

Research Article

Criopreservación de espermatozoides del lenguado *Paralichthys adspersus*

Christian Catcoparco¹, Alfonso Silva¹ & Enrique Dupré¹

¹Laboratorio de Criopreservación, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte
P.O. Box 117, Coquimbo, Chile

RESUMEN. Para optimizar las técnicas de reproducción en cautiverio de lenguado *Paralichthys adspersus*; se elaboró una metodología para la criopreservación de sus espermatozoides. Para ello, se evaluó el efecto del dimetil sulfoxido (DMSO) como agente crioprotector en tres concentraciones diferentes (1,0; 1,5 y 2,0 M) sobre la motilidad espermática y su posterior congelación con cinco diferentes tasas: -7,5; -10; -12,5; -20 y -30°C min⁻¹, utilizando un congelador automático programable. Los mayores porcentajes de motilidad espermática post congelamiento-descongelamiento (40,5 ± 13%) fueron obtenidos al utilizar una tasa de -10°C min⁻¹ y DMSO sin encontrar diferencias significativas entre las tres diferentes concentraciones de DMSO ($P < 0,05$). Posteriormente, se evaluó el efecto de un crioaditivo no permeable (vitelo de huevo de gallina o VHG), para determinar si era posible incrementar los porcentajes de motilidad espermática. Se utilizó una solución crioprotectora compuesta por DMSO, en cada una de las tres concentraciones diferentes, adicionando VHG al 10% v/v. Los mayores porcentajes de motilidad espermática (71,71 ± 13%) también se obtuvieron a la tasa de congelamiento de -10°C min⁻¹, sin encontrar diferencias significativas entre las concentraciones de la solución crioprotectora en la cual fue incubada la muestra de espermatozoides ($P < 0,05$). Al comparar los porcentajes de motilidad espermática post-descongelación utilizando el crioprotectante DMSO, se obtuvieron diferencias significativas cuando se agregó VHG.

Palabras clave: crioaditivos, crioprotectantes, motilidad espermática, tasa de congelamiento, lenguado, Chile.

Cryopreservation of flounder *Paralichthys adspersus* spermatozoa

ABSTRACT. To optimize the techniques of captive breeding of flounder *Paralichthys adspersus*, a methodology was developed for the cryopreservation of spermatozoa of this species. The effect on sperm motility post-thawing, using three different concentrations (1.0; 1.5 and 2.0 M) of DMSO as cryoprotective agent and five different freezing rates -7.5; -10; -12.5; -20 and -30°C min⁻¹, with an automatic programmable freezer was evaluated. The highest percentages of post-thawing sperm motility were obtained by freezing sperm at -10°C min⁻¹, no significant differences ($P < 0.05$) were founded between the three different concentrations of DMSO used. Subsequently, we evaluated the effect of a non-permeable cryo-additive (chicken egg yolk, VHG), in order to obtain an increasing of the percentage of sperm motility. We used a cryoprotectant solution including DMSO at three different concentrations adding 10% VHG v/v. The highest percentages of sperm motility (71.71 ± 13%) were obtained at the freezing rate of -10°C min⁻¹ without significant differences between the three concentrations of the cryoprotectant solution in which the sample was incubated sperm ($P < 0.05$). A high significant difference between the sperm motility percentages post-thawing using DMSO and DMSO with VHG, was observed.

Keywords: cryoaditives, cryoprotectant, sperm motility, freezing rate, flounder, Chile.

Corresponding author: Enrique Dupré (edupre@ucn.cl)

INTRODUCCIÓN

La producción exportada total del sector acuicultura en Chile se ha incrementado de 64.595 ton en 1993 a 430.976 ton en 2004, siendo la explotación de salmónidos el 80% del volumen de cosecha a partir

del año 2000 (FAO, 2009). Sin embargo, este crecimiento se ha visto interrumpido debido a la presencia de enfermedades como la anemia infecciosa del salmón (ISA), lo cual ha inducido a iniciar el desarrollo de tecnologías de cultivo hacia otras especies para sustentar y fortalecer el futuro del sector

acuícola del país. En este análisis, el cultivo de peces planos como el lenguado *Paralichthys adspersus* ha surgido como opción atractiva para el mercado después de los salmónidos, ya que esta especie ha demostrado tener gran potencial de desarrollo dada su alta calidad, gran demanda en importantes mercados como Europa, Estados Unidos y Japón y los altos precios que varían entre US\$20-40 por kg. Ante estos antecedentes y con la finalidad de obtener huevos y larvas en toda época del año, surgió la necesidad de reproducir esta especie en cautiverio mediante técnicas de reproducción *in vitro*. Sin embargo, la asincronía entre el desove de las hembras y espermiación de los machos dificulta la reproducción de esta especie. Por tal motivo, se planteó la posibilidad de criopreservar espermatozoides y almacenarlos hasta el momento en que ocurran los desoves de las hembras o en cualquier momento que sea necesario utilizarlos como un modo de evitar la asincronía que ocurre normalmente en especies en cautiverio como es en el lenguado *P. adspersus*.

