

ANEXO 4: INFORMACIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL ESPERMA POST-TRATAMIENTO

Procedimiento

Se obtuvo esperma de las cuatro especies objetivo (*Scyliorhinus canicula*, *Scyliorhinus stellaris*, *Galeus melastomus*, *Raja montagui*) mediante necropsia, catéter insertado en la vesícula seminal o masaje abdominal. Tras la obtención, el esperma fue diluido hasta obtener una concentración adecuada en función de cada protocolo a realizar. Las distintas proporciones (expresadas en partes totales del volumen total) de crioprotectores y de muestras, utilizadas en cada protocolo, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Partes de cada elemento empleado en los diversos protocolos.

	Muestra		Crioprotector		
	ESPERMA	DILUYENTE	DMSO	METANOL	HUEVO
Protocolo 1	1	8	0	1	0
Protocolo 2	1	8	1	0	0
Protocolo 3	1	7	0	0	2
Protocolo 4	1	7	0,5	0,5	1
Protocolo 5	1	7	0	1	1
Protocolo 6	1	7	1	0	1

Una vez preparadas las muestras, los criotubos se introducían en un recipiente isotérmico con nitrógeno líquido para su congelación (Figura 1).

Evaluación

Del mismo modo que para la evaluación de la calidad espermática (ver anexo 3), para determinar la calidad del esperma 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. Antes y después de realizar el protocolo de criopreservación, 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 frente a aquellas con membrana celular dañada tras la adición de tinción de yoduro de propidio y SYBR Green (Figura 2). A menor proporción de células dañadas, mayor calidad de la muestra.

Resultados

Scyliorhinus canicula: Los espermatozoides de tiburón son muy sensibles a la congelación. Para que sea exitosa en alguna medida, se requiere la adición de un crioprotector externo (yema de huevo de gallina). De lo contrario, la movilidad y supervivencia celular no supera el 10%. La

incorporación del crioprotector externo aumenta la movilidad post-congelación del esperma hasta el 35%.

Scyliorhinus stellaris: Del mismo modo que en *S. canicula*, los espermatozoides de esta especie son muy sensibles a la congelación. Para que sea exitosa en alguna medida, se requiere la adición de yema de huevo de gallina como crioprotector externo. De lo contrario, la movilidad y supervivencia celular no supera el 10%. La incorporación del crioprotector externo aumenta la calidad del esperma hasta el 35%. Figura 2.

Galeus melastomus: Mismos comentarios que los anteriores.

Raja montagui: La movilidad y supervivencia celular post-congelación superó el 35% con prácticamente todos los protocolos empleados. El esperma de raya es, por tanto, sustancialmente más sencillo de congelar que el de los tiburones.

Figuras

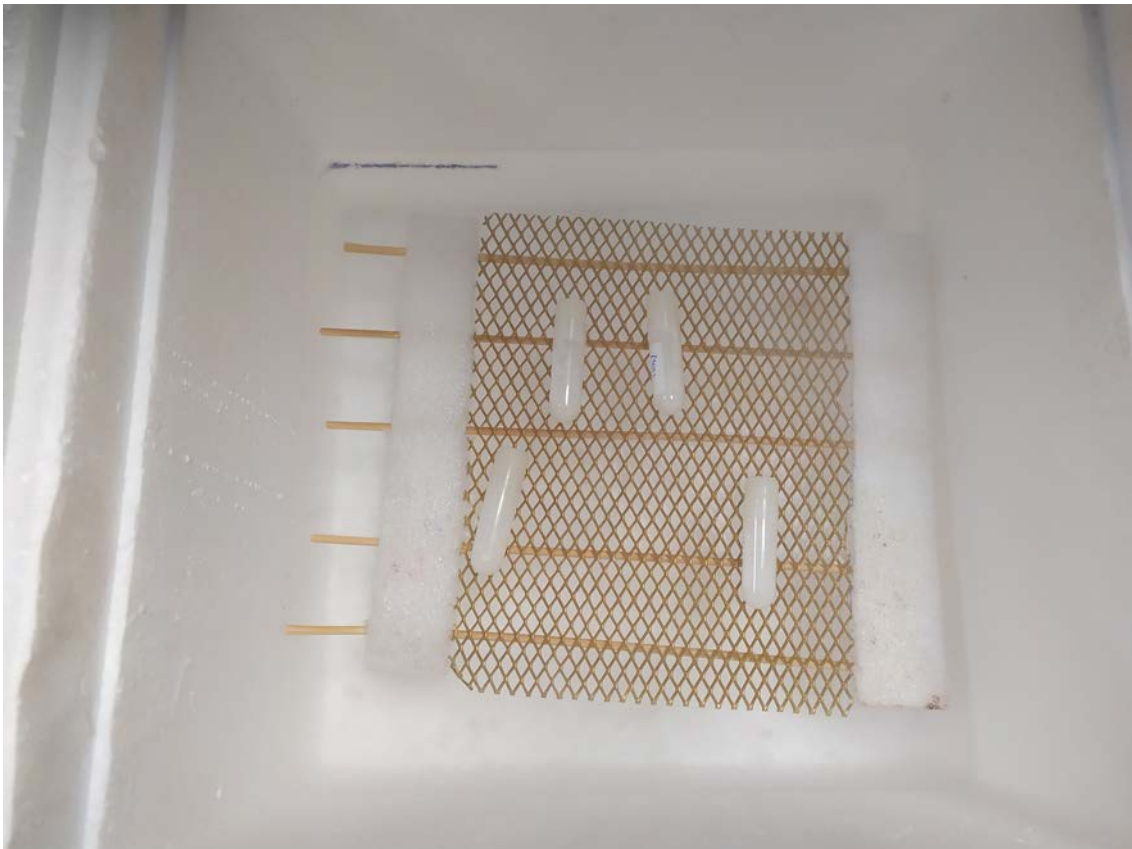


Figura 1. Criotubos conteniendo esperma diluido y crioprotectores suspendidos sobre nitrógeno líquido para su congelación con el vapor desprendido.

