

ANEXO 3: INFORMACIÓN SOBRE CALIDAD DEL ESPERMA

Obtención

Se obtuvo espermatozoides de las cuatro especies objetivo (*Scyliorhinus canicula*, *Scyliorhinus stellaris*, *Galeus melastomus*, *Raja montagui*) mediante necropsia, catéter insertado en la vesícula seminal o masaje abdominal (Figura 1).

Tras la obtención, el espermatozoides fue diluido en una relación 1:9 en una solución isosmótica e isotónica al plasma seminal.

Evaluación

Para determinar la calidad del espermatozoides se tuvo en cuenta la movilidad de las células y la integridad de su membrana tras realizar una tinción con yoduro de propidio y SYBR Green. Las muestras fueron observadas en una cámara de conteo bajo un microscopio de fluorescencia. La calidad de las muestras quedó determinada en función de:

- **Movilidad:** se contó el número de células moviéndose de manera regular, frente a aquellas inmóviles o moviéndose debido a la acción de otras células (arrastre). A mayor proporción de células móviles, mayor calidad de la muestra.
- **Supervivencia:** se contó el número de células con membrana celular intacta (teñidas de verde) frente a aquellas con membrana celular dañada (teñidas de rojo) tras la incubación con tinción de yoduro de propidio y SYBR Green (Figura 2). A menor proporción de células dañadas, mayor calidad de la muestra.

Resultados

Scyliorhinus canicula: La movilidad y supervivencia celular supera el 90% en todos los periodos reproductivos. Únicamente se obtuvieron muestras con valores inferiores (<20%) en un muestreo durante el mes de agosto, pero es atribuible al mal estado de conservación con el que los animales llegaron al laboratorio tras la jornada de pesca.

Scyliorhinus stellaris: La movilidad y supervivencia celular supera el 80% en todos los periodos reproductivos. Cabe destacar que se trata de animales mantenidos en cautividad y que uno de ellos, que reiteradamente mostraba niveles de movilidad y supervivencia por debajo de la media (<60%), tuvo que ser retirado del estudio por mostrar una sepsis generalizada.

Galeus melastomus: La movilidad y supervivencia celular supera el 90% en todos los periodos reproductivos. Todas las muestras procedían del descarte pesquero.

Raja montagui: La movilidad y supervivencia celular supera el 90% en todos los periodos reproductivos.

Morfología y características

Los espermatozoides de todas las especies analizadas presentan un flagelo, una pieza media y una cabeza helicoidal (Figura 3). El número de giros que posee la cabeza del espermatozoides es variable en función de la especie, siendo un criterio diferenciador entre miembros de distintos grupos filogenéticos. Todas las especies analizadas hasta la fecha agrupan sus espermatozoides en unas estructuras específicas denominadas espermatozeugma (Figura 4). En ellas, los

espermatozoides se mantienen unidos formando una masa con las cabezas apuntando en un mismo sentido, hacia el interior, y el flagelo dispuesto hacia el exterior. Con el tiempo y los medios de dilución adecuados estas estructuras se disgregan y los espermatozoides nadan libremente.

Figuras



Figura 1: Extracción de esperma en *S. canicula* mediante sonda hasta la vesícula seminal

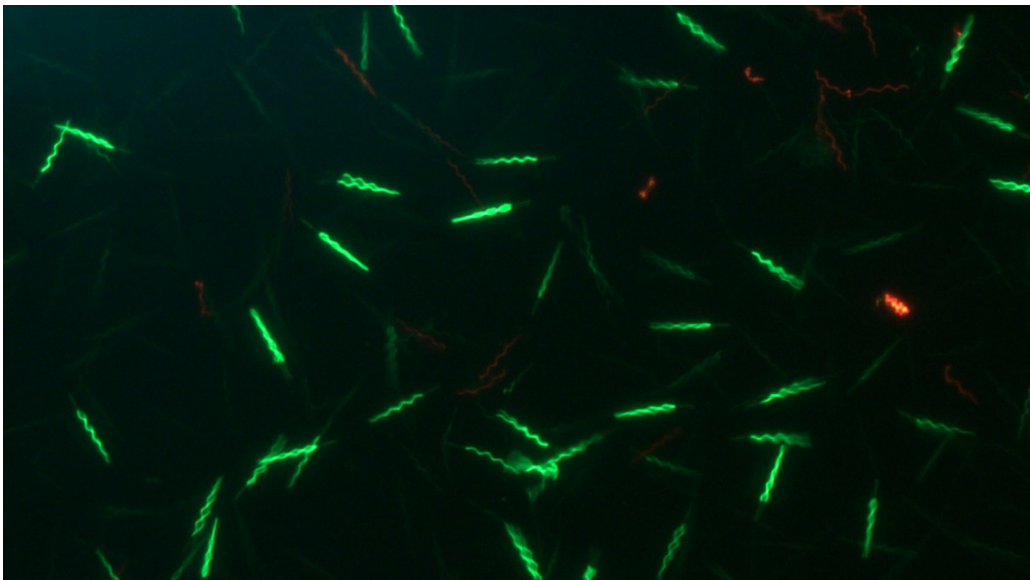


Figura 2: Resultado de la tinción de una muestra fresca de esperma de *Raja montagui* para observar su supervivencia (teñidas en verde las células vivas).