La criopreservación de espermatozoides, que ha demostrado ser una herramienta de gran beneficio para la acuicultura y para la especie *P. adspersus*, es una alternativa de solución que permitirá almacenar espermatozoides viables por largos periodos de tiempo los cuales podrían ser utilizados en cualquier época del año, permitiendo así mantener una producción estable en cualquier centro de cultivo de esta especie.

En estudios anteriores (Suquet *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003) se determinó que la utilización de DMSO (Dimetil Sulfoxido) como agente crioprotector para criopreservar espermatozoides de diversos peces marinos genera una baja toxicidad y alta protección durante la congelación. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos en diversos peces planos como lenguado de invierno *Pseudopleuronectes americanus* (Rideout *et al.*, 2003), rodaballo *Scophthalmus maximus* (Chen *et al.*, 2004); lenguado de Argentina *P. orbignyanus* (Lanes *et al.*, 2008) y róbalo manchado *Verasper variegatus* (Tian *et al.*, 2008). Similares resultados fueron obtenidos por nuestro grupo de trabajo al criopreservar espermatozoides de anchoveta *Engraulis ringens* (Catcoparco *et al.*, 2010). Todos estos estudios mostraron que el DMSO permite una mayor protección, respecto a otros crioprotectores, para los espermatozoides descongelados sometidos a congelación-descongelación.

Para establecer un protocolo de criopreservación de espermatozoides de una especie, es necesario evaluar y optimizar cada uno de las etapas del proceso de congelamiento, desde la incubación en los crioprotectores, hasta el congelamiento y descongelamiento de los espermatozoides (Dupré & Espinoza,

2004). La primera etapa y fundamental para la generación de un protocolo de congelación, es la elección del crioprotector que se usará en la congelación. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó el efecto de dos tipos de soluciones crioprotectoras: uno que solamente se utilizó un crioprotector permeable y actúa intracelularmente y otra solución compuesta por dos crioprotectores, uno permeable más otro que no penetra en la célula, pero que permite la integridad de la membrana plasmática durante la congelación y descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de semen y dilución de muestra espermática

Se utilizaron 24 ejemplares de *Paralichthys adspersus* con pesos mayores a 600 g y longitudes a partir de 40 cm, provenientes del Laboratorio de Cultivo de Peces de la Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

Para extraer la muestra de semen, se anestesiaron los peces transfiriéndolos a baños de 2-Fenoxietanol (0,3 mL 10 L⁻¹ agua de mar). Una vez inmovilizados los peces, se extrajo semen mediante presión ligera sobre la región abdominal. Se recolectó muestras entre 60 y 100 µL de semen colocando la punta de una pipeta automática directamente sobre el gonoporo para evitar la contaminación de la muestra con orina y/o heces lo cual hubiese afectado negativamente la motilidad espermática (Dreanno *et al.*, 1998). Previo a la recolección del semen, los peces permanecieron dos días en ayuno lo cual ayuda a evitar contaminación con heces.

El semen extraído fue colocado en una cápsula de cultivo celular conteniendo 450 µL de solución salina de NaCl al 0,9%, a una temperatura de 8°C (Chen *et al.*, 2004), para mantener inactivos los espermatozoides durante el precongelamiento. Se realizaron entre nueve y once repeticiones para cinco tasas de congelamiento utilizando cuatro diferentes concentraciones de DMSO, cada una de ellas poseía una prueba control en la cual solo se colocaba muestra de semen y solución salina.

Determinación de tasa de congelamiento

Para la congelación se utilizaron dos tipos de crioprotectores: DMSO en tres concentraciones diferentes: 1,0; 1,5 y 2,0 M y una solución compuesta por las mismas soluciones anteriores, a las cuales se agregó vitelo de huevo de gallina (VHG) al 10% v/v. Esta última solución fue centrifugada a 1000 rpm durante 10 min y se separó el sobrenadante para ser

usado como solución crioprotectora (DMSO+VHG). De cada muestra extraída, se combinaron 15 μL de semen disuelto en NaCl con 585 μL de cada uno de los crioprotectores en un criotubo de 1,5 mL donde permanecieron por 10 min a 8°C (tiempo de equilibrio). A partir de cada una de estas soluciones espermáticas se obtuvieron las muestras que fueron introducidas en pajuelas de 0,5 mL de capacidad para ser posteriormente congeladas a diferentes tasas.

