre la base del porcentaje de espermatozoides móviles. Por último, se comparó los valores reportados de las diferentes morfologías espermáticas en $t = 0\text{h}$ y $t = 4\text{h}$ (MEM).

RESULTADOS

Integridad acrosomal

Para el análisis de la integridad acrosomal, se obtuvo el porcentaje de espermatozoides con acrosoma íntegro. Estos espermatozoides se obtuvieron del tejido testicular y epididimario bovino. De esta forma, se reportó los porcentajes de integridad acrosomal respectivos a $t = 0h$ (muestra espermática obtenida previo al enriquecimiento de los tejidos en medio MEM y MEM + SFB) y $t = 4h$ (muestra espermática obtenida luego del enriquecimiento de los tejidos en medio MEM y MEM + SFB).

En cuanto a los espermatozoides obtenidos del testículo y epidídimo analizados a $t = 0h$, se obtuvo un porcentaje de 96.15% y un porcentaje de 93.36% de integridad acrosomal respectivamente. Posteriormente, al incubar a estos tejidos en medio MEM por $t = 4h$, se obtuvo que el porcentaje de integridad acrosomal de los espermatozoides extraídos del testículo fue del 100% y de aquellos extraídos del epidídimo fue del 99.43%. Finalmente, cuando se añadió SFB al medio MEM en $t = 4h$, los porcentajes de integridad acrosomal disminuyeron. Así, el porcentaje de integridad acrosomal de los espermatozoides obtenidos del testículo fue de 92.31% y de los espermatozoides obtenidos del epidídimo fue de 94.20%.

Tabla 1. Porcentaje de integridad acrosomal espermática testicular y epididimaria a diferentes tiempos y condiciones

Tejidos a distintas condiciones	% integridad acrosomal
Testis (h0)	96,15% de acrosoma íntegro
Epidídimo (h0)	93,36% de acrosoma íntegro
Epidídimo MEM (h4)	100,00% de acrosoma íntegro
Testis MEM (h4)	99,43% de acrosoma íntegro
Testis MEM-SFB (h4)	92,31% de acrosoma íntegro
Epidídimo MEM-SFB (h4)	94,20% de acrosoma íntegro

Tomar en cuenta que las muestras espermáticas se analizaron en la hora 0 (h0) y hora 4 (h4).

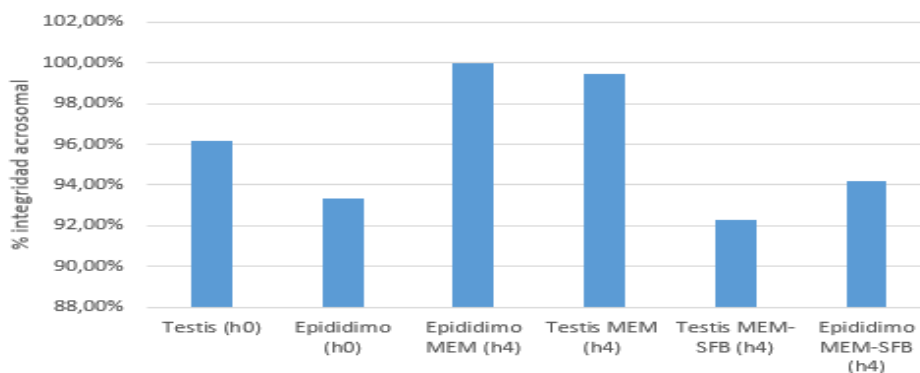


Figura 1. Porcentaje de integridad acrosomal espermática del tejido epididimario y testicular a diferentes condiciones y tiempos

Las barras indican el porcentaje obtenido de la integridad acrosomal espermática (eje vertical) a partir de diferentes tejidos y condiciones (eje horizontal). El porcentaje mayor de integridad acrosomal corresponde a los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo enriquecido con medio MEM durante 4 horas (h4). Este porcentaje fue del 100%.

Movimiento espermático

Para el análisis de motilidad espermática, se evaluó el porcentaje obtenido únicamente de los espermatozoides provenientes del epidídimo a $t = 0h$ y $t = 4h$ luego del enriquecimiento de los tejidos en medio MEM y MEM + SFB. Para la hora 0, se evaluó una muestra de tejido epididimario como control.

