

Ocimer

“Sea urchin research project”

CRIOPRESERVACIÓN DE

ERIZO DE MAR

LIBRETO DE PROTOCOLOS

E.Paredes, S. Campos

La Criobiología es una técnica ampliamente reconocida para el almacenamiento a largo plazo de material biológico usando temperaturas criogénicas. La criopreservación consiste en congelar, almacenar y descongelar material biológico, ya sean células, tejido u organismos, en la presencia de agentes crioprotectores conservando su estructura y función. La criopreservación tiene aplicaciones en ciencia básica, acuicultura, gestión de pesquerías y conservación de la biodiversidad. Dentro de este libretto encontrarás los protocolos de criopreservación para células de los erizos de mar: *Paracentrotus lividus*, *Sphaerechinus granularis* y *Echinocardium cordatum*.



Ocimer



ÍNDICE

Criopreservación de esperma de erizo de mar	2
Caso modelo: <i>Paracentrotus lividus</i>	2
Conclusiones:	5
Criopreservación de esperma de erizo de mar	6
Otras especies: <i>Sphaerechinus granularis</i> , <i>Echinocardium cordatum</i>	6
Conclusiones:	9
Criopreservación de huevos de erizo de mar	10
Caso modelo: <i>Paracentrotus lividus</i>	10
Conclusiones:	10
Criopreservación de embriones de erizo de mar	12
Caso modelo: <i>Paracentrotus lividus</i>	12
Conclusiones:	14
Criopreservación de embriones de erizo de mar	15
Caso modelo: <i>Sphaerechinus granularis</i>	15
Conclusiones:	17
Bibliografía para consultar:	18

Criopreservación de esperma de erizo de mar

Caso modelo: *Paracentrotus lividus*

1. **Obtención de gametos:** Los gametos se pueden obtener mediante inducción de la puesta por inyección de KCl 0.5-1M, sin embargo el esperma se obtiene diluido en agua de mar y activado. Para la criopreservación de esperma nuestra recomendación es la disección transversal del erizo y la obtención del esperma directamente de la gónada seccionada lo más concentrado posible.



Figura 1.- Vista de erizo macho de *P. lividus*, se puede ver el esperma derramándose de la gónada cortada en la disección. A la izquierda el esperma puro recolectado en un vaso con una pipeta Pasteur.

2. **Control de calidad previa a la criopreservación:** Para el control de calidad del esperma, se puede trabajar con un sistema CASA de análisis del movimiento, sin embargo si no contamos con este equipo, el análisis del movimiento del esperma en agua de mar bajo el microscopio es suficiente. Pueden usarse múltiples metodologías según las necesidades (Gallego & Asturiano 2018). En nuestro caso, previo al proceso de criopreservación simplemente con esperma que tenga un movimiento activo generalizado nos llega. Pero para la evaluación de la calidad a posteriori, la selección del control de calidad es importante.
3. **Selección de Agentes crioprotectores y preparación:** Lo primero es comprobar el efecto que los diferentes crioprotectores tienen sobre estas células, realizando test de toxicidad que nos permitieron seleccionar no sólo el crioprotector más adecuado, si no en concreto la concentración óptima del mismo para obtener crioprotección con la mínima toxicidad.

En este caso se seleccionó Dimetil sulfóxido (Me_2SO) (1 M) preparado en agua de mar filtrada ($0.22\mu\text{m}$) y esterilizada con UVA o agua de mar artificial. La solución crioprotectora se prepara al doble de la concentración deseada final. Esta solución puede conservarse en frío y oscuridad durante un mes para su utilización.

4. **Criopreservación:** La criopreservación de estas muestras de esperma se realizó mediante un sistema muy sencillo utilizando vapor de nitrógeno líquido.

Se trata de una pequeña balsa de poliestireno expandido o espuma rectangular con el ancho necesario para asentar las pajuelas utilizadas para criopreservar las muestras (en verde en el esquema), la balsa necesita estar hueca para permitir que pase el vapor de nitrógeno líquido sobre el que flota. La distancia entre el nitrógeno líquido y la muestra tiene que ser de 5 cm, lo que corresponde a una tasa de congelación de 10°C/min aproximadamente.

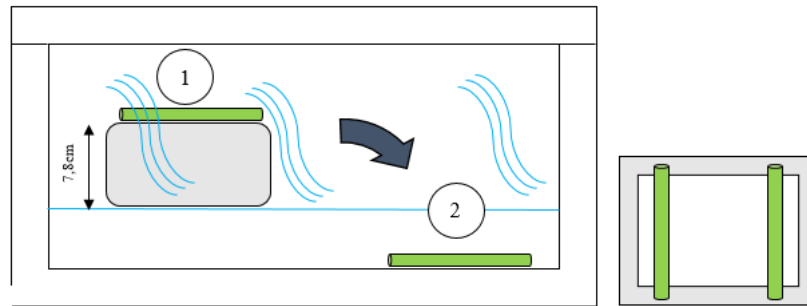


Figura 2.- Esquema del sistema de criopreservación por vapor de nitrógeno líquido. Se trata de una caja de poliestireno expandido con tapa, con nitrógeno líquido en el fondo sobre el cual flota una balsa sobre la que se posan las pajuelas con las muestras.

- Colocar 1 mL de esperma puro en un vial y añadir 1 mL de solución de Dimetil sulfóxido (dilución 1:1), aspirar las muestras en pajuelas de 0.25mL.
 - Desde la adición del crioprotector, todo el proceso de carga tiene que ser de 5 minutos. La temperatura durante este proceso tiene que ser estable entre 19-20°C
 - Colocar las pajuelas sobre la balsa flotante dentro de una caja cerrada durante 8 minutos (1), transferir las pajuelas con unas pinzas desde la balsa al nitrógeno líquido (2).
5. **Almacenamiento:** Una vez que las muestras se encuentran en nitrógeno líquido están almacenadas de forma estable por el tiempo necesario. Si se quieren guardar en un tanque de almacenamiento deben transferirse siempre inmersas en nitrógeno líquido para evitar excursiones térmicas que puedan dañar la muestra.
6. **Descongelación:** Para descongelar las pajuelas, transferirlas rápidamente desde el nitrógeno líquido a un baño de agua a 35°C durante 6 segundos. Abrir la pajuela en un vial y diluir la muestra de esperma puro con crioprotector con la adición secuencial de 4% de agua de mar hasta ver la reactivación del movimiento del esperma.
7. **Calidad post-congelación:** Para evaluar la calidad del esperma descongelado, puede hacerse visualmente comparando el porcentaje de movilidad con el control fresco bajo el microscopio o utilizando un sistema CASA. Otra opción es la evaluación de la fertilidad preservada, en este caso utilizando el esperma criopreservado para realizar una fertilización y compararla con la equivalente en fresco.