Transcurrido el periodo de equilibrio, las pajuelas cargadas con los espermatozoides, fueron colocadas en la cámara de un congelador automático programable Planer© KRYO 560-16. Las pajuelas con las muestras se mantuvieron a una temperatura inicial de 5°C por 5 min y luego se disminuyó la temperatura a una de las siguientes tasas: -7,5; -10, -12,5, -20 ó -30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta llegar a una temperatura final de -80°C. Inmediatamente después, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (N_2L) y luego trasladadas a un tanque con nitrógeno líquido (-196°C) para su almacenamiento.

Descongelamiento de muestras

Después de permanecer en nitrógeno líquido durante 24-48 h, las pajuelas fueron descongeladas por inmersión en agua a 45°C durante 15 s e inmediatamente después en agua a temperatura ambiente (20°C) hasta su descongelación total. Las muestras descongeladas fueron suspendidas en agua de mar en proporción 1/20 (v/v) para reactivar la motilidad de los espermatozoides y realizar el conteo respectivo.

Evaluación de la motilidad espermática y tiempo de activación

Después de la descongelación, se determinó la motilidad espermática a los 60, 120 y 180 s post-activación en agua de mar, utilizando una cámara de Neubauer y observando bajo microscopía de luz con 400x. El porcentaje de motilidad se calculó en función al número de espermatozoides móviles presentes en cinco compartimentos diferentes de la cámara de Neubauer.

Análisis estadístico

Se evaluó la normalidad de los datos utilizando la prueba Lilliefors y la homogeneidad de varianza con la prueba de Cochran. Los resultados de las pruebas de tasas de congelamiento fueron analizados mediante ANDEVA y el test de Tukey para las comparaciones entre tasas de congelamiento, mientras que *t*-student con corrección de Bonferroni para las comparaciones entre diferentes concentraciones de crioprotector o diferentes soluciones crioprotectoras según fuese el

caso. Se utilizó el programa SYSTAT versión 8.0 para Windows.

RESULTADOS

Congelación utilizando DMSO

Motilidad espermática 60 s post-descongelamiento

El mayor porcentaje de motilidad espermática obtenido después de 60 s post-activación en agua de mar, fue $40,50 \pm 13\%$ el cual fue obtenido utilizando DMSO 1,5 M como crioprotector y una tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Sin embargo este valor no fue significativamente diferente ($P > 0,05$) a aquellos valores obtenidos al incubar los espermatozoides en 1,0 y 2,0 M de DMSO utilizando la misma tasa de congelamiento.

Al comparar los porcentajes de motilidad espermática, obtenidos después de congelar-descongelar utilizando los protocolos con tasas de congelación -7,5; -12,5; -20 y $-30^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, se determinó que no existen diferencias significativas entre ellos, los cuales fueron menores a 15% (Fig. 1). Sin embargo, al compararlos con aquellos obtenidos con una tasa de congelación de $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ la diferencia fue significativa ($P < 0,05$).

Motilidad espermática 120 s post-descongelamiento

Los mayores porcentajes de motilidad de espermatozoides a los 120 s post-activación en agua de mar fue a la tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, siendo el mayor valor obtenido de $21,1 \pm 10\%$ utilizando 1,5 M de DMSO, este porcentaje no fue significativamente diferente a los obtenidos con 2,0 y 1,0 M de DMSO ($14,4 \pm 5\%$ y $8,82 \pm 4\%$ respectivamente). Los valores de motilidad espermática utilizando el resto de las tasas de congelamiento fueron menores al 7% y mostraron diferencias significativas respecto a la tasa de $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Fig. 1).

Motilidad espermática 180 s post-descongelamiento

A los 180 s de activar a los espermatozoides en agua de mar, el mayor porcentaje de motilidad fue al utilizar 1,5 M de DMSO ($13,3 \pm 7\%$) a la tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, el resto de valores porcentuales fueron menores a 5% y mostraron diferencias significativas respecto a dicha tasa (Fig. 1).

