

Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico

Enrique Dupré & Carlos Espinoza
Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar
Universidad Católica del Norte, Casilla 117, Coquimbo, Chile

RESUMEN. El congelamiento de espermatozoides es una técnica utilizada en acuicultura que permite almacenar los excedentes que fueron obtenidos durante la época reproductiva, para utilizarlos posteriormente. El proceso de criopreservación, requiere disminuir la temperatura gradualmente y de manera controlada para minimizar los daños ocasionados por el choque osmótico o por formación de cristales de hielo, lo cual es difícil lograr en terreno donde no se dispone de un equipo automático para realizarlo. Este estudio presenta un dispositivo manual portátil que permite descender gradualmente la temperatura, permitiendo repetir en forma exacta cada uno de los protocolos cada vez que se requiera. El equipo consta de un termo Dewar para nitrógeno líquido, un sistema de poleas graduadas, una placa porta-muestras de acrílico y un termómetro para bajas temperaturas. Para verificar su eficiencia, se procedió a criopreservar trozos de la parte masculina de la gónada de *Argopecten purpuratus* a diferentes tasas de congelamiento (1,1; 2,2; 4,6; 6,5; 8,8; 12,9; 19,2; 32,2 y 96,5°C·min⁻¹). Se utilizó una solución crioprotectora compuesta por leche descremada liofilizada, ME₂SO y sucrosa a una tasa de descongelamiento de 573°C·min⁻¹. La tasa óptima de congelamiento fue de 8,8°C·min⁻¹, con la cual se obtuvo 51,3 ± 6,6% de espermatozoides móviles. El congelador mecánico mostró ser eficiente para la criopreservación de espermatozoides de *A. purpuratus* a diferentes tasas de congelamiento, ya que permitió regular el descenso de las muestras en los vapores de nitrógeno líquido a diferentes velocidades.

Palabras clave: espermatozoide, criopreservación, ostión, *Argopecten purpuratus*, congelador mecánico.

Freezing of spermatozoa of the scallop *Argopecten purpuratus* using a mechanical freezing system

ABSTRACT. The freezing of spermatozoa is a technique used in aquaculture which permits the storage of excess spermatozoa from natural or induced spawning, and saves them for use in subsequent procedures. The cryopreservation process requires gradual, controlled lowering of temperature in order to reduce osmotic shock injury or ice crystal formation in the cells. This is difficult to accomplish in the field, where appropriate automatic equipment is not available. This study describes a portable manually operated device usable for accurately repeating required freezing protocols. The device includes a Dewar container for liquid nitrogen, a system of graduated pulleys, an acrylic sample carrier, and a low temperature thermocouple. To test the freezing system, pieces of male gonad of the scallop *Argopecten purpuratus* were frozen at different rates (1.1, 2.2, 4.6, 6.5, 8.8, 12.9, 19.2, 32.2 and 96.5°C·min⁻¹). The cryoprotective mixture used was composed of lyophilized skim milk, ME₂SO, and sucrose, with a thawing rate of 573°C·min⁻¹. The optimum freezing rate was 8.8°C·min⁻¹, obtaining 51.3 ± 6.6% motile sperm. The mechanical freezer was efficient in cryopreservation of *A. purpuratus* spermatozoa at different freezing rates, since it permitted regulation of the lowering of the samples into the liquid nitrogen vapor at different speeds.

Key words: spermatozoa, cryopreservation, scallop, *Argopecten purpuratus*, mechanical freezer.