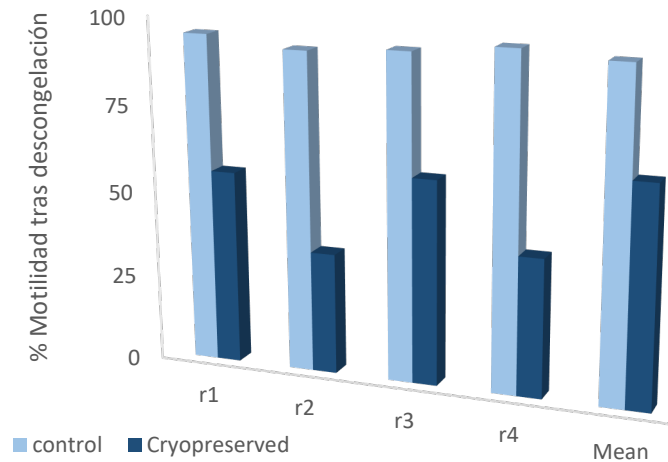


Gráfico 1.- La motilidad del esperma tras la descongelación tiene una gran variabilidad entre replicas, en media se obtiene un esperma con un 50% de la motilidad de los controles en fresco (63 ± 11).

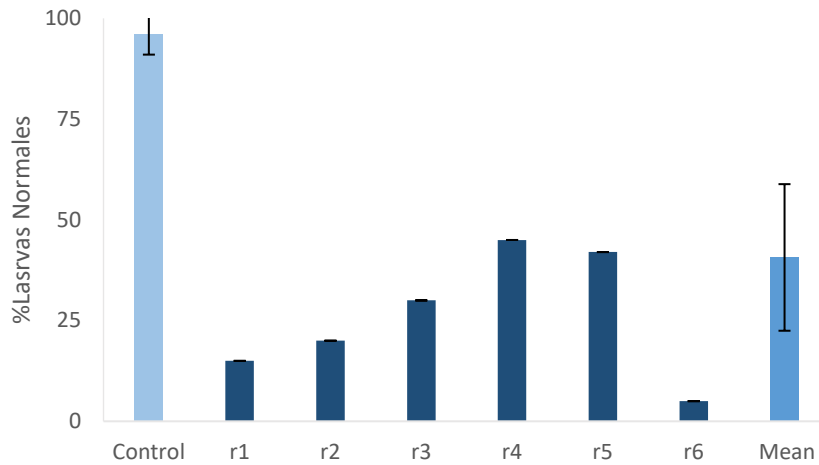


Gráfico 2.- Comparación de la fertilidad y obtención de larvas tras utilizar los espermatozoides descongelados para la fertilización de huevos en fresco, también muestra una gran variabilidad entre muestras, la media de larvas normales al fertilizar con esperma criopreservado es de 40.6 ± 18.2 (proporción esperma huevo de 20:1 en control y tratamientos).



Conclusiones:

La criopreservación de *P. lividus* ha sido exitosa, puede utilizarse para diferentes aplicaciones y se puede obtener hasta un 50% de larvas en condiciones estándar de fertilización. Los espermatozoides están funcionalmente intactos y conservan en gran parte su estructura y función.

Criopreservación de esperma de erizo de mar

Otras especies: *Sphaerechinus granularis*, *Echinocardium cordatum*

1. **Obtención de gametos:** La disección también es la mejor forma cuando se trabaja con estas dos especies, con la siguientes precauciones, *Echinocardium cordatum* es muy frágil en comparación con *P. lividus* o *S. granularis*, al ser un erizo irregular, su concha es frágil y por eso en vez de una disección transversal es mejor cortar las concha con una tijera y después cortar transversalmente las gónadas para obtener el esperma.



Figura 3.- Ejemplar de erizo irregular *Echinocardium cordatum*

2. **Selección de Agentes crioprotectores y Criopreservación:** Preparar una solución 1M de Dimetil sulfóxido. En este caso el primer intento de criopreservación de estos organismos se hizo por la transferencia directa del protocolo diseñado para *P. lividus*, la congelación fue en vapor de nitrógeno líquido (ver foto del material utilizado en Figura 2 y 4)

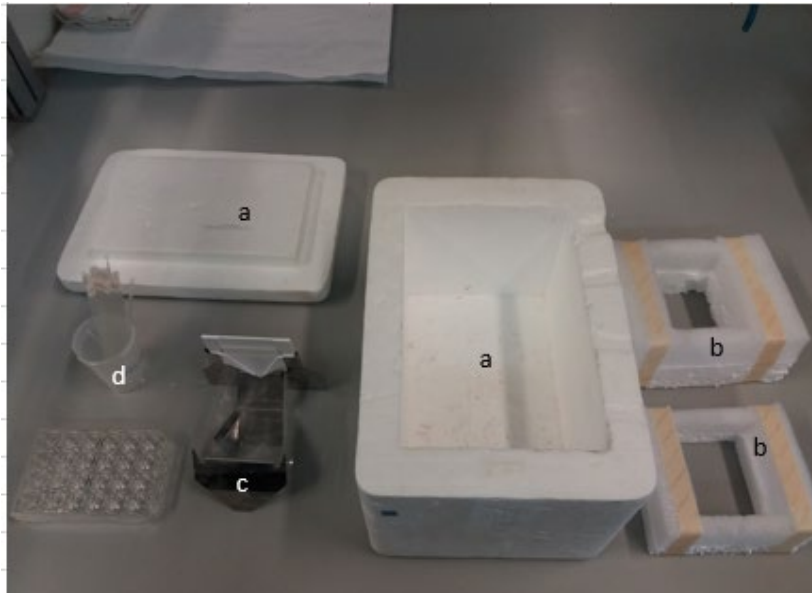


Figura 4.- Equipamiento para criopreservación en vapor de nitrógeno líquido, vemos una caja con tapa (a), balsas flotantes (b), caballete y peine para llenado de pajuelas (c), bote con pajuelas (d).

