

*Nota Científica*

## Viabilidad de espermatozoides criopreservados de macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia)

Enrique Dupré<sup>1</sup> & Roberto Joo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Marina, Universidad Católica del Norte  
Casilla 117, Coquimbo, Chile

**RESUMEN.** Se evaluó la viabilidad de los espermatozoides de macha *Mesodesma donacium* sometidos a diferentes tratamientos de criopreservación mediante su motilidad y éxito de la fecundación con espermatozoides descongelados. En un arreglo factorial se evaluaron 42 protocolos, combinando tres tipos de crioprotectores (DMSO, Metanol y Propilén-glicol), tres concentraciones (0,5 M, 1,0 M y 1,5 M), cuatro tasas de congelación (-5, -10, -15 y -206°C·min<sup>-1</sup>) y dos tasas de descongelación (lenta: 72°C·min<sup>-1</sup> y rápida: 312°C·min<sup>-1</sup>). Los mejores resultados de motilidad espermática (16,7%) se obtuvieron con DMSO 1,0 M como crioprotectante, a una tasa de congelación de -15°C·min<sup>-1</sup> y descongelación lenta. Mientras que los mejores resultados de fecundación (84,4%) con espermatozoides congelados-descongelados se obtuvieron con DMSO 1,5 M a una tasa de congelación de -15°C·min<sup>-1</sup> y descongelación rápida.

**Palabras clave:** criopreservación, espermatozoides, fecundación, moluscos, bivalvos.

## Viability of cryopreserved spermatozoa of the surf clam *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia)

**ABSTRACT.** The viability of the surf clam spermatozoa was evaluated using the percentage of fertilization obtained with cryopreserved spermatozoa and different protocols. In total, 42 protocols combined three types of cryoprotectants (DMSO, Methanol, and Propylene-glycol) at three different concentrations (0.5 M, 1.0 M, and 1.5 M), four freezing rates (-5, -10, -15, and -206°C·min<sup>-1</sup>), and two thawing rates (slow: 72°C·min<sup>-1</sup> and fast: 312°C·min<sup>-1</sup>). The best sperm motility was obtained with DMSO frozen at -15°C·min<sup>-1</sup> and with a slow thawing rate. The best fertilization percentages were obtained with DMSO frozen at -15°C·min<sup>-1</sup> but with a fast thawing rate.

**Key words:** cryopreservation, spermatozoa, fertilization, mollusk, bivalve.

---

Autor corresponsal: Enrique Dupré (edupre@ucn.cl)

En los últimos 10 años, la macha *Mesodesma donacium*, ha sido sometida a sobreexplotación (SER-NAPESCA, 2001). Miranda (2001) informó sobre la completa desaparición del banco de machas de todas las playas de la bahía de Coquimbo, Chile. Esta situación ha generado políticas de resguardo, como el establecimiento de áreas de manejo, repoblamiento y la generación de programas de mejoramiento genético. En las dos últimas décadas se ha comenzado a utilizar la criobiología como método predominante y fundamental para la conservación del stock de especies en peligro (Basavaraja & Hedge, 2004), además de permitir una producción sostenida en el tiempo de las especies en cultivo. Los estudios sobre

criopreservación de gametos y larvas de moluscos (Nacimiento *et al.*, 2005) se han incrementado en los cinco últimos años; sin embargo, la mayoría de los estudios informan sobre los protocolos aplicados a las diferentes especies, sin una aplicación específica a cultivos masivos. No obstante, recientemente Dong *et al.* (2005) aplicaron exitosamente protocolos de criopreservación de espermatozoides a la ostra *Crassostrea gigas* con fines de producción masiva de individuos triploides, mediante la congelación de espermatozoides provenientes de individuos tetraploides que fecundaron ovocitos de hembras diploides normales.