INTRODUCCIÓN

La formación de centros de cultivo de moluscos bivalvos se ha incrementado en Chile durante los últimos años, debido a las buenas perspectivas de comercialización nacional e internacional y en gran medida a la disminución de la existencia de bancos naturales, teniendo como principal objetivo obtener una producción a gran escala durante todo el año. En consecuencia, se han estado desarrollando metodologías como la criopreservación que permiten mantener en nitrógeno líquido embriones y gametos por largos períodos de tiempo para ser utilizados en cualquier momento y lugar. La inclusión de las técnicas de criopreservación en un hatchery (Caffey & Tiersch, 2000) permitiría un mejor aprovechamiento de los gametos con la consiguiente reducción de costos de producción, o bien evitar el problema que se presenta al utilizar reproductores pertenecientes a cepas con diferentes épocas de desove y maduración sexual. Por otro lado, permitiría la creación de bancos de espermatozoides para establecer programas de selección genética (Lubzens *et al.*, 1997).

El congelamiento de células vivas es un proceso que requiere disminuir la temperatura gradualmente y de manera controlada para minimizar los daños ocasionados por choque osmótico o por formación de cristales de hielo.

Usualmente las criopreservaciones se realizan por medio de máquinas automáticas o manuales, utilizando congelaciones rápidas, en las cuales se ubican las muestras a diferentes distancias por encima de la superficie del nitrógeno líquido, lo cual no permite controlar tasas lentas de congelamiento que podrían ocasionar menores daños a determinadas células (Mazur *et al.*, 1972). Es por esto, la necesidad de disponer de un dispositivo o equipo que permita regular adecuadamente el descenso de la temperatura y poder así repetir de manera exacta cada una de las pruebas cada vez que se requiera. Por este motivo se probó la utilización de un congelador mecánico, de bajo costo, construido en el laboratorio que permite controlar diferentes tasas de congelamiento. A fin de determinar la eficiencia de dicho dispositivo y su procedimiento, se utilizó espermatozoides contenidos en trozos de gónada del ostión del norte, *Argopecten purpuratus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron ostiones maduros en la bahía La He-

radura (29°59'S, 71°15'W), Chile y se ubicaron en estanques de 500 L para su acondicionamiento por un período de 7 días. Luego se extrajo la porción masculina de la gónada y se cortó en trozos de 5 mm que fueron colocados en una placa petri conteniendo 6 mL de agua de mar microfiltrada y esterilizada con luz ultravioleta (AMFE) durante 10 min a temperatura de 3,5°C.

Como solución crioprotectora (SC) se utilizó una solución en agua destilada conteniendo los siguientes compuestos: 10% ME₂SO (dimetil sulfóxido) (v/v), 125 mM sucrosa y 10% de leche descremada liofilizada (p/v). Una vez preparada la solución, se procedió a centrifugarla a 1000 rpm durante 10 min, luego se separó el sobrenadante y se almacenó a 5°C hasta su posterior uso. El pH de esta solución a 3°C fue de 7,01.

El aparato de congelación diseñado consta de un termo de nitrógeno líquido de boca ancha de 5 L de capacidad y una polea graduada que permite regular el movimiento de una placa porta-muestras que tiene un disco de acrílico, del mismo diámetro de la boca del termo de nitrógeno líquido, con perforaciones donde se ubican 10 tubos eppendorf de 1,5 mL que contendrán las muestras a congelar. La polea se marcó con divisiones de 1 mm para poder determinar las velocidades de descenso en div·min⁻¹, las cuales se transformaron a tasas de congelamiento en °C·min⁻¹. Antes de cada congelamiento el termo fue llenado con 700 mL de nitrógeno líquido y mantenido cerrado durante 20 min para que la temperatura se estabilice.

En la placa porta-muestras del congelador se colocaron tubos eppendorf con 1 mL de SC y se mantuvieron a una temperatura de 3,5°C. Luego se agregó a cada tubo un trozo de la porción testicular y se mantuvo a esa temperatura por 5 min antes de iniciar el congelamiento (tiempo de equilibrio). Seguidamente, se introdujo lentamente en el termo la placa de acrílico portando las muestras, a velocidad constante, hasta llegar a 2 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido donde permanecieron 5 min y luego se introdujeron completamente en el nitrógeno líquido. De esta manera se evaluaron tasas de congelamiento de 1,1; 2,2; 4,6; 6,5; 8,8; 12,9; 19,2; 32,2 y 96,5°C·min⁻¹. Luego, las muestras fueron transferidas y almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido de 35 L de capacidad.