En cuanto a los espermatozoides obtenidos del epidídimo y analizados a $t = 0h$, se obtuvo un porcentaje de motilidad de 60.80%. Por otro lado, el porcentaje de motilidad espermática del tejido epididimario enriquecido en medio MEM a $t = 4h$ fue de 64.71% y el porcentaje de motilidad espermática proveniente del mismo tejido, pero enriquecido en medio MEM + SFB a $t = 4h$ fue de 51.04%.

Tabla 2. Porcentaje de motilidad de espermatozoides del epidídimo a diferentes tiempos y condiciones

Tejidos a distintas condiciones	% motilidad
Epidídimo (h0)	60,80% de movimiento
Epidídimo MEM (h4)	64,71% de movimiento
Epidídimo MEM-SFB (h4)	51,04% de movimiento

Tomar en cuenta que las muestras espermáticas se analizaron en la hora 0 (h0) y hora 4 (h4).

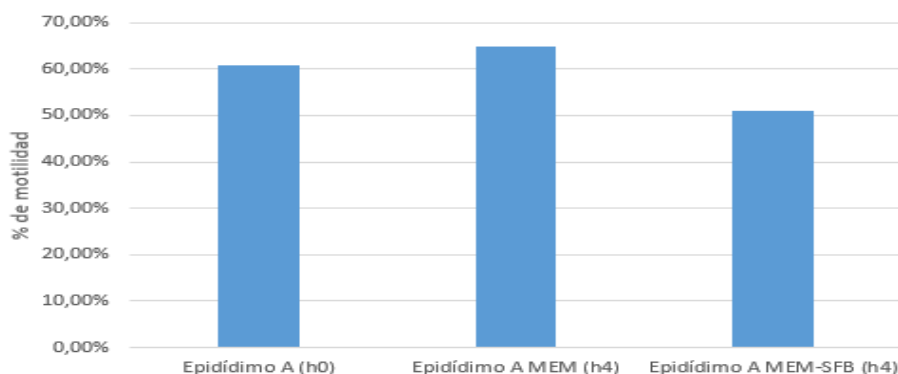


Figura 2. Porcentaje de motilidad espermática del tejido epididimario a diferentes condiciones y tiempos

La gráfica muestra el porcentaje exacto obtenido de la motilidad espermática (eje-y) a partir de diferentes tejidos y condiciones (eje-x). El porcentaje mayor de movimiento fue de 64.71%, correspondiente al epidídimo A enriquecido en medio MEM por 4h.

Morfología espermática

Se contabilizó la cantidad de espermatozoides epididimarios normales, con gotas citoplasmáticas distales, dobleces fuertes de la cola, cabezas desprendidas, defecto Dag y otras patologías observables en estos (Anexo C). Todo este conteo se realizó considerando $t = 0h$, $t = 4h$ (MEM) y $t = 4h$ (MEM + SFB). En total se contabilizó 100 espermatozoides en $t = 0h$ y $t = 4h$ (MEM). Sin embargo, para $t = 4h$ (MEM + SFB) se obtuvieron escasos espermatozoides, por lo cual fue necesario aumentar la cantidad de decimales en las cifras obtenidas de este conteo para que el total alcance los 100 espermatozoides y así comparar estas cifras con aquellas obtenidas en $t = 0h$ y $t = 4h$ (MEM).

Tabla 3. Morfología espermática del tejido epididimario o a diferentes tiempos y condiciones

Tipo de morfología espermática	t = 0h	t = 4h (MEM)	t = 4h (MEM + SFB)
Gotas citoplasmáticas distales	42	41	22.78481013
Dobles fuertes de la cola	14	2	5.063291139
Cabezas desprendidas	8	2	18.98734177
Defecto Dag	2	0	0
Patológico	16	22	26.58227848
Normal	18	33	26.58227848
Total	100	100	100

Tomar en cuenta que se aumentó la cantidad de decimales en t = 4h (MEM + SFB) para realizar la comparación.