Con estos antecedentes, sumados a la creciente

contaminación de las zonas costeras, es que se ha iniciado, desde 1999, estudios de criopreservación de espermatozoides del ostión *Argopecten purpuratus* (Dupré & Espinoza, 2000, 2004) y de la macha *Mesodesma donacium* (Joo & Dupré, 2002). Como primera etapa para obtener el mejor protocolo para criopreservar espermatozoides de macha (Joo & Dupré, 2002), se evaluó la toxicidad de tres crioprotectores: DMSO, metanol y propilenglicol, y tres tiempos de equilibrio. Este estudio estableció que el DMSO 1,0 M con un tiempo de equilibrio de 5 min, es el crioprotectante que genera la menor toxicidad para los espermatozoides ya que se obtienen altos porcentajes de espermatozoides con motilidad tipo 3 (movimiento activo del flagelo y desplazamiento efectivo hacia adelante). En una segunda etapa es necesario determinar si los porcentajes de motilidad obtenidos son similares después de realizar el proceso de criopreservación o si estos espermatozoides congelados-descongelados permiten fecundar ovocitos frescos. Es por esto que en el presente estudio se presentan los principales resultados obtenidos en 42 protocolos diferentes, realizados para obtener los máximos porcentajes de motilidad espermática y de fecundación con espermatozoides sometidos a criopreservación. Los 42 protocolos, en un arreglo factorial, se combinaron en tres tipos de crioprotectores: dimetilsulfóxido (DMSO), metanol (Me) y propilenglicol (PG), tres concentraciones (0,5 M; 1,0 M y 1,5 M), cuatro tasas de congelación (TC) (-5, -10, -15 y  $-206^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) y dos tasas de descongelación (TD): lenta:  $72^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y rápida:  $312^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Se utilizó espermatozoides extraídos de la gónada según la metodología ya descrita en Joo & Dupré (2002) y se mantuvieron en tubos Eppendorf con el crioprotectante a ensayar a  $5^{\circ}\text{C}$  por 5 min (tiempo de equilibrio) antes de comenzar a congelar (Joo & Dupré, 2002). La concentración espermática final varió entre  $3,75\cdot 10^6$  y  $5\cdot 10^6$  esp·mL<sup>-1</sup>. Para la congelación se utilizó un equipo mecánico (Dupré & Espinoza, 2004).

Después de cada congelación-descongelación, se determinó la motilidad que presentaban los espermatozoides y luego se utilizaron para realizar fecundaciones *in vitro* adicionando 2 mL de ovocitos frescos dentro de la cápsula con espermatozoides, para obtener una proporción de 425-565 espermatozoides/ovocito. El número de ovocitos fecundados se determinó con un microscopio, contabilizando el número de embriones en segmentación después de 2 h post-inseminación.

En el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de tres factores, donde los factores fueron los crioprotectores y sus concentraciones, las cuatro tasas de congelación y las dos tasas de descongelación. Los mejores porcentajes de motilidad tipo 3 fueron obtenidos utilizando DMSO 1,5 M como crioprotectante (Figs. 1a y 1b), con una tasa de congelación de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Los mayores porcentajes de motilidad tipo 3 post-descongelación, se obtuvieron en aquellos protocolos que utilizaron DMSO, con una TC de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y TD lenta o rápida (Figs. 1a y 1b). El porcentaje más alto de motilidad 3 se obtuvo en los ensayos que utilizaron DMSO 1,5 M, una TC de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y TD lenta (Fig. 1a). Los protocolos que utilizaron una TC de  $-206^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y DMSO 1,0 M obtuvieron un 16% de motilidad, pero al variar la concentración a 0,5 M y 1,5 M, los porcentajes de motilidad disminuyeron drásticamente a 7% y 0% respectivamente. En los ensayos que utilizaron PG como crioprotectante, los porcentajes de motilidad 3 variaron entre 0% y 8,3%, los mayores valores se obtuvieron con la concentración 1,5 M, TC  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y TD lenta (8,7%) o rápida (8%) (Figs. 1e y 1f). No se observó motilidad en los protocolos que utilizaron Metanol como crioprotectante (Fig. 1c y d).

El análisis estadístico de los datos obtenidos con cada uno de los diferentes protocolos, mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0,005$ ) entre los valores de motilidad 3 obtenidos en diferentes crioprotectores, diferentes concentraciones y TC, no así en las TD.

Las tasas de descongelación no presentaron diferencias significativas entre sí, aun cuando los mayores porcentajes de motilidad 3 se obtuvieron con descongelación lenta en los tres tipos de crioprotectores.

Respecto a la fecundación, los mejores porcentajes de fecundación (84,4%) se obtuvieron en los tratamientos con DMSO 1,5 M con TC de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y TD rápida, sin embargo, estos espermatozoides presentaron sólo un 11,5% de motilidad 3 (Fig. 1b). Con este mismo tratamiento, pero con descongelamiento lento se obtuvo un mayor porcentaje (16,7%) de motilidad 3, pero los porcentajes de fecundación disminuyeron a 61,8%.