3. **Calidad post-congelación:** Aquí hay varias cosas a tener en cuenta. Hemos criopreservado estas muestras utilizando y transfiriendo los conocimientos adquiridos en *P. lividus* a otras dos especies. Y

con ellos hemos descubierto que existe una gran variabilidad interespecífica en resistencia y éxito ante un mismo protocolo. Estos resultados nos permiten la criopreservación y biobancarización de ambas especies, aunque la calidad de criopreservación dista mucho de la deseada para la conservación de la biodiversidad genética y por tanto más investigación se requiere para la mejora de la calidad, empezando por la selección del criopreservante adecuado.

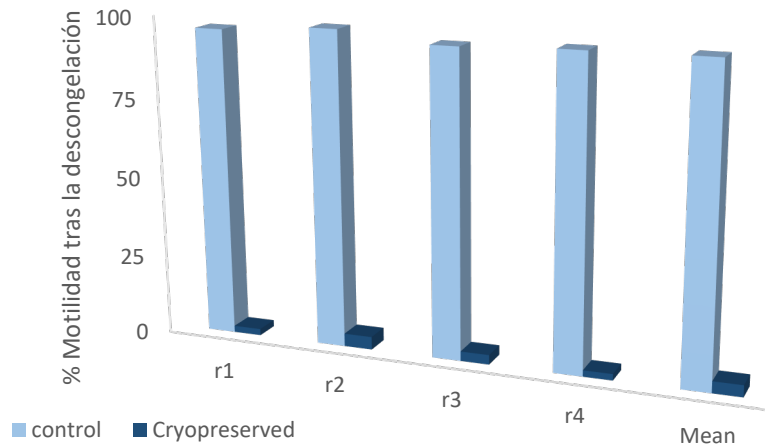


Grafico 3.- La motilidad del espermatozoides tras la descongelación tiene una gran variabilidad entre replicas, en media se obtiene un espermatozoides con apenas motilidad (3.6 ± 0.9) en comparación con el de los controles en fresco (96 ± 1).

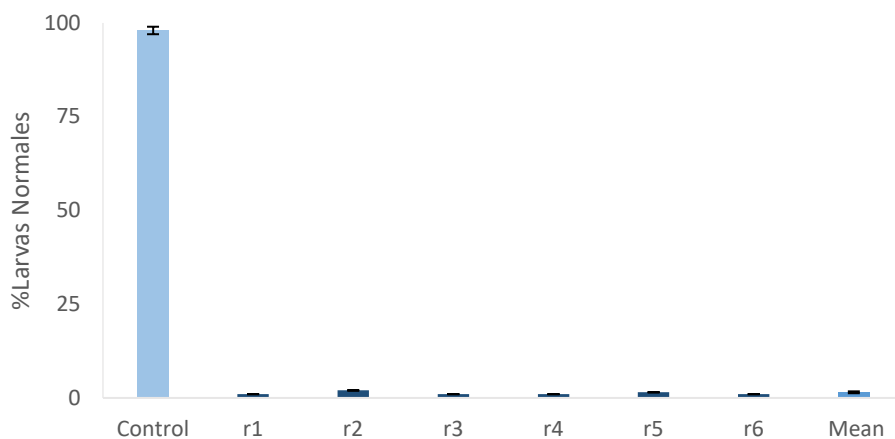


Gráfico 4.- Comparación de la fertilidad y obtención de larvas tras utilizar los espermatozoides descongelados para la fertilización de huevos en fresco, la fertilización es anecdótica (proporción espermatozoides huevo de 20:1 en control y tratamientos). Una tinción del espermatozoides revela que sigue vivo pero su motilidad se ha visto severamente afectada.

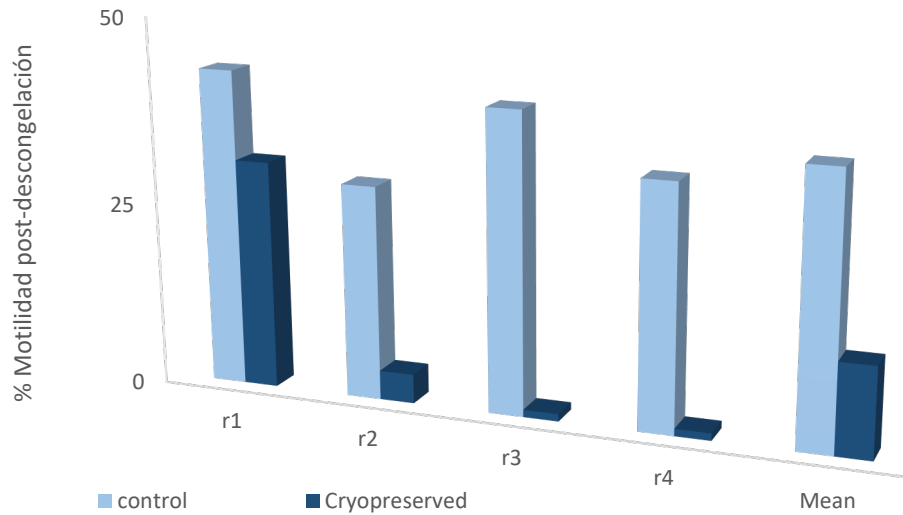


Gráfico 5.- La motilidad del espermatozoides tras la descongelación tiene una gran variabilidad entre replicas, en media se obtiene un espermatozoides con apenas motilidad (12 ± 14) en comparación con el de los controles en fresco (36 ± 6). Es interesante que en este caso el espermatozoides control no sea tan activo como en otras especies.