Después de 24 h cada uno de los tubos conteniendo las muestras fue descongelado, retirándolo del tanque de nitrógeno líquido y sumergiéndolo

inmediatamente en un vaso precipitado de 1 L conteniendo agua de mar a 50°C durante 20 s y luego en otro a temperatura ambiente, hasta que se descongelaron completamente.

Una vez descongeladas, las muestras se vaciaron en una placa petri con 10 mL de AMFE. Luego de 10 min se evaluó la motilidad de los espermatozoides bajo microscopía de luz con 200 aumentos. La motilidad se clasificó en tres tipos: motilidad 1: espermatozoides con desplazamiento y movimiento flagelar lentos, motilidad 2: espermatozoides con desplazamiento circular, y motilidad 3: espermatozoides con movimiento rápido hacia delante. Como control se determinó la motilidad espermática antes de iniciar cada uno de los tratamientos con diferentes tasas de congelación. Los porcentajes de motilidad graficados corresponden a la motilidad relativa respecto a la motilidad de cada uno de los controles mencionados anteriormente.

Debido a que los procesos físicos, químicos y biológicos del congelamiento celular ocurren entre -15 y -60°C (Mazur, 1984), se consideró para el cálculo de las tasas de congelamiento solamente las tasas entre 3,5°C (momento en que se realizó el equilibrio) y -100°C; por lo cual, se gráfico los descensos de la temperatura sólo en dicho rango. Luego, se obtuvieron las ecuaciones de mejor ajuste a los

datos obtenidos para cada velocidad de descenso ($\text{div}\cdot\text{min}^{-1}$), en las cuales las pendientes de cada una de ellas corresponden a la tasa de congelamiento en $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Finalmente, se gráfico cada velocidad de descenso contra su tasa de congelamiento, obteniéndose una ecuación mediante regresión lineal, que permita ubicar la velocidad de descenso necesaria para la tasa de congelamiento deseada.

RESULTADOS

Tasas de congelamiento

Al graficar los puntos de temperatura contra el tiempo para cada velocidad de descenso de las muestras, se observó que las temperaturas descienden constantemente hasta aproximadamente -100°C, después del cual lo hacen con mayor velocidad (Fig. 1), observándose una tendencia lineal en este rango. Las ecuaciones de cada recta se muestran en la figura 2, donde la pendiente de cada una corresponde a la tasa de congelamiento. Dichas tasas de congelamiento con sus correspondientes velocidades de descenso de la placa, se graficaron y se obtuvo una tendencia lineal cuya ecuación permite obtener la velocidad de descenso en $\text{div}\cdot\text{min}^{-1}$ para cada tasa de congelamiento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

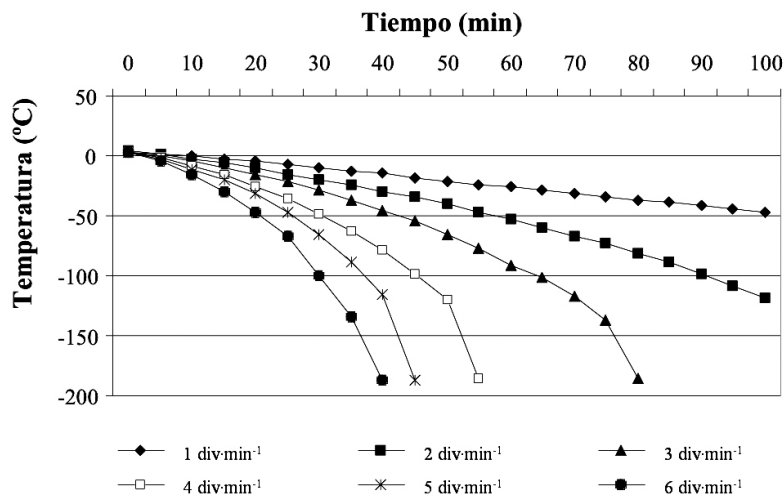


Figura 1. Curva de congelamiento para diferentes velocidades de descenso de la placa porta-muestras dentro del termo con nitrógeno líquido.

