

RESUMEN

En las últimas décadas, la anguila europea *Anguilla anguilla* ha sufrido una disminución drástica de su población lo que ha llevado su inclusión como especie en peligro crítico en la lista roja UICN. Esta situación, junto con la gran importancia comercial de esta especie, evidencia la necesidad de tomar acciones como el desarrollo de la reproducción en cautividad y el control de la pesca. Una de las herramientas más interesantes para su uso en la biología de la conservación es la criopreservación de espermatozoides, que presenta varias ventajas para esta especie, incluyendo la sincronización de gametos, la selección de líneas genéticas