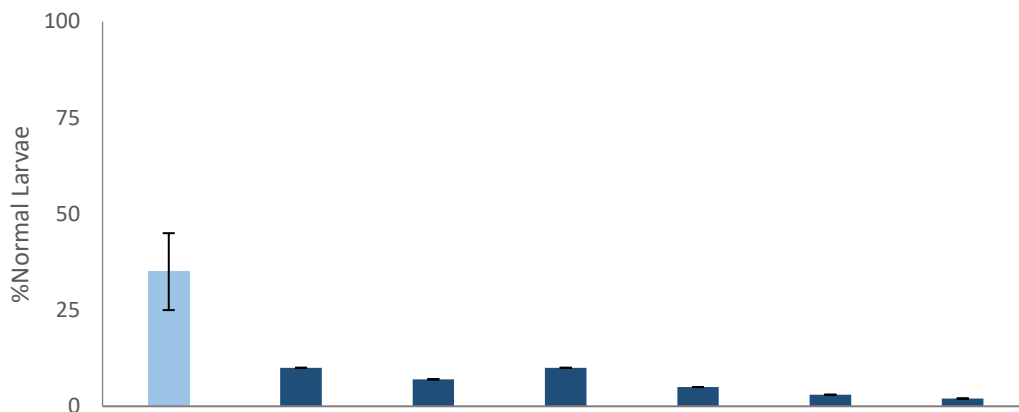


Gráfico 6.- Comparación de la fertilidad y obtención de larvas tras utilizar los espermatozoides descongelados para la fertilización de huevos en fresco, la fertilización es menos del 10% (6.7 ± 3.5) La proporción espermatozoides huevo de 20:1 en control y tratamientos. El éxito de fertilización en los controles es también más bajo que en otras especies. Una tinción del espermatozoides revela que sigue vivo pero su motilidad se ha visto severamente afectada.



Conclusiones:

En ambos casos la transferencia del protocolo diseñado para *P. lividus* ha dado poco éxito en estas especies, aunque es posible criopreservar el esperma y que continúe manteniendo su función, los problemas morfológicos que afectan a la movilidad son importantes. En condiciones estándar de fertilización el éxito es limitado y habría que aumentar mucho la cantidad de esperma por huevo para obtener una mayor fertilización. En este caso los problemas parecen iniciarse en el momento de seleccionar el Dimetil sulfóxido como criopreservante. Test con Etilen glicol como sustituto han mostrado indicios de mejora pero sin ser significativos. De momento se pueden biobancarizar los gametos de estas especies pero sus aplicaciones están restringidas por la baja calidad de la muestra tras la descongelación.

Criopreservación de huevos de erizo de mar

Caso modelo: *Paracentrotus lividus*

La criopreservación de gametos y larvas marinas ha sido estudiada desde los años 70, la preservación de gametos paternos y maternos por separado es la forma óptima de guardar la variabilidad genética. Hay muchos estudios de criopreservación de espermatozoides de organismos marinos, entre ellos erizos de mar (Paredes 2014) con resultados bastante exitosos. Los huevos sin embargo no han sido criopreservados con éxito a día de hoy por varias causas (Campos et al. 2021): alto contenido en lípidos y alta sensibilidad a la toxicidad de los agentes crioprotectores. Así, ahora mismo no existe un protocolo que permita la criopreservación de los gametos maternos individualmente y en su lugar se pueden criopreservar embriones o larvas.

CPA	NOEC (M)
	Egg
Me ₂ SO	0.5
EG	1
PG	0.68
TRE	0.05
PVP	0.75
Me ₂ SO + TRE	1
Me ₂ SO + PVP	-
EG + TRE	1
EG + PVP	2
PG + TRE	2.04
PG + PVP	2.04

Tabla 1.- Datos de NOEC (*No observed Effect Concentration*) para huevo de erizo *P. lividus*, la NOEC es la concentración máxima sin efectos tóxicos significativos para una lista de diferentes crioprotectores.

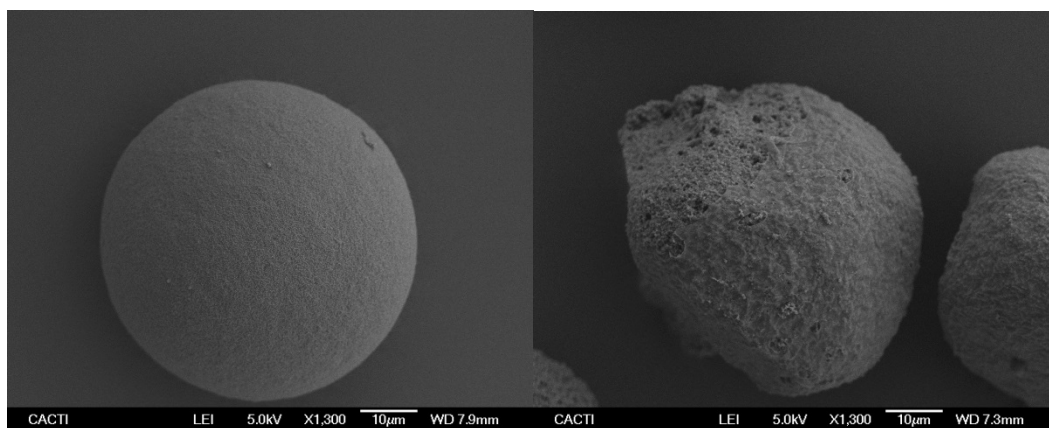


Figura 5.- A la izquierda imagen de microscopio electrónico de barrido de un huevo Control de *P. lividus*, a la derecha un huevo tras la criopreservación con 0.5M de Me₂SO (Concentración NOEC).

Conclusiones:

Los huevos de erizo de mar son muy sensibles a la toxicidad, entre otras cosas, por eso se usan los erizos de mar en los bioensayos embrio-larvarios para detectar contaminación marina, ya que pueden dar una alerta temprana a la presencia de concentraciones muy pequeñas (micromolar) de ciertos compuestos en el agua. En este caso, esta sensibilidad de los estados tempranos de desarrollo y el huevo a compuestos químicos es una de las razones por la cual no se pueden criopreservar huevos de erizo.

La concentración NOEC para huevo de erizo en nuestro experimento es de 0.5M en el caso de Me₂SO (Tabla 1) y como se puede observar en la Figura 5, no es una concentración suficiente para proteger a la célula durante la congelación. Sin embargo concentraciones más altas tienen una toxicidad elevada y el huevo sufre efectos letales ya durante la etapa previa a la congelación.

Ahora mismo no existe un protocolo que funcione para la criopreservación de huevos de ningún organismo marino, pero grandes avances se están haciendo en comprender los mecanismos de daño celular que están actuando durante el proceso de exposición a los crioprotectores y congelación.