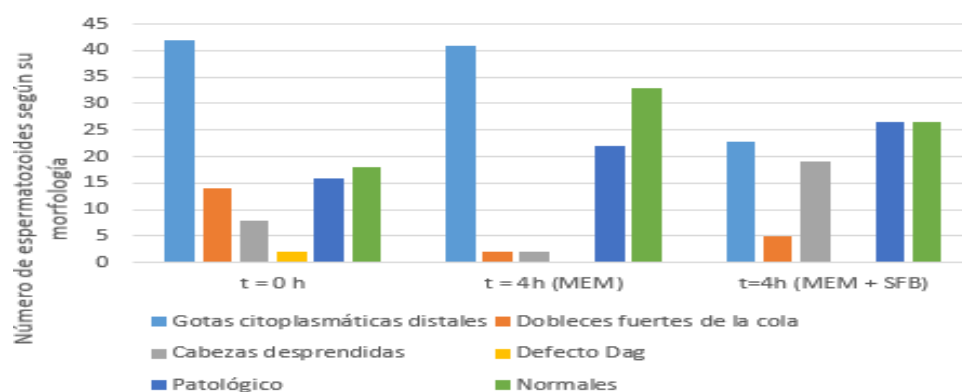


Figura 3. Comparación de morfología espermática a condiciones y tiempos diferentes de incubación

La gráfica mostró una mayor cantidad de espermatozoides normales y menor cantidad de patologías espermáticas (dobles fuertes de cola y cabezas desprendidas) en t = 4h (MEM).

Análisis histológico

El tejido testicular bovino fue analizado histológicamente luego de su inclusión en parafina, lo cual permitió analizar el tejido con mayor detalle. De esta forma, se observó que la morfología inicial del tejido estuvo normal (no se observó azoospermia).

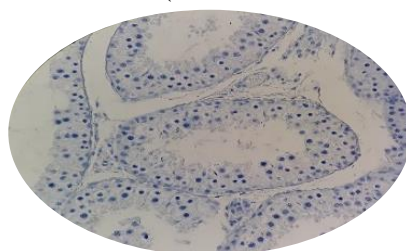


Figura 4. Corte histológico de la estructura del tejido testicular bovino teñido con hematoxilina

DISCUSIÓN

Para el estudio de la fertilidad y preservación de la línea germinal bovina, es importante considerar una serie de aspectos a nivel espermático. Este estudio se concentró en analizar la integridad acrosomal de espermatozoides bovinos y se complementó el estudio con el análisis de otros parámetros como la morfología y motilidad espermática. Es decir, que estos tres parámetros son factores que desempeñan un papel importante a la hora de la fecundación para que el espermatozoide pueda penetrar el óvulo (Roldán & Garde, 2004). Por ende, es imprescindible analizar estos parámetros básicos en muestras espermáticas bovinas.

Para definir la calidad de las muestras espermáticas tanto testiculares como epididimarias, se comenzó analizando microscópicamente la cantidad de espermatozoides que presentaron un acrosoma íntegro y una buena motilidad, luego de que los tejidos fueron sumergidos en medio MEM y MEM + 10% SFB a 4°C por 4 horas. Así, a partir de los resultados analizados, se observó que tanto la integridad acrosomal como el movimiento de los espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo, mantenido únicamente en medio MEM, presentaron porcentajes más altos en relación al otro tratamiento (MEM + 10% SFB).

Para determinar el porcentaje de motilidad, se consideró a los espermatozoides que tuvieron un movimiento progresivo, rectilíneo y rápido (Remacha, et al., 1998). Por otro lado, para determinar el porcentaje de integridad acrosomal se realizó el conteo de aquellos espermatozoides, cuya zona apical de la cabeza se tiñó de morado (Cabrera & Pantoja, 2012). De este modo, en base a un estudio similar, se consideró como una muestra espermática de alta calidad cuando el porcentaje de estos dos parámetros fue mayor o igual a 60%. Si el porcentaje fue menor a 60 % pero al menos del 30% en los dos parámetros, la muestra se consideró de calidad media. Por último, si la muestra presentó un porcentaje menor al 30 %, la misma se consideró de baja calidad (Martínez, et al., 2005). Por lo tanto, las muestras espermáticas

analizadas en el presente estudio en relación a la integridad acrosomal y motilidad, fueron de alta calidad, ya que el porcentaje obtenido fue del 100% y del 64.71%, respectivamente.