Congelación utilizando DMSO + VHG

Motilidad espermática 60 s post-descongelamiento

Después de 60 s post activación en agua de mar, los mayores porcentajes de motilidad espermática post-descongelación utilizando DMSO + VHG como

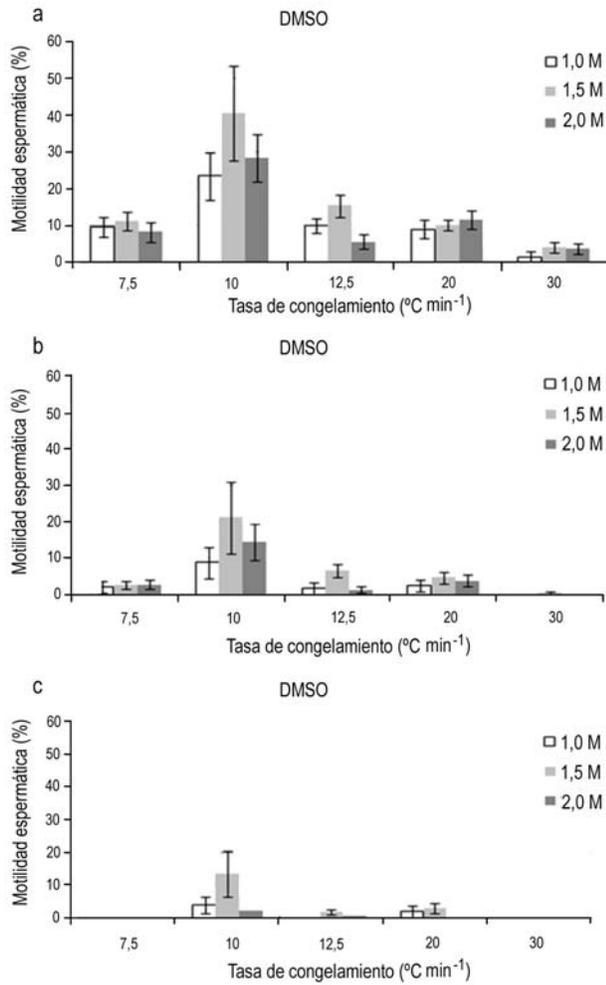


Figura 1. Motilidad espermática en diferentes tiempos post-descongelación. (a: 60 s, b: 120 s y c: 180 s) de *P. adspersus* utilizando DMSO a diferentes concentraciones molares como agente crioprotector (barras: negra, 1,0 M; achurada, 1,5 M; gris, 2,0 M) y diferentes tasas de congelación.

Figure 1. Total motility of spermatozoa of *P. adspersus*, at different times post-thawing. (a: 60 s, b: 120 s y c: 180 s) using DMSO as cryoprotectant at different molar concentrations (black bar: 1.0 M; dashed bar: 1.5 M; graybar: 2.0 M) and different freezing rates.

crioprotector se obtuvieron a una tasas de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí ($P > 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni). Pero al compararlos con los valores obtenidos con las otras tasas de congelación resultaron significativamente diferentes para cada uno de los tratamientos (ANDEVA, test de Tukey, $P < 0,05$) (Fig. 2).

A la tasa de congelamiento de $-12,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, los mayores porcentajes de motilidad espermática fueron

utilizando 1,5 y 2,0 M ($39,99 \pm 3\%$ y $35,73 \pm 2\%$ respectivamente) no encontrándose diferencias significativas entre estos valores ($P > 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni), la concentración de 1,0 M el porcentaje fue $16,8 \pm 5\%$ siendo diferente a las otras dos concentraciones ($P < 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni) (Fig. 2).

Cuando se utilizó la tasa de congelamiento de $-20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, los mayores porcentajes de motilidad espermática fueron utilizando 2,0 y 1,5 M ($35,74 \pm 3\%$ y $32,54 \pm 1\%$ respectivamente), no encontrándose diferencia significativa entre estos valores ($P > 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni). Sin embargo, cuando se utilizó el crioprotector a una concentración de 1,0 M, la motilidad espermática ($12,62 \pm 3\%$) fue significativamente diferente a los otros dos tratamientos ($P < 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni) (Fig. 2).

A la tasa de congelamiento de $-7,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, los porcentajes de motilidad espermática para cada una de las concentraciones de DMSO + VHG fueron $15,9 \pm 3,9\%$, $10,4 \pm 4,7\%$ y $22,6 \pm 3,5\%$ para 1,0; 1,5 y 2,0 M. A la tasa de congelamiento de $-30^{\circ}\text{C min}^{-1}$, los porcentajes de motilidad espermática para cada una de las concentraciones de DMSO + VHG fueron menores al 5%.