Cuando se utilizó PG, los porcentajes promedio de fecundación no superaron el 60%, siendo los más altos aquellos tratamientos que utilizaron TC de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Cuando se utilizó Metanol como crio-

protectante y descongelación rápida, los porcentajes de fecundación promedio no superaron el 20%.

El análisis estadísticos de todos los porcentajes de fecundación obtenidos, indicaron que no hubo diferencias significativas cuando las fecundaciones se realizaron con espermatozoides descongelados en forma rápida o lenta ( $p < 0,001$ ).

Los resultados obtenidos sugieren que no habría una relación directa entre la disminución de motilidad

y la disminución de la fecundación con espermatozoides congelados y descongelados. Esto se debería a que el proceso de criopreservación generaría un mayor daño sobre las estructuras flagelares respecto al daño producido sobre la cabeza espermática como lo señala Espinoza (2003), especialmente sobre el acrosoma. Los altos porcentajes de fecundación obtenidos con espermatozoides congelados a una tasa de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  permiten sugerir que a esta tasa de

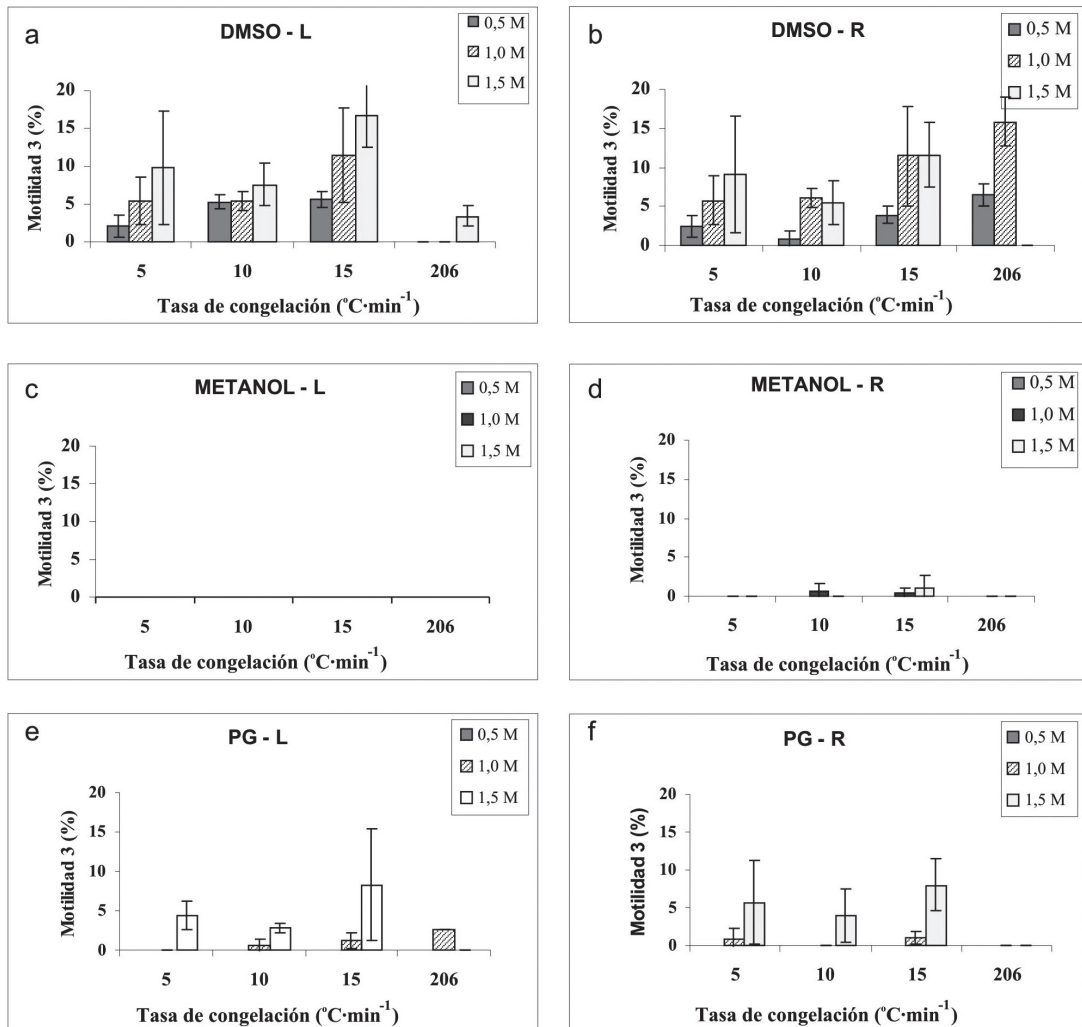


Figura 1. Motilidad espermática tipo 3 (con desplazamiento hacia adelante) de espermatozoides congelados con diferentes crioprotectores, concentraciones, tasas de congelación y descongelación. a) y b) tratados con DMSO, c) y d) tratados con metanol, e) y f), tratados con propilenglicol (PG). a), c) y e) fueron descongelados a  $72^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (L); b), d) y f) fueron descongelados a  $312^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (R).

Figure 1. Sperm motility type 3 (M3) of spermatozoa treated with different cryoprotectants, concentration, freezing rates and thawing rates. a) and b) treated with DMSO, c) and d) treated with methanol, e) and f), treated with propylenglycol (PG). a), c) and d) were thawing at  $72^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (L); b), d) and f) were thawing at  $312^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (R).

congelación, el daño producido al acrosoma es menor que el daño producido al flagelo, lo cual se debería a la menor probabilidad de formar cristales intracelulares a esta temperatura, como lo señala Manzur & Kashimoto (2002) y Korokura *et al.* (1990). Respecto a la motilidad, se observó claramente que los mayores porcentajes se obtuvieron en los ensayos realizados con tasa de  $-15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  sin importar la tasa de descongelación o el tipo de crioprotectante utilizado. Estos resultados se deberían a que a esta tasa de congelación, el tiempo en que se deshidrata la célula, especialmente las estructuras flagelares, es suficiente para que las moléculas de agua sean reemplazadas por moléculas