Por otro lado, el análisis de la morfología también fue fundamental para el análisis de estas muestras espermáticas. Por lo cual, se tomó en cuenta los distintos rangos descritos dentro del criterio estricto de la morfología de Kruger (Check, et al., 1992). Este criterio define que, si los espermatozoides no presentan una morfología normal, no se obtendrá un embrión viable. De esta forma, un porcentaje de 14% de espermatozoides normales o más significa que el rango morfológico es normal. Del 5% al 10% de espermatozoides normales significa que existe una disminución en la morfología y un porcentaje menor al 5% de espermatozoides normales se considera como una morfología pobre (Gimeno, 2015). Por lo tanto, en los resultados obtenidos se obtuvo que el mayor número de espermatozoides normales se observó de aquellos extraídos de la cola del epidídimo en medio MEM a $t = 4h$. Es decir que, 33 espermatozoides de los 100 espermatozoides analizados fueron normales, así, el 33% de estos presentó una morfología normal. Por lo cual según el rango de Kruger esta muestra entra dentro del rango morfológico normal. Sin embargo, es importante mencionar que también existen otros criterios para definir qué porcentaje de morfología espermática se considera como óptima. La OMS considera una morfología normal si este porcentaje es mayor o igual al 30% (Gimeno, 2015).

También se reportó las diferentes patologías observables en los espermatozoides en las dos condiciones evaluadas (MEM y MEM +10% SFB). Cada una de estas patologías encontradas se reportan en el Anexo C. Así, en la gráfica de morfología (figura 3) se observó una menor cantidad de patologías espermáticas en cuanto a dobleces fuertes de cola y cabezas desprendidas en $t = 4h$ (MEM). Sin embargo, estas patologías aumentaron y se encontraron otras nuevas (cabezas piriformes, colas dobladas, gotas proximales y cabezas sin acrosoma) al evaluar a los espermatozoides en el mismo rango de tiempo, pero en medio MEM + 10% SFB.

Por último, es importante mencionar que los valores obtenidos de las diferentes morfologías espermáticas en $t = 4h$ (MEM + 10% SFB), pueden estar sujetas a un rango de error debido a los pocos espermatozoides contabilizados en el microscopio, los cuales no llegaron a 100 espermatozoides como los otros aspectos espermáticos analizados en este estudio.

El medio MEM proporcionó condiciones óptimas para el mantenimiento tanto de la integridad acrosomal, motilidad y una buena morfología. Este medio al estar constituido por una serie de componentes nutricionales como 13 aminoácidos, 6 sales y 8 vitaminas (Arora, 2013), seguramente ayudó a mantener un crecimiento celular óptimo de las células espermatogoniales; las cuales dieron origen a una mayor cantidad de espermatozoides normales cuando el tejido de la cola epididimaria fue incubada en medio MEM a $4^{\circ}C$ por 4 horas. Por ende, para futuras investigaciones también se podría utilizar la modificación alfa de este medio MEM, la cual cuenta con vitaminas adicionales, piruvato de sodio y ciertos aminoácidos no esenciales (Noda, et al., 1994), modificaciones que podrían brindar mayor estabilidad a la membrana acrosomal y mantener una buena morfología y motilidad espermática.

Sin embargo, en los resultados reportados, cuando los tejidos fueron conservados en medio MEM + 10% de SFB, los porcentajes tanto de integridad acrosomal, motilidad y morfología disminuyeron. Es decir, estos porcentajes reportados estuvieron por debajo del rango óptimo especificado previamente para cada uno de los aspectos espermáticos analizados.