Motilidad espermática 120 s post-descongelamiento

A los 120 s post-activación en agua de mar, los mayores porcentajes de motilidad espermática incubados en DMSO (a las tres diferentes concentraciones) + VHG fueron a la tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, siendo los valores de $44,5 \pm 2\%$; $39,6 \pm 4\%$ y $35,7 \pm 10\%$ para 2,0; 1,0 y 1,5 M respectivamente; estos valores no fueron significativamente diferentes entre sí ($P > 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni). Cada uno de estos tres porcentajes de motilidad espermática fueron significativamente diferentes a los obtenidos con el resto de las tasas de congelamiento (ANDEVA, test de Tukey, $P < 0,05$), en los cuales los porcentajes de motilidad espermática fueron menores al 25% (Fig. 2).

Motilidad espermática 180 s post-descongelamiento

A los 180 s de activar a los espermatozoides en agua de mar, los mayores porcentajes de motilidad espermática fueron a la tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, ($23,3 \pm 1\%$; $22,8 \pm 2\%$ y $19,4 \pm 7\%$ para 2,0; 1,0 y 1,5 M respectivamente), no teniendo diferencia significativa entre estos valores ($P > 0,05$; *t*-student con corrección de Bonferroni). El resto de los porcentajes de motilidad espermática obtenidos fueron menores al 15% (Fig. 2).

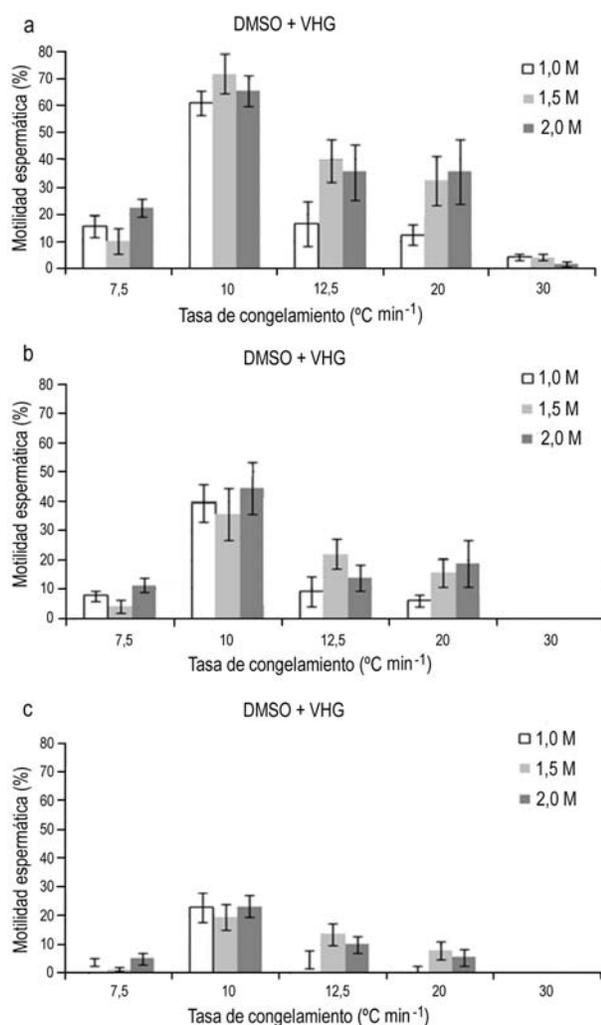


Figura 2. Motilidad total de espermatozoides en diferentes tiempos (a: 60 s, b: 120 s, c: 180 s) post-descongelamiento de *P. adspersus* utilizando como agente crioprotector una solución de DMSO en concentraciones (barras: negra: 1,0 M; achurada: 1,5 M; gris: 2,0 M) a las cuales se les adicionó VHG (vitelo de huevo de gallina) al 10% v/v.

Figure 2. Total sperm motility at different time (a: 60 s, b: 120 s, c: 180 s) post-thawing of *P. adspersus* freezing using as cryoprotectant agent a solution of DMSO at (black bar: 1.0 M; dashed bar: 1.5 M; gray bar: 2.0 M) added with VHG (chicken egg yolk) at 10% v/v.