P. lividus

Day 3

Day 6

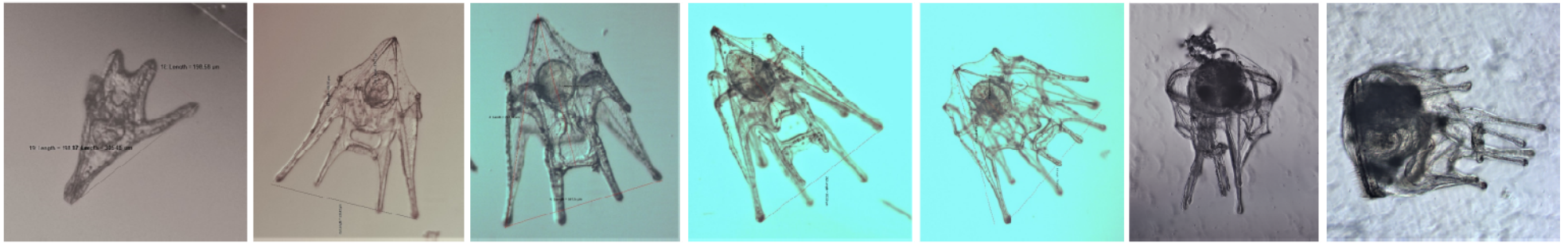
Day 10

Day 14

Day 17

Day 19

Day 21



S. granularis

Day 2

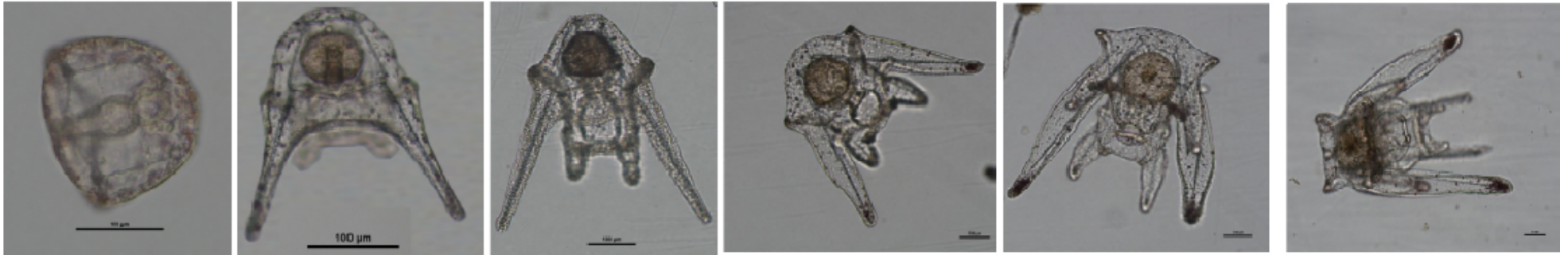
Day 5

Day 7

Day 9

Day 12

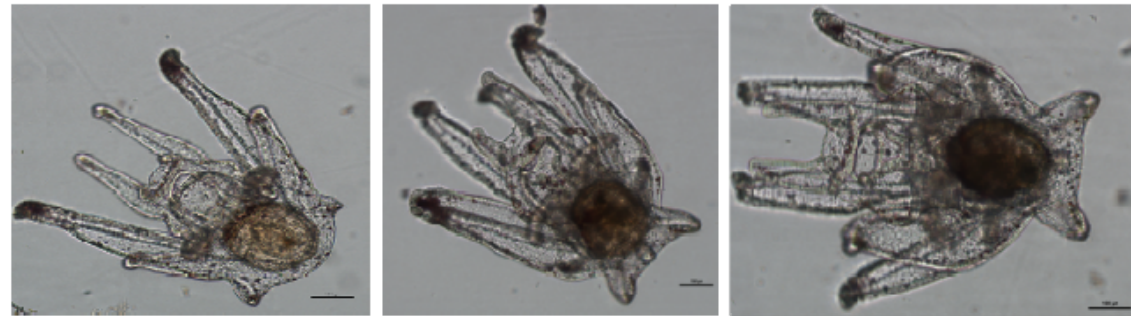
Day 14



Day 16

Day 19

Day 21

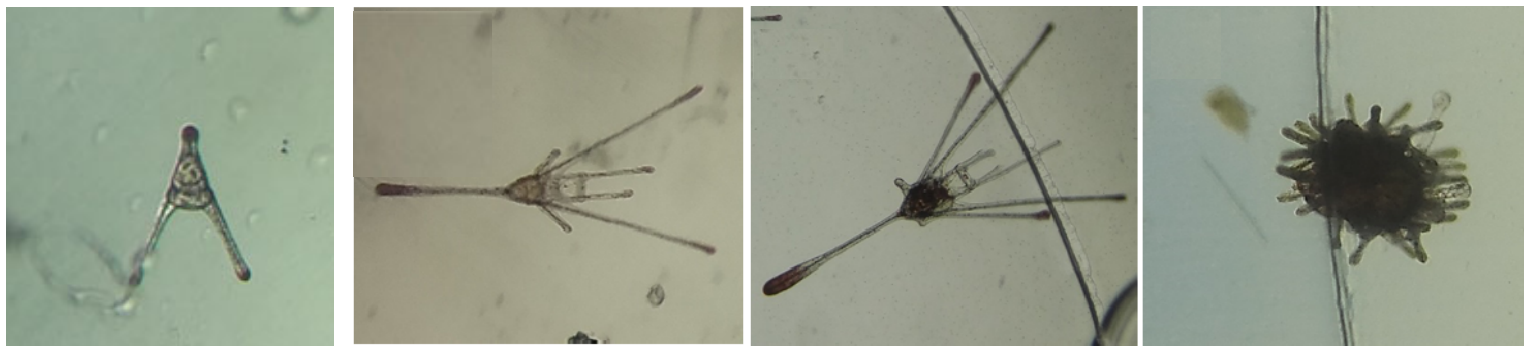


Day 3

Day 5

Day 14

Day 21



E. cordatum

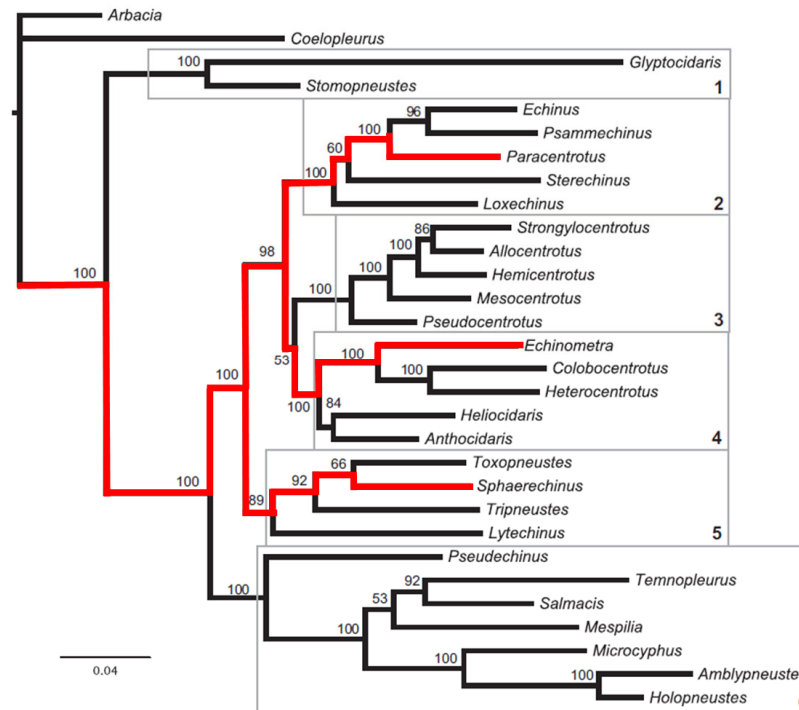
¿Que es un biobanco?

Un **biobanco** recoge, almacena y distribuye material biológico y los datos asociados a dicho material. Los biobancos son una parte crucial de la infraestructura de acceso a los Recursos Biológicos y la preservación de estos recursos de forma consistente en el tiempo es el pilar fundamental del desarrollo científico en la investigación biológica y en el desarrollo biotecnológico.

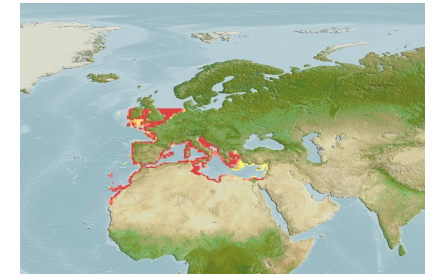


La **criopreservación** es la única forma de conservación de células, tejidos u organismos vivos que garantiza estabilidad genética y estructural a largo plazo (citas) gracias al uso de temperaturas criogénicas. El acceso a material biológico con las menores restricciones posibles en el tiempo junto con la posibilidad de almacenar copias exactas de los organismos o células de trabajo de forma estable son dos pilares centrales al desarrollo biotecnológico marino necesario en el siglo XXI y que se ha venido acuñando como Crecimiento azul.

La posibilidad de poner esta herramienta tan útil, al servicio de la ciencia abre las puertas para una edad de oro de la investigación marina con base biotecnológica. En definitiva, se abre la puerta a la expansión del concepto de biobanco para albergar organismos marinos vivos, pero en condiciones de vida suspendida, con aplicaciones a la investigación básica, para la conservación de la biodiversidad, para biomedicina con base marina o para la acuicultura.

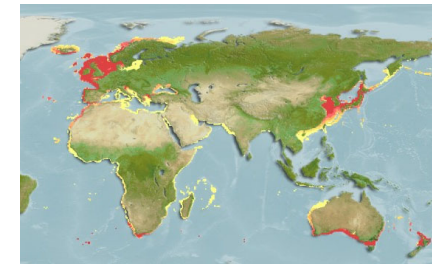


Paracentrotus lividus



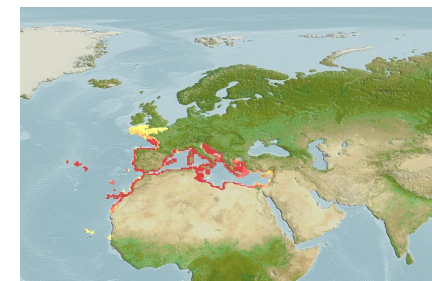
Clasificación : Echinoidea | Echinoidea | Echinidae

Echinocardium cordatum



Clasificación: Echinoidea | Spatangoida | Loveniidae

Sphaerechinus granularis



Clasificación: Echinoidea | Temnopleuroida | Toxopneustidae

Criopreservación de embriones de erizo de mar

Caso modelo: *Paracentrotus lividus*