A pesar de que el suero fetal bovino presenta una serie de factores de crecimiento, nutricionales y macromoléculas esenciales para promover y mantener un buen crecimiento celular (Johnson, 2012), en investigaciones previas se ha reportado que el SFB genera un efecto inhibitorio en el desarrollo y diferenciación de células reproductivas. Actualmente, existe un debate sobre su uso para cultivo celular o para mantener óptimo el desarrollo y diferenciación de múltiples células dada la posible introducción de ciertos elementos inhibitorios que este

puede acarrear, influyendo sobre el desarrollo normal de estas células. De igual forma se cree que el uso de este componente nutricional puede llegar a generar contaminación en muestras celulares debido a su origen biológico y de producción (Simancas & Diaz, 2019). La sangre fetal extraída de los fetos bovinos se utiliza para la producción de este SFB, donde dicha sangre se recoge bajo condiciones asépticas a través de la perforación del corazón del feto, involucrando la manipulación del mismo. Sin embargo, dicha manipulación puede acarrear problemas o alteraciones en la composición normal del SFB, provocando un riesgo de contaminación cuando el mismo se utilizado para cultivo celular (Simancas & Diaz, 2019). Por lo tanto, es probable que el uso de este suero haya inhibido la formación normal de las células espermatogoniales. Igualmente, pudo contaminar las muestras usadas, lo que generó suspensiones espermáticas con mayor cantidad de defectos en este estudio.

Por último, también se reportó que los espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo presentaron mejor integridad acrosomal, morfología y motilidad. Esto se debe a que mediante movimientos peristálticos de los tubos que los contienen, los espermatozoides son movilizados desde la *rete testis* hacia los conductos eferentes para llegar al epidídimo donde se almacenan dentro de la cola epididimaria para adquirir su movilidad y definir su estructura para la posterior fecundación del óvulo. De igual forma, dentro del testículo se produce la espermiogénesis; la cual da paso a la formación del acrosoma, organelo que ayuda al espermatozoide a fecundar al ovulo. Es así que, cuando recién se producen los espermatozoides dentro del testículo, los mismos presentan escasa motilidad y poca madurez acrosomal y morfológica (Olivera, et al., 2006). Por lo tanto, la integridad acrosomal, morfología y movimiento espermático fue poco óptimo cuando los espermatozoides fueron extraídos de este órgano, a pesar de que el tejido testicular se haya encontrado normal y sin azoospermia (escasez espermática) luego de realizar el análisis histológico del mismo como se observó en los resultados obtenidos en este estudio.

CONCLUSIONES

El análisis histológico, mostró que el tejido testicular fue normal. Es decir, que tanto los túbulos seminíferos como el tejido intersticial no presentaron ninguna anomalía observable al comenzar los experimentos. Por ende, las muestras testiculares obtenidas del Camal Metropolitano de Quito fueron las adecuadas para extraer el líquido espermático a partir de ellas y luego llevar a cabo el análisis tanto de la integridad acrosomal, motilidad y morfología de los espermatozoides, luego de añadir los medios de enriquecimiento MEM y MEM + 10% de SFB a los tejidos.

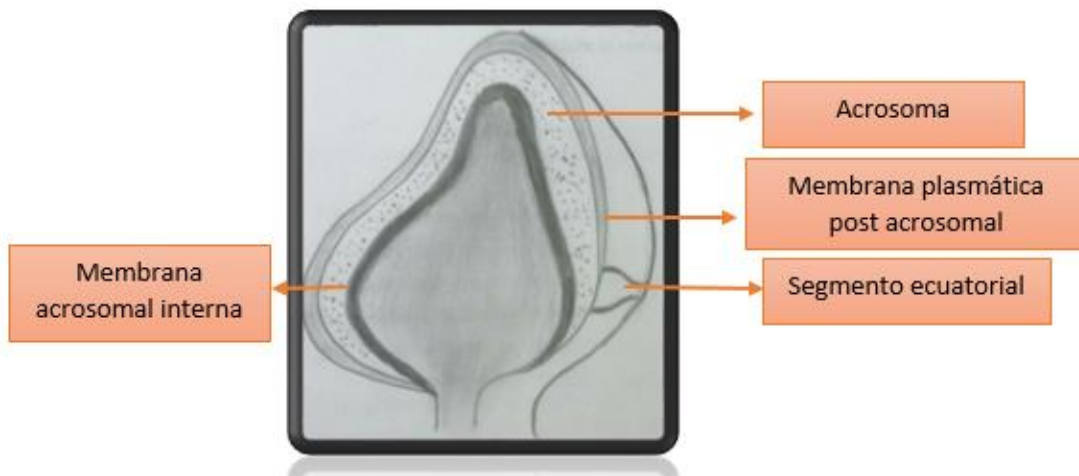
Así, las muestras de líquido espermático obtenidas de la cola del epidídimo bovino, mostraron contener a espermatozoides con una buena integridad acrosomal, motilidad y morfología bajo el mantenimiento de dicho tejido en medio MEM a 4°C por 4 h. De igual forma, hubo menor cantidad de patologías reportadas en la morfología espermática en cuanto a dobleces fuertes de la cola y cabezas despedidas bajo estas mismas condiciones. Por otro lado, estos mismos parámetros analizados en los espermatozoides decayeron al añadir SFB al medio MEM y hubo mayor cantidad de patologías en los mismos, como cabezas piriformes, colas dobladas, gotas proximales y cabezas sin acrosoma.