DISCUSIÓN

Aunque la tasa de congelación es una de los factores más críticos en el proceso de criopreservación, esta es la variable menos estandarizada, además durante el proceso de congelación no sólo es importante establecer como interactúa el crioprotector con la célula, sino que también se hace necesario determinar

el efecto tóxico de éstos, que es finalmente el evento de mayor importancia a controlar (Anchordoguy *et al.*, 1991). Para ello, se evaluó el efecto del DMSO a diferentes concentraciones y a distintas tasas de congelamiento sobre el tiempo de motilidad espermática. En tal sentido, durante las pruebas de congelamiento de espermatozoides de *P. adspersus*, se determinó que los mayores porcentajes de motilidad espermática, a los 60 s, post-descongelación (superiores al 70%) se obtuvieron a la tasa de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y utilizando DMSO 1,5 M con VHG como crioaditivo.

La Tabla 1 que relaciona la motilidad espermática con el éxito de la fecundación obtenida con espermatozoides criopreservados en diversas especies de lenguados, muestra que los mayores porcentajes de fecundación, se obtuvieron con protocolos que utilizaron DMSO como crioprotector.

La función que cumple el DMSO como crioprotector permeable es disminuir el punto de fusión de la solución crioprotectora o servir como buffer osmótico (Rana, 1995). Hubalek (2003) señala que este crioprotector tiene afinidad por el agua intracelular y de esa forma atrapa moléculas de agua en su interior, lo que impide que éstas formen cristales geométricos ordenados. En consecuencia, la solidificación del medio se establece con una distribución molecular desordenada del agua y la sustancia toma el carácter de sustancia vítrea protectora. En el presente estudio, se muestra que utilizando DMSO 1,5 M como único agente crioprotectante, se obtiene, a los 60 s, un máximo de $40,5 \pm 13\%$ de motilidad post-descongelación (Fig. 3a), que parece insuficiente para proteger a la célula del daño causado por la formación de hielo durante la congelación. Esto es evidenciado por el mejor resultado obtenido cuando se agrega un crioaditivo no permeable, el VHG, a la solución crioprotectora, con la cual se obtiene un $71,7 \pm 13\%$ de motilidad espermática. En tal sentido, los crioprotectores no permeables o extracelulares cumplen funciones de protección complementarias al de los crioprotectores permeables o intracelulares durante el proceso de criopreservación, tales como disminución del punto de fusión, servir como buffers osmóticos (Rana, 1995), o posiblemente fortalecer la membrana celular ante el estrés osmótico producido durante el proceso de congelamiento-descongelamiento (Mizukami *et al.*, 1999; Medina *et al.*, 2005).

Los valores porcentuales de motilidad espermática obtenidos en el presente estudio son comparables a otras especies marinas, como *Anguilla anguilla*, donde se utilizó como crioprotector una solución de DMSO adicionado con un crioprotector no permeable, el suero fetal bovino (FBS) donde obtuvieron valores de

Tabla 1. Relación entre valores porcentuales de motilidad espermática y fecundación.**Table 1.** Relationship between sperm motility and fertilization percentage.

Especie	Motilidad post criopreservación	Porcentaje de fecundación obtenido	Autores
<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	95%	95%	Rideout <i>et al.</i> (2003)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	79,17 ± 4,5%	76,2 ± 10%	Zhang <i>et al.</i> (2003)
<i>Scophthalmus maximus</i>	78,3 ± 7,6%	70,1 ± 8,9%	Chen <i>et al.</i> (2004)
<i>Lateolabrax japonicus</i>	68,3 ± 4,4%	61,5 ± 1,5%	Ji <i>et al.</i> (2004)
<i>Thamnaconus septentrionalis</i>	60%	58 ± 3,6%	Kang <i>et al.</i> (2004)
<i>Sparus aurata</i>	70,0 ± 4,7%	75,6 ± 6,0%	Cabrita <i>et al.</i> (2005)
<i>Pagrus major</i>	88,6 ± 8,0%	93,8 ± 4,2%	Liu <i>et al.</i> (2006)
<i>Verasper variegatus</i>	48%	40,9 ± 20%	Tian <i>et al.</i> (2008)
<i>Paralichthys orbignyanus</i>	43 ± 9%	78 ± 5%	Lanes <i>et al.</i> (2008)