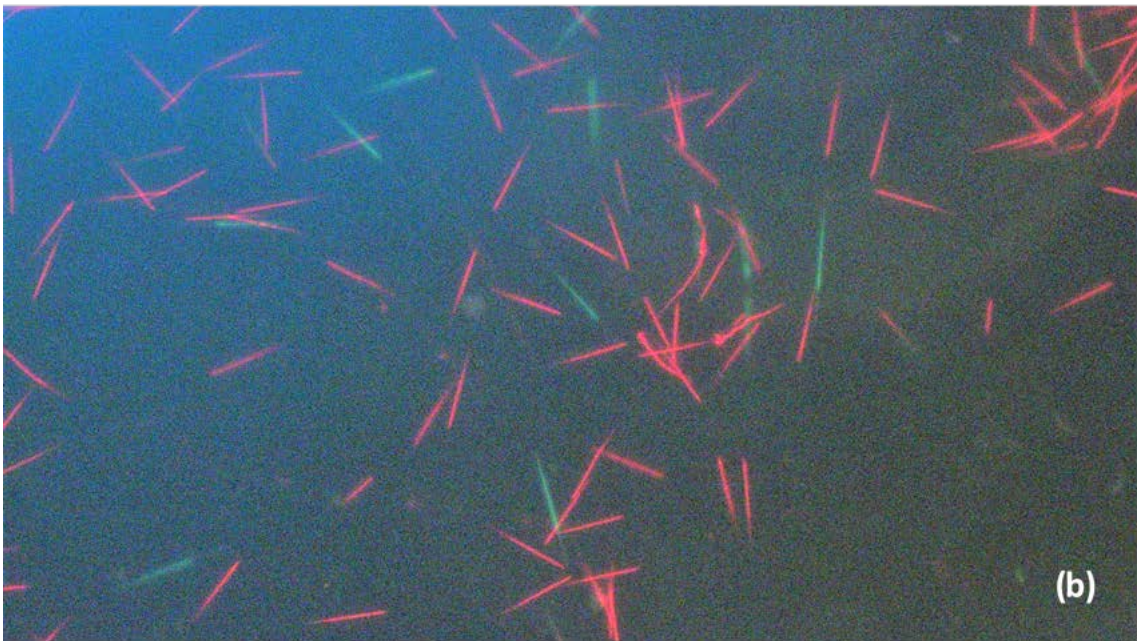
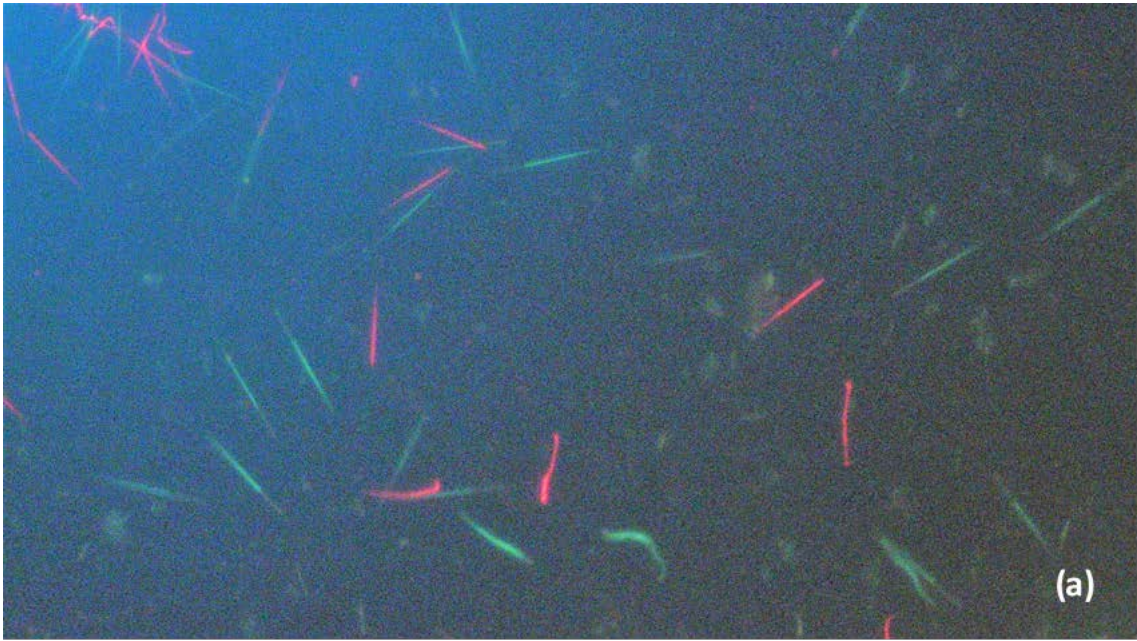


Figura 2: Esperma de *S. stellaris* previamente (a) y posteriormente (b) a la criopreservación empleando el Protocolo 4.