Por ende, el aportar nutrientes al tejido testicular y epididimario a través de la inclusión de medios de cultivo enriquecidos, se promovió el mantenimiento de estos tres parámetros evaluados en los espermatozoides bovino (integridad acrosomal, motilidad y morfología). Aspectos que son de importancia esencial para asegurar una buena fertilidad en estos animales. De este modo, llevar a cabo este estudio fue de vital importancia para identificar la influencia de estos medios de enriquecimiento sobre el estado de los espermatozoides y así servir de base para futuras investigaciones donde se desee preservar la línea germinal bovina orientada a diversas aplicaciones dentro de la industria ganadera.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Lichtman, A. & Shiv Pillai. 2015. *Inmunología Celular y Molecular*, 8va. ed. Barcelona: Elsevier.
- Alba, J. D. (1964). *Reproducción y genética animal* (No. 591.15 Al131r Ej. 1). SIC.
- Arora, M. (2013). *Medios de cultivo celular: una revisión*. Pittsburgh : University of Pittsburgh Medical Center, United States.
- Benítez-González, E., Chamba-Ochoa, H., Sánchez-Sánchez, E., Luzón-Cevallos, F., & Sánchez-Carrillo, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico veterinario*, 8(1), 59-74.
- Bettencourt, E. M. V., Tilman, M., Narciso, V., Carvalho, M. L. D. S., & Henriques, P. D. D. S. (2015). The livestock roles in the wellbeing of rural communities of Timor-Leste. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 53, 63-80.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200.
- Cánovas, S., & Coy, P. (2008). Aspectos moleculares de la fecundación: unión y fusión de gametos. *Revista de Investigación Clínica*, 60(5), 403-413.
- Check, J. H., Adelson, H. G., Schubert, B. R., & Bollendorf, A. (1992). Evaluation of sperm morphology using Kruger's strict criteria. *Archives of andrology*, 28(1), 15-17.
- Ernesto, J. I. (2012). *Caracterización de distintos miembros de la familia de proteínas CAP en tracto reproductor masculino y femenino y su participación en el proceso de fertilización* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Fonseca, D. M. S., Manosalva, V. A., & Vargas, E. P. (2011). Importancia de la cría de bovinos en la seguridad alimentaria de familias del área rural de Paipa, Boyacá. *RIAA*, 2(1), 65-74.
- Gimeno Miquel, I. M. (2015). *Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos* (Doctoral dissertation).
- Helleman, C., & Jara, C. (1997). Efecto de un surfactante sobre la integridad de espermatozoides ovinos crioconservados. *Archivos de medicina veterinaria*, 29(1), 153-160.
- Instituto Bernabeu. (2020). *Técnicas de obtención de espermatozoides-Biopsia y punción testicular*. España: Medicina Reproductiva.
- Johnson, M. (2012). *Fetal Bovine Serum*. New Jersey: Syntom Research, Princeton.
- Kruger, T. F., Acosta, A. A., Simmons, K. F., Swanson, R. J., Matta, J. F., & Oehninger, S. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 49(1), 112-117.