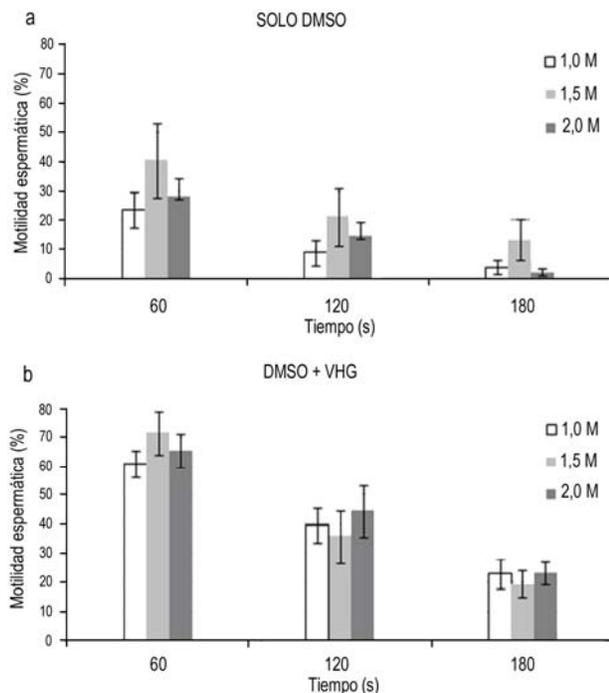


Figura 3. Motilidad total de espermatozoides en diferentes tiempos post-descongelación de *P. adspersus* utilizando la tasa de congelación de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$. a) se utilizó como crioprotector el DMSO en tres concentraciones diferentes, b), se utilizó como crioprotector una solución (DMSO+VHG) que contenía DMSO en diferentes concentraciones a la cual se le adicionó VHG (vitelo de huevo de gallina) al 10% v/v.

Figure 3. Total sperm motility at different time post thawing of *P. adspersus* using the $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ freezing rate. a) using DMSO at different molar concentrations, b) using a cryoprotectant solution (DMSO+VHG) containing DMSO at different molar concentration and chicken egg yolk 10% v/v (VHG).

motilidad espermática post congelación-descongelación de $75,1 \pm 1,7\%$ (Marco-Jiménez *et al.*, 2006; Asturiano *et al.*, 2007), o en *Sparus aurata* donde se obtuvieron motilidades de $70,0 \pm 4,7\%$ usando una solución crioprotectora formada por DMSO y albúmina sérica de bovino (BSA) (Cabrita *et al.*, 2005). Estos resultados sugieren que la inclusión de vitelo de huevo de gallina (VHG) dentro de la solución crioprotectora que se utilizó en el proceso de criopreservación de los espermatozoides de *P. adspersus*, generaría una mayor protección durante el proceso de congelación que sería proporcionada por las lipoproteínas presentes en el VHG y estar previniendo de daños en la membrana plasmática (Scott & Baynes, 1980; Suquet *et al.*, 2000) o incrementando la resistencia de la membrana celular ante el estrés osmótico durante el congelamiento-descongelamiento de los espermatozoides (Cabrita *et al.*, 1998).

Por otro lado, en espermatozoides de ovinos, se determinó que las proteínas plasmáticas son capaces de revertir, al menos parcialmente, el daño producido por el choque térmico por frío sobre espermatozoides; determinaron que al incubar espermatozoides con proteínas plasmáticas aumentó la integridad de la membrana de 30 a 62,6%. Un mecanismo similar podría estar ocurriendo en los espermatozoides de *P. adspersus* al ser incubados en una solución de DMSO suplementada con VHG el cual contiene proteínas junto con lípidos.

En el presente estudio, se estableció un protocolo de criopreservación que indica que los espermatozoides de lenguado *P. adspersus*, pueden ser congelados con éxito utilizando un sistema de congelamiento automático y con el cual se mantienen

valores de motilidad espermática post-descongelamiento cercanos al de espermatozoides frescos.

Otros estudios, realizados en otras especies de peces planos, han obtenido resultados similares utilizando tasas de congelamiento superiores a $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (presente estudio). En *Pleuronectes ferrugineus* (Richardson *et al.*, 1999) los mejores resultados se obtuvieron con tasas de congelamiento de $-19,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, en *Pseudopleuronectes americanus* (Rideout *et al.*, 2003), *Paralichthys olivaceus* (Zhang *et al.*, 2003) y *Scophthalmus maximus* (Chen *et al.*, 2004) la tasa óptima de congelamiento fue de $-20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ y para *P. orbignyanus* (Lanes *et al.*, 2008) fue de $-30^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Esta diferencia se debería a una menor permeabilidad de la membrana plasmática de *P. adspersus* que generaría una lenta pérdida de agua intracelular, por las condiciones hipertónicas a que es sometido el espermatozoide durante la congelación, lo cual permite que haya una deshidratación adecuada en comparación con células que tienen mayor permeabilidad y por lo tanto, la deshidratación es más rápida. Esta rápida deshidratación es disminuida si se emplea una tasa de congelación más rápida con el propósito de generar pequeños cristales de hielo intracelular.