1. **Obtención de gametos:** Para la criopreservación de esperma nuestra recomendación es la disección transversal del erizo y la obtención del esperma y huevos directamente de la gónada seccionada. La fertilización tiene lugar en agua de mar, en una proporción de 20 espermias por huevo. Con una incubación a $19\pm 1^\circ\text{C}$ las blástulas tardan entre 6 y 8 horas en aparecer. Utilizaremos blástulas de 8 horas en este protocolo (Figura 6).

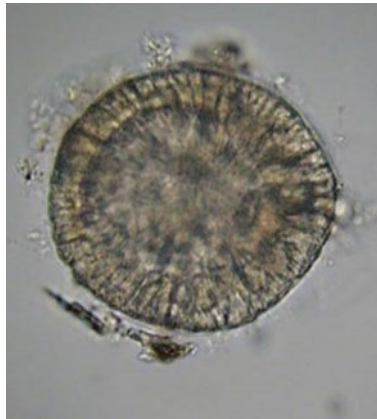


Figura 6.- Blástula de 8 horas, tienen una forma característica de doble anillo, su tamaño en *P. lividus* es de $100\mu\text{m}$ de diámetro y tienen una fina banda ciliada que le permite cierta capacidad de movimiento. Son todavía embriones que se alimentan de la reserva vitelina ya casi terminada del huevo.

2. **Control de calidad previa a la criopreservación:** Tras 8 horas comprobamos que la mayoría de las células estén en estado de blástula, moviéndose y con buen aspecto. Si solo un número reducido de células son blástulas tras 8 horas, puede ser un indicativo de que los huevos no tenían calidad suficiente o de que algún parámetro se ha modificado durante la incubación. Sólo se utilizarían si la calidad es buena ya que el resultado final de la criopreservación solamente tiene calidad si empezamos el proceso con material biológico de gran índole.
3. **Selección de Agentes crioprotectores y preparación:** En este caso se seleccionó Dimetil sulfóxido (1.5 M) junto con trealosa (0.04M) preparado en agua de mar filtrada ($0.22\mu\text{m}$) y esterilizada con UVA o agua de mar artificial. La solución crioprotectora se prepara al doble de la concentración deseada final. Esta solución puede conservarse en frío y oscuridad durante un mes para su utilización.
4. **Criopreservación:** El protocolo se ha descrito en Bellas y Paredes 2011. La adición de los crioprotectores sobre las células (dilución 1:1) se hace en 15 pasos equimolares de 1 minuto a temperatura de $19\pm 1^\circ\text{C}$. El protocolo de criopreservación consta de enfriar desde los 4°C hasta los -12°C a $1^\circ\text{C}/\text{min}$, a los -12°C se realiza la siembra del hielo en los viales mecánicamente, después se

enfria hasta los -80 a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se almacenan los viales en nitrógeno líquido. Para este proceso se necesita una criocámara programable (Figura 7).