- Manosalva, P., Cortés, C., Leyva, V., Valdivia, C., De los Reyes, S., Barros, R., & Moreno, M. (2005). Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 16(2), 114-128.
- Martínez-Pastor, F., Guerra, C., Kaabi, M., Diaz, A. R., Anel, E., Herraéz, P., & Anel, L. (2005). Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*, 63(1), 24-40.
- Maya, C., & Walter, D. (2017). Morfología espermática: comparación de las observaciones realizadas por 10 expertos. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 82(2), 110-114.
- Montoya, A. I. T. (2009). Espermograma. *Medicina & laboratorio*, 15(03-04), 145-169.
- Noda, Y., Goto, Y., Umaoka, Y., Shiotani, M., Nakayama, T., & Mori, T. (1994). Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. *Fertility and sterility*, 62(5), 1022-1027.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.
- Perea-Sasiaín, J. (2003). Cien años del colorante de Giemsa. *Biomédica*, 23(1), 5-18.
- Remacha, A. P., Gadea, J., Ruiz, S., & Ramón, B. P. (1998). Estudios preliminares en la criopreservación de espermatozoides porcinos de raza Chato Murciano. *Archivos de zootecnia*, 47(178), 305-310.
- Reiriz, J. (s.f.). *Sistema reproductor masculino: Anatomía*. Barcelona : Infermera Virtual.
- Roldán, E. R., & Garde, J. J. (2004). 14. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción.
- Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., & Villalobos, D. M. G. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*, 19(4), 382-389.
- Simancas-Escorcia, V., & Diaz-Caballero, A. (2019). Impacto de la concentración de suero fetal bovino sobre las células epiteliales dentales. *Entramado*, 15(1), 276-284.
- UICN. (2019). *Más de 28000 especies están en peligro de extinción*. Fontainebleau, Francia: MONGABAY.
- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 130-140.

ANEXO A: REGIONES PRINCIPALES DEL ACROSOMA

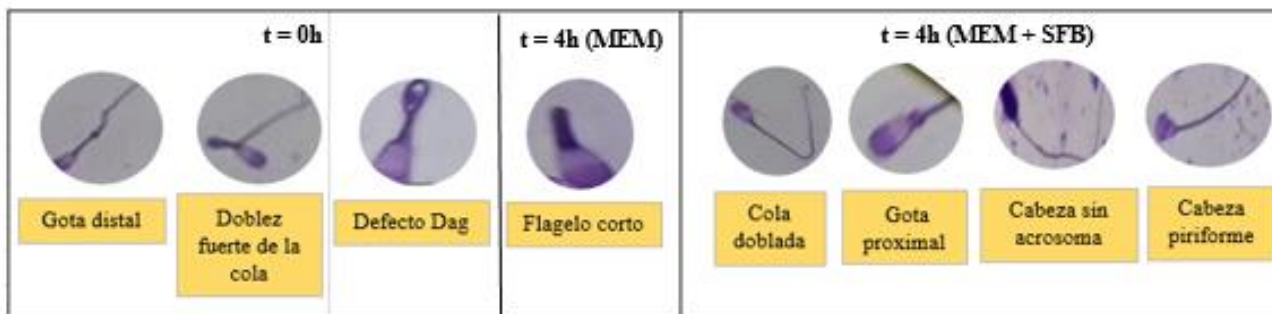
Fuente: Imagen adaptada de Ernesto, 2012

Leyenda 1: En la imagen se aprecia las tres regiones principales de un acrosoma espermático, constituido por una zona acrosomal interna, una zona post-acrosomal y el segmento ecuatorial.

ANEXO B: MUESTRAS TESTICULARES PREVIO AL PROCESAMIENTO

Leyenda 2: En la imagen se aprecia el eje de referencia utilizado (regla) para medir el tamaño de los testículos bovinos previo a su procesamiento a través del programa morfométrico ImageJ.

ANEXO C: PATOLOGÍAS MÁS SIGNIFICATIVAS ENCONTRADAS EN LOS ESPERMATOOZIDES BAJO DIFERENTES CONDICIONES



Leyenda 3: En la imagen se aprecia las patologías espermáticas más destacadas, observadas al microscopio con aumento 400 X en base a las diferentes condiciones y tiempos analizados.