de crioprotectante. De este modo se evita la agregación de ellas que causan la formación de cristales de hielo intracelular de gran tamaño y que provocan la destrucción o alteración de las estructuras u organelos del espermatozoide. Con tasas de congelación muy altas, no hay suficiente tiempo para la deshidratación de los espermatozoides, por lo cual se formaría hielo intracelular con la consecuente destrucción de estructuras intracelulares.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de la Dirección de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Católica del Norte (DGICT-UCN) y al Observatorio Astronómico Cerro Tololo por su constante colaboración en los proyectos de criopreservación.

### REFERENCIAS

- Basavaraja, N. & S. Hedge. 2004.** Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology*, 49: 149-156.
- Don, Q., C. Huang, B. Eudeline & T.R. Tiersch. 2005.** Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. *Cryobiology*, 50: 1-16.
- Dupré, E. & C. Espinoza. 2000.** Determinación de porcentajes de fecundación del ostión del norte *Argopecten purpuratus* utilizando espermatozoides criopreservados. Informe final, Proyecto DGI-UCN. Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 29 pp.
- Dupré, E. & C. Espinoza. 2004.** Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Invest. Mar.*, Valparaíso, 32: 3-9.
- Espinoza, C. 2003.** Alteraciones morfológicas y fisiológicas en espermatozoides criopreservados de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) concha de abanico. Tesis de Biología con mención en Biología Pesquera. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 61 pp.
- Joo, R. & E. Dupré. 2002.** Efecto de diferentes crioprotectantes sobre la motilidad espermática de la macha *Mesodesma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Invest. Mar.*, Valparaíso, 30: 75-79.
- Korokura, H., K. Namba & T. Ishikawa. 1990.** Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. *Nippon Sui. Gakka.*, 56: 1803-1806.
- Mazur, P. & C. Kashimoto. 2002.** Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates. *Biol. Reprod.*, 66: 1485-1490.
- Miranda, C. 2001.** La desaparición del banco de machas *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) (Mollusca: Bivalvia: Mesodesmatidae) en la bahía de Coquimbo IV Región, Chile: sus probables causas. Tesis de Biología Marina, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, 50 pp.
- Nacimiento, I., M. Leite, M. Sampaio de Araujo, G. Sansone, S. Pereira & E. do Espirito Santo. 2005.** Selection of cryoprotectants based on their toxic effects on oyster gametes and embryos. *Cryobiology*, 51(1): 113-117.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2001.** Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca. Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Santiago, 291 pp.

Recibido: 6 septiembre 2005; Aceptado 28 julio 2006