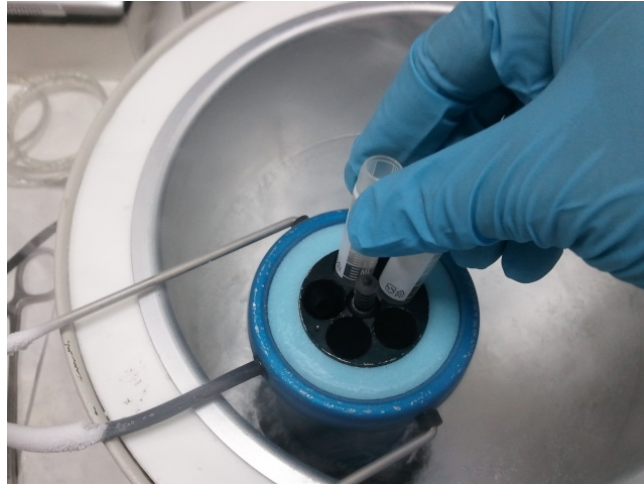


Figura 7.- Núcleo de criocámara donde se introducen los viales de muestras, el núcleo está en un baño de nitrógeno líquido. Fuera de imagen está el controlador de temperatura y el ordenador que permite programar protocolos y controlar el proceso (Cryologic Ltd. Australia)

5. **Descongelación:** La descongelación se hace en agua de mar a 18°C durante varios minutos hasta que el hielo desaparece de la muestra. Es imprescindible diluir el crioprotector para evitar toxicidad, esto se hace en 12 pasos equimolares de 1 minuto. Después, los embriones descongelados deben filtrarse y resuspenderse en agua de mar libre de crioprotector para su uso.

6. **Calidad post-congelación:** Los resultados y usos de los embriones obtenidos se pueden consultar en profundidad en Paredes y Bellas 2014 donde se usan los embriones criopreservados en evaluación de la toxicidad con tóxicos de referencia y elutriados de agua de mar o en Paredes et al. 2015 donde se hizo un cultivo larvario completo hasta el asentamiento de juveniles con una tasa de éxito del 71% de supervivencia y 25% de asentamiento respecto a controles no criopreservados.



Figura 8.- Izquierda larva control tras cultivo de 21 días, a la derecha larva de blástulas criopreservadas tras cultivo de 21 días.

Conclusiones:

Este protocolo es el único que existe para la criopreservación de embriones de erizo de mar a día de hoy y *P. lividus* es la única especie que desde 2015 tiene un protocolo de criopreservación con resultados demostradamente útiles a largo plazo y con aplicaciones. Ahora este protocolo debe ser transferido a otras especies.

Criopreservación de embriones de erizo de mar

Caso modelo: *Sphaerechinus granularis*

1. **Obtención de gametos:** Para la criopreservación de esperma nuestra recomendación es la disección transversal del erizo y la obtención del esperma y huevos directamente de la gónada seccionada. La fertilización tiene lugar en agua de mar, en una proporción de 20 espermatozoides por huevo. Con una incubación a $17\pm 1^\circ\text{C}$ las blástulas tardan unas 6 horas en aparecer. Utilizaremos blástulas de 8 horas en este protocolo.
2. **Control de calidad previa a la criopreservación:** al igual que con el ejemplo anterior comprobamos que el material genético de inicio sea de calidad y que los huevos fertilizados se han transformado en blástulas en su mayoría.
3. **Selección de Agentes crioprotectores y preparación:** Dada la experiencia obtenida con la especificidad en la criopreservación de esperma se estudió el efecto del Dimetil sulfóxido (Me_2SO) que se usaba en el protocolo estándar de *P. lividus* con blástulas de 8 horas de *S. granularis*. El resultado es que esta especie es mucho más sensible y por tanto a la concentración de trabajo de 1.5M el porcentaje de larvas que se desarrollan de forma normal tras ser expuestas las blástulas a este compuesto es del 25%. Esto elimina el Me_2SO como una posibilidad para la criopreservación de *S. granularis* (Figura 7).

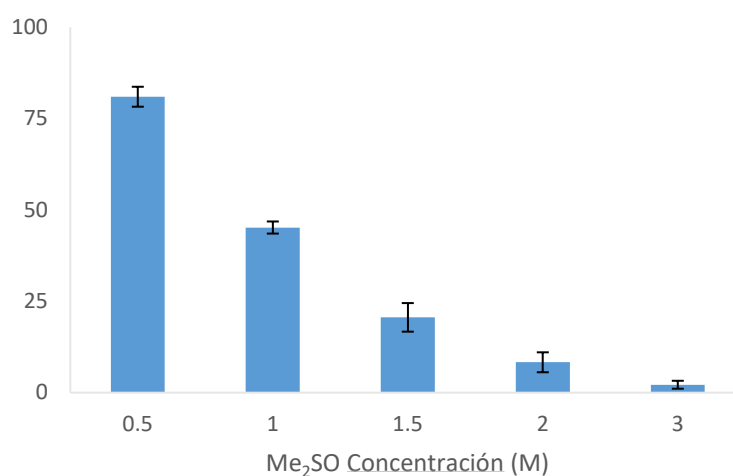


Gráfico 7.- Porcentaje de larvas normales a las 48 horas tras una exposición de 15 minutos de blástulas de *S. granularis* a Dimetil sulfoxido (Me_2SO) siguiendo la metodología de exposición en 15 pasos equimolares de 1 minuto descrito anteriormente para *P. lividus*.