En conclusión, los espermatozoides de *P. adspersus*, pueden ser criopreservados utilizando una solución crioprotectora formada por DMSO a 1,0; 1,5 ó 2,0 M y añadiendo VHG al 10% v/v, y aplicando una tasa de congelamiento de $-10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio fue financiado por el proyecto Fondef D05 I-10246 y fondos de la Dirección de Investigación y Desarrollo de la UCN (DGI-UCN).

REFERENCIAS

- Anchordoguy, T., C. Cecchini, J. Crowe & L. Crowe. 1991. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. *Cryobiology*, 28: 467-473.
- Asturiano, F., F. Marco-Jiménez, D. Peñaranda, D. Garzón, L. Pérez, J. Vicente & M. Jover. 2007. Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reprod. Domest. Anim.*, 42: 162-166.
- Cabrita, E., R. Alvarez, L. Anel, K. Rana, & M. Herráez. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology*, 37: 245-253.
- Cabrita, E., V. Robles, S. Cuñado, J. Wallace, C. Sarasquete & M. Herráez. 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology*, 50: 273-284.
- Catcoparco, C., E. Dupré & C. Espinoza. 2010. Criopreservación de espermatozoides de anchoveta peruana (*Engraulis ringens*). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 45(1): 121-126.
- Chen, S.L., X.S. Ji, G.C. Yu, Y.S. Tian & Z.X. Shang. 2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*, 236: 547-556.
- Dreanno, C., M. Suquet, E. Desbruyeres, J. Cosson, H. LeDelliou & R. Billard. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 169: 247-262.
- Dupré, E. & C. Espinoza. 2004. Congelamiento de espermatozoides del ostión del norte *Argopecten purpuratus* mediante congelador mecánico. *Invest. Mar., Valparaíso*, 32: 3-9.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 2009. Estadística Pesquera de la FAO. Producción en Acuicultura. [http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_chile/es]. Revisado: 19 marzo 2011.
- Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46: 205-229.
- Ji, X., S. Chen, Y. Tian, G. Yu, Z. Sha, M. Xu & S. Zhan. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture*, 241: 517-528.
- Kang, K.H., K.H. Kho, Z.T. Chen, J.M. Kim, Y.H. Kim & Z.F. Zhang. 2004. Cryopreservation of filefish (*Thamnaconus septentrionalis* Gunther, 1877) sperm. *Aquacult. Res.*, 35: 1429-1433.
- Lanes, C., M. Okamoto, P. Varoni, T. Collares, V. Farias, J. Deschamps, R. Robaldo, L. Marins & L. Sampaio. 2008. Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture*, 275: 361-365.
- Liu, Q., J. Li, S. Zhang, F. Ding & X. Xu. 2006. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red sea bream, *Pagrus major*, with 2-ml cryovials. *J. World Aquacult.*, 37: 289-297.
- Marco-Jiménez, F., D. Garzón, D. Peñaranda, L. Pérez, M. Viudes de Castro, J. Vicente, F. Jover & J. Asturiano. 2006. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, fetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology*, 53: 51-57.
- Medina, V., Y. Velasco & P. Cruz. 2005. Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 18: 34-48.

- Rana, K. 1995. Preservation of gametes. In: N. Bromage & R. Roberts (eds.). Broodstock management of egg and larval quality. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 53-73.
- Mizukami, A., D. Carrell & C. Peterson. 1999. Cryopreservation of embryos. In: Encyclopedia of reproduction. Academic Press, Utah, pp. 765-772.
- Richardson, G., C. Wilson, L. Crim & Z. Yao. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. Aquaculture, 174: 89-94.
- Rideout, M., K. Litvak & E. Trippel. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquacult. Res., 34: 653-659.
- Scott, A. & S. Baynes. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. J. Fish Biol., 17: 707-739.
- Suquet, M., C. Dreanno, C. Fauvel, J. Cosson & R. Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. Aquacult. Res., 31: 231-243.
- Tian, Y., S. Chen, X. Ji, J. Zhai, L. Sun, C. Chen & P. Su. 2008. Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. Aquaculture, 284: 268-271.
- Zhang, Y., S. Zhang, X. Liu, Y. Xu, C. Wang, M. Sawant, J. Li & S. Chen. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. Theriogenology, 60: 989-996.

Received: 1 April 2011; Accepted: 13 April 2012