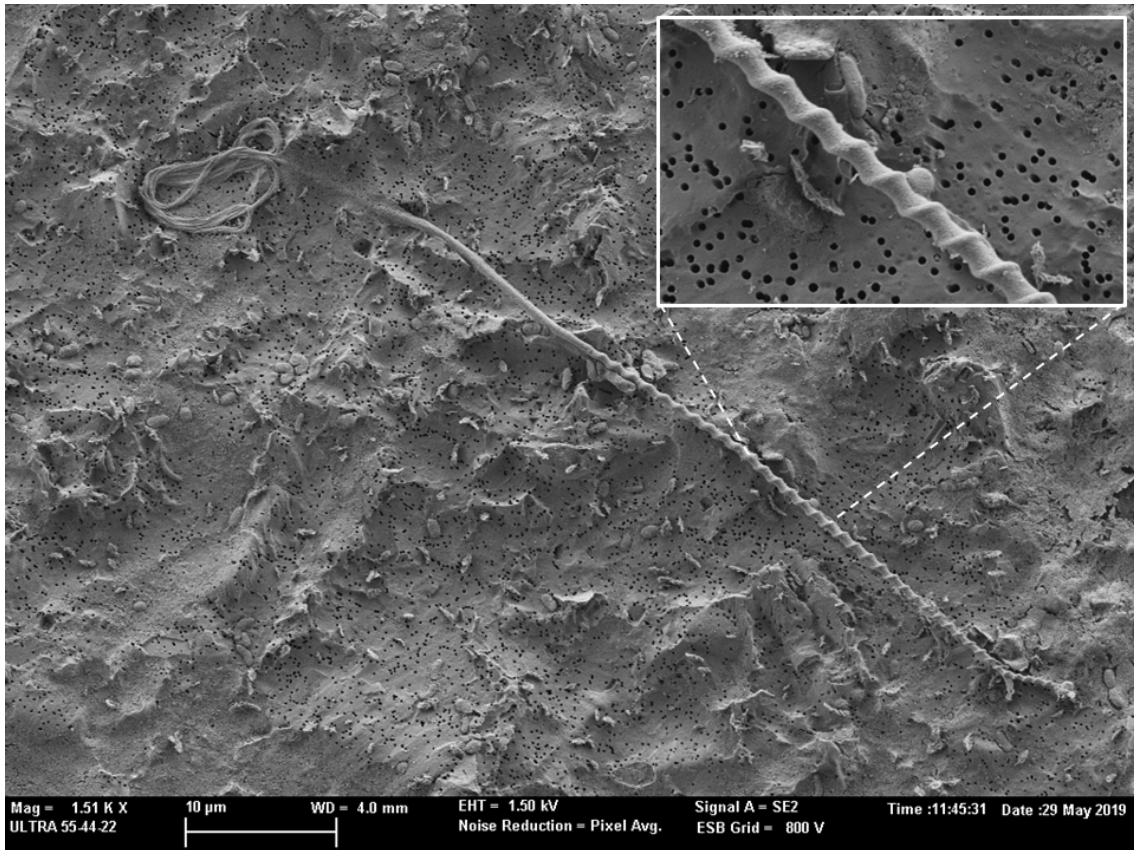


Figura 3. Espermatozoides de *S. canicula*. Se aprecia la morfología general y se muestra en detalle la estructura helicoidal de la cabeza.

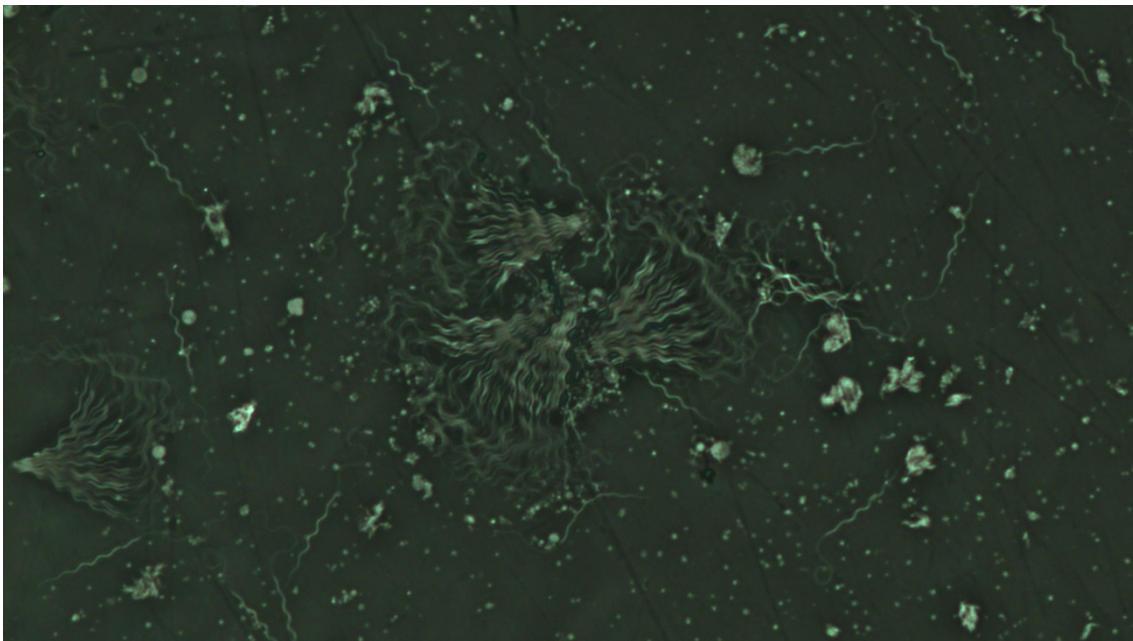


Figura 4: Muestra de esperma de *Raja montagui* donde aparecen tanto espermatozeugmas como espermatozoides libres.