Figure 1. Freezing curve for different speed of the sample-plate descending into the liquid nitrogen tank.

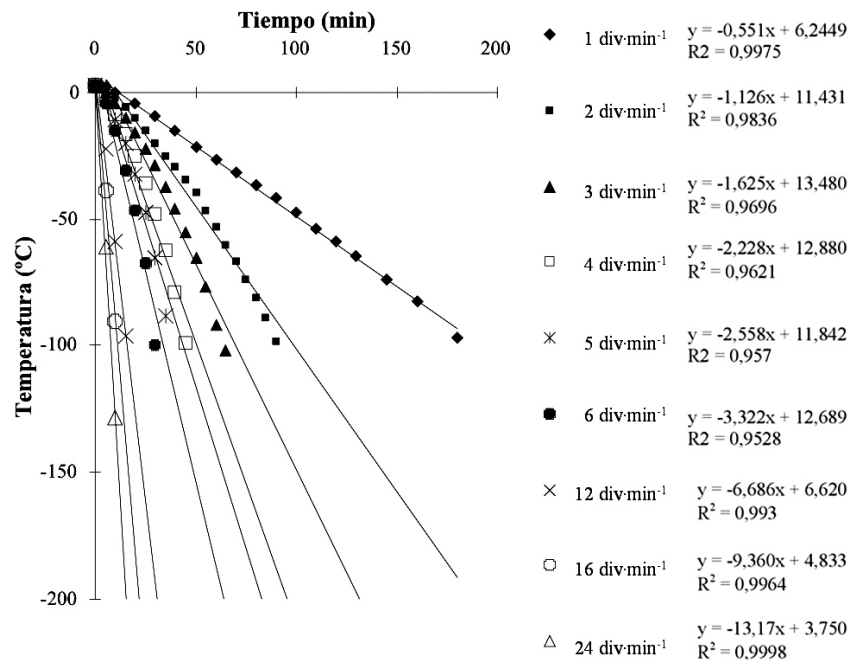


Figura 2. Líneas de mejor ajuste para diferentes tasas de descenso ($\text{div}\cdot\text{min}^{-1}$) de la placa porta-muestras obtenidas con del equipo mecánico de congelación, entre 3,5 y -100°C . A la derecha se indican las ecuaciones de cada una de las rectas obtenidas. La pendiente de cada recta indica la tasa de congelamiento ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) obtenida para cada velocidad utilizada.

Figure 2. Best fit line for different descending rates ($\text{div}\cdot\text{min}^{-1}$) of the sample-plate obtained with mechanical freezer system between 3.5 and -100°C . The equations of each tendency line are showed at the side. The slope shows the freezing rate ($^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) used.