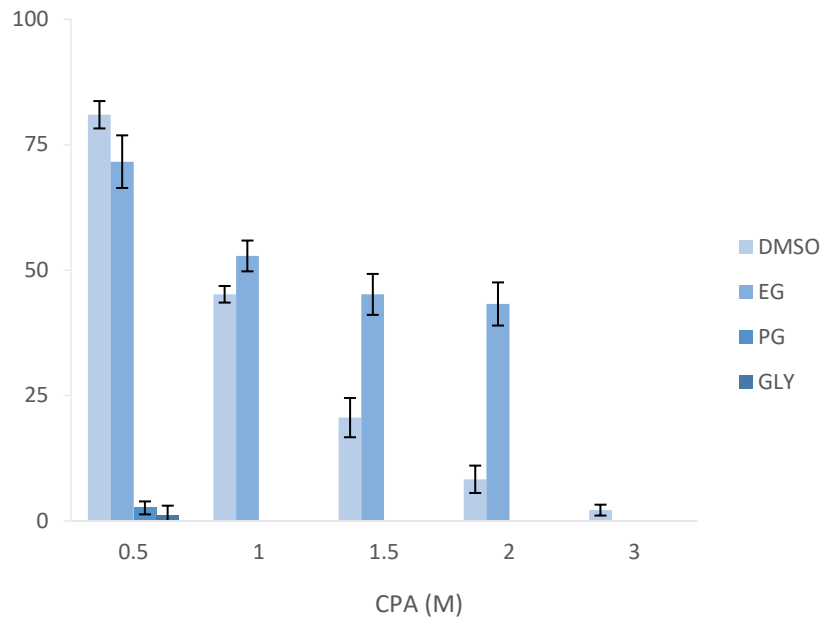
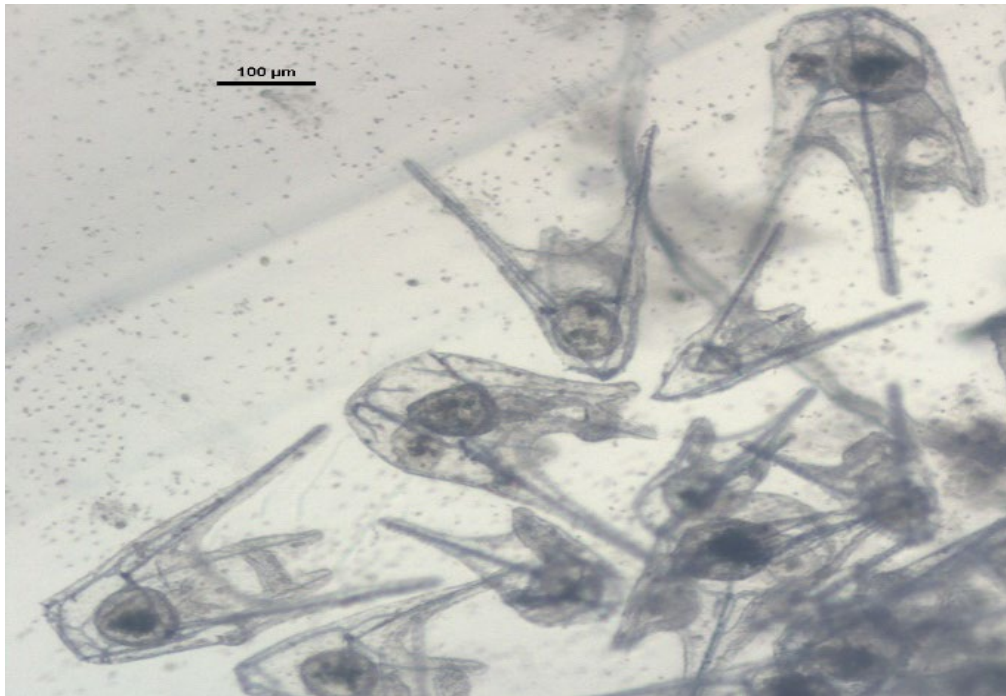


Grafico 8.- Un estudio de crioprotectores alternativos nos ha permitido localizar otro compuesto químico, el Etilen glicol (EG) que tiene una toxicidad menor y permite obtener un porcentaje de larvas normales tras su exposición del más del 50% hasta concentraciones de 2M.

4. **Criopreservación:** Protocolo seguido es el publicado en Bellas y Paredes 2011 tanto para la congelación como para la descongelación pero se utilizará Etilen glicol 1.5M dada su menor toxicidad.
5. **Calidad post-congelación:** Sorprendentemente no se consiguieron resultados con el Etilen glicol como crioprotector, ya hay antecedentes de esto en *P. lividus* donde Etilen glicol y propilen glicol tenían muy baja toxicidad pero ofrecían nula crioprotección para estas células. En un segundo experimento se hizo criopreservación con 1.5M de los cuatro crioprotectores de la gráfica 8 y sorprendentemente se consiguió obtener larvas a partir de blástulas criopreservadas con Glicerol (Gly) 1.5M (Figura 9). Este es un caso extremo ya que el glicerol es extremadamente toxico para esta especie, sin embargo ofrece una gran crioprotección. En la figura 9 podemos ver larvas de 120 horas desarrolladas de embriones criopreservados y se pueden observar algunas anomalías mosfoesqueléticas en las larvas, lo cual nos indica que la calidad del protocolo aún debe mejorarse. Esta es la primera vez que se criopreservan embriones de esta especie.



Conclusiones:

Es imprescindible conocer la toxicidad específica de los crioprotectores, sin embargo el éxito de un protocolo va a residir en el balance entre toxicidad y crioprotección. Esta es la primera vez que se criopreservan embriones de *S. granularis* y junto con *P. lividus* son las dos únicas especies en las que se han criopreservado de forma efectiva embriones. El protocolo aquí descrito aún necesita ser optimizado y en el siguiente paso se estudiarán los efectos a largo plazo y las aplicaciones.



Bibliografía para consultar:

J. Bellas, E. Paredes, Advances in the cryopreservation of sea-urchin embryos: potential application in marine water quality assessment, *Cryobiology*, 62 (2011), 174-180 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.02.005>

S. Campos, J. Troncoso, E. Paredes, Major challenges in cryopreservation of sea urchin eggs, *Cryobiology*, 98 (2021), 1-4 <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.11.008>

V. Gallego, J.F. Asturiano, Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 30 (2018), 820-832 <https://doi.org/10.1071/RD17460>

E. Paredes, J. Bellas, Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) cryopreserved embryos survival and growth: Effects of cryopreservation parameters and reproductive seasonality, *CryoLetters*, 35 (2014), 482-494

E. Paredes, J. Bellas, D. Costas, Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval rearing — Culture from cryopreserved embryos, *Aquaculture* 437, (2015), 366-369 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.12.022>

E. Paredes, Cryopreservation of marine invertebrate early-life stages: applications in marine quality assessment and aquaculture, Doctoral Thesis (2014)

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/raq.12253>