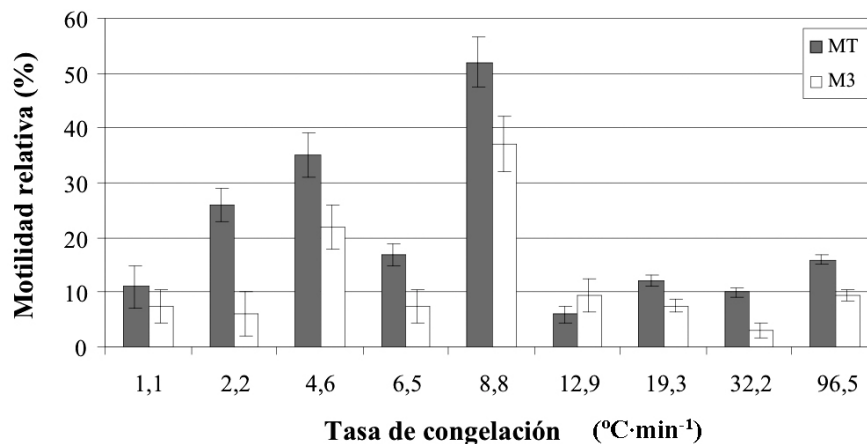


Figura 3. Porcentaje relativo a su respectivo control de la motilidad total y motilidad 3 de espermatozoides post descongelamiento y diluidos en AMFE. Las barras indican el error standard. TM: motilidad total; M3: Motilidad tipo 3.

Figure 3. Percentage of total and type 3 motility respect to each control of post-thawing and diluted sperm in sea water. The vertical bar shows the standard error. MT: total motility, M3: type 3 motility.

Motilidad espermática

En todos los casos, la motilidad espermática post-descongelamiento fue significativamente menor que la de su respectivo control ($p < 0,05$), los cuales variaron entre 39,4% y 55,8% con un promedio de $45,4 \pm 4,5\%$. La figura 3 muestra los porcentajes de motilidad total y la motilidad 3 para cada tasa de congelamiento, encontrándose diferencias significativas entre las motilidades de los diferentes tratamientos ($p < 0,05$). Los valores máximos de motilidad total ($51,3 \pm 6,6\%$) y motilidad 3 ($36,6 \pm 5,1\%$) se obtuvieron con una tasa de congelamiento de $8,8^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Se obtuvo mayores porcentajes de motilidad espermática con tasas bajas de congelación (entre $2,2$ y $6,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), respecto a los porcentajes obtenidos a tasas mayores ($12,9$ a $96,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$). Los porcentajes de motilidad total aumentaron cuando las tasas aumentaron de $1,1$ a $8,8^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y luego se observó una disminución de los porcentajes desde $8,8$ a $96,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 4).

Cuando se realizó la congelación a una tasa de $6,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ se observó una disminución de los porcentajes de motilidad total y motilidad 1 respecto a las tasas de $4,6$ y $8,8^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 4).

DISCUSIÓN

El congelador mecánico mostró ser eficiente para la regulación de las tasas de congelación, ya que se lograron tasas intermedias entre $1,1$ y $96,5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ demostrando que existe variación significativamente diferente entre los porcentajes de motilidad espermática a las distintas tasas de congelación.

Las tasas de congelamiento fueron mantenidas constantes desde el tiempo de equilibrio hasta -100°C , ya que Mazur *et al.* (1972) afirman que variando la temperatura de transferencia al nitrógeno líquido desde -70 a -100°C no se produce efectos en los porcentajes de supervivencia. Además, Jeyalectumie & Subramoniam (1989) y Young *et al.* (1992) mencionan que no es recomendable la inmersión inmediata de las muestras en nitrógeno líquido sino luego de un determinado tiempo, porque de lo contrario se reduciría la viabilidad de los espermatozoides.

La distribución en forma de campana que presenta la curva de motilidad con respecto a la tasa de congelamiento, con un óptimo de $8,8^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 3), similares a las obtenidas por Chao *et al.* (1997) y Ohta *et al.* (2001), sugiere que a tasas mayores existiría una mayor probabilidad de formación de

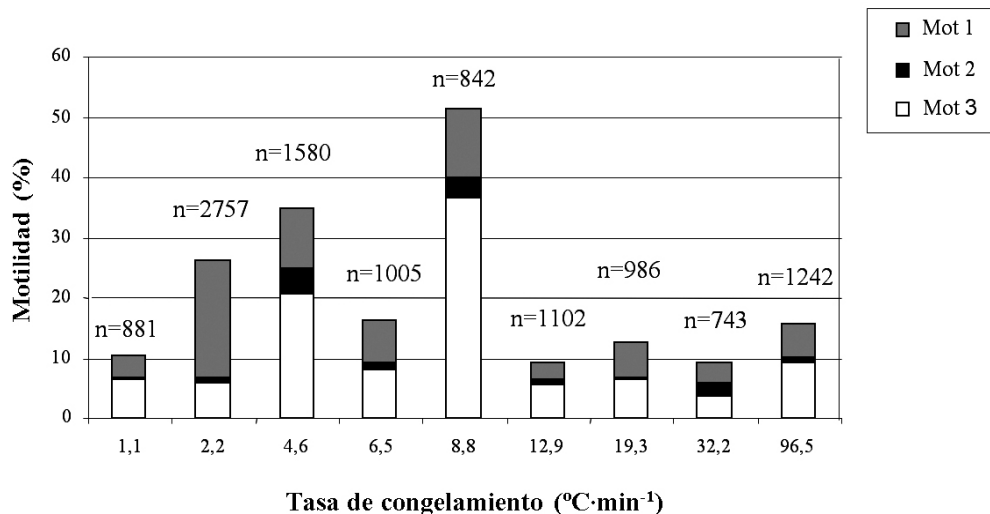


Figura 4. Motilidad espermática post-descongelación y dilución en agua de mar después de haberlos sometido a diferentes tasas de congelamiento. N: número total de espermatozoides contados por tratamiento. Mot 1: Motilidad tipo 1, Mot 2: Motilidad tipo 2, Mot 3: Motilidad tipo 3.

Figure 4. Post-thawing sperm motility after to submit them to different freezing rates. N: Total sperm counted. Mot 1: Type 1 motility, Mot 2: Type 2 motility, Mot 3: Type 3 motility.

cristales intracelulares que afectan las estructuras espermáticas (Mazur, 1977), lo cual se podría deber a la poca deshidratación de la célula o insuficiente intercambio entre agua y crioprotector intra y extra celular, antes de comenzar a producirse hielo tanto extra como intracelular. Esta situación es menos probable que ocurra a tasas bajas de congelación, pues a esas tasas la célula tiene mayor tiempo para el reemplazo de moléculas de agua por las del crioprotector intracelularmente, lo cual protegería a la célula si se produjera hielo intracelular (Mazur & Koshimoto, 2002). Sin embargo, con tiempos más prolongados de deshidratación o tasas más lentas de congelación, existiría una tendencia a deshidratar en exceso los espermatozoides generando el arrugamiento de la membrana plasmática y su consiguiente ruptura, además de la formación de cristales de hielo extracelular de gran tamaño y en altas cantidades. La tasa de $8,8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ permitiría un intercambio de líquidos permeables a través de la membrana más adecuado que las otras tasas evaluadas.

Aun cuando se observó una motilidad mayor con una tasa de $8,8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, y valores menores con tasas más lentas o más rápidas que aquella, hay una tendencia a que las velocidades lentas permitan motilidades post-descongelamiento mayores que las velocidades rápidas (Fig. 3). Esto sugiere que la permeabilidad de la membrana del espermatozoide de ostión, al crioprotector y al agua es baja, y por lo tanto, se requiere de un mayor tiempo para que las soluciones intra y extracelular se equilibren, hecho que no sucede si el congelamiento es rápido ya que conllevarían al inmediato congelamiento intracelular, la célula no va a tener tiempo de perder líquidos para igualar las concentraciones intra y extracelular, y se formaría mayor cantidad de centros de nucleación y cristales pequeños de hielo, los cuales pueden crecer durante el descongelamiento, en un proceso llamado recristalización (Rana, 1995).

Los espermatozoides de *A. purpuratus* son muy sensibles cuando la tasa de congelamiento supera $8,8^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, valor muy bajo comparado con las óptimas para especies como el ratón (Mazur & Koshimoto, 2002; Koshimoto & Mazur, 2002) donde el hielo intracelular se estaría formando a tasas cercanas a los $2.000^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ aunque la motilidad espermática empieza a decaer drásticamente a tasas de $200^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Esta diferencia es debida a la distinta permeabilidad de las membranas de ambos espermatozoides. Por tanto, la probabilidad que se formen cristales grandes o pequeños depende de la

velocidad de congelamiento y los procesos de osmosis; los cuales están determinados por la permeabilidad de la membrana al agua y al crioprotector.

La función que cumplirían las moléculas del crioprotector en todo este proceso, posiblemente sería la de adsorberse a la periferia de los cristales de hielo, uniéndose a ellos quizá mediante puentes de hidrógeno e impidiendo que más moléculas de agua lo hagan; de una forma similar a lo que proponen Eastman & De Vries (1987), y Zachariassen & Kristiansen (2000) para las proteínas anticongelantes en organismos ectotérmicos que soportan temperaturas inferiores al punto de congelamiento de sus fluidos orgánicos.

Los bajos porcentajes de motilidad 2 (Fig. 4), permiten sugerir que el proceso de criopreservación esta influyendo principalmente sobre las estructuras relacionadas con la motilidad, esto es, flagelos y mitocondrias ya que en todas las tasas de congelación, los porcentajes de motilidad 1 son mayores que los de motilidad 2. Esto señala que cuando se produce daño éste es tan drástico que no permite estados intermedios. Sin embargo, respecto a las estructuras relacionadas con la fecundación como es el acrosoma y membranas relacionadas, no es posible sugerir nada ya que para ello es necesario realizar experimentos de fecundación *in vitro* con espermatozoides post-descongelados, y análisis morfológicos y ultraestructurales por microscopía.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado parcialmente por la Dirección General de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Católica del Norte (DGICT-UCN 2000). Especiales agradecimientos para los doctores Malcom Smith y Ramón Gálvez del Observatorio Astronómico de Cerro Tololo (AURA) por su constante apoyo a nuestros proyectos de criopreservación.

REFERENCIAS

- Caffey, R.H. & T.R. Tiersch. 2000. Cost analysis for integrating cryopreservation into an existing fish hatchery. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 51-58.
- Chao, N.H., T.T. Lin, Y.J. Chen, H.W. Hsu & I.C. Liao. 1997. Cryopreservation of late embryos and

- early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, 155: 31-44.
- Eastman, J. & A. De Vries. 1987.** Peces antárticos. *Investigación y Ciencia*, 124: 60-68.
- Jeyalectumie, C. & T. Subramoniam. 1989.** Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol. Bull.*, 177: 247-253.
- Koshimoto, C. & P. Mazur. 2002.** Effects of cooling and warming rate to and from -70°C, and effect of further cooling from -70 to -196°C on the motility of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 66: 1477-1484.
- Lunbzens, E., N. Daube, I. Pekarsky, Y. Magunus, A. Cohen, F. Yusefovich & P. Feigin. 1997.** Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks: strategies in research and application. *Aquaculture*, 155: 13-30.
- Mazur, P. 1977.** The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14: 251-272.
- Mazur, P. 1984.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.*, 247: 125-142.
- Mazur, P. & C. Koshimoto. 2002.** Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm at high cooling rates? *Biol. Reprod.*, 66: 1485-1490.
- Mazur, P., P. Leibo & E.H. Chu. 1972.** A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.*, 71: 345-355.
- Ohta, H., K. Kawamura, T. Unuma & Y. Takegoshi. 2001.** Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. *J. Fish Biol.*, 58: 670-681.
- Rana, K. 1995.** Preservation of gametes. En: N.R. Bromage & R.J. Roberts (eds.). *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell, Oxford, pp. 53-75.
- Young, J.A., M.F. Capra & A.W. Blackshaw. 1992.** Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. *Aquaculture*, 102: 155-160.
- Zachariassen, K.E. & E. Kristiansen. 2000.** Ice nucleation and antinucleation in nature. *Cryobiology*, 41: 257-279.

Recibido: 1 septiembre 2003; Aceptado: 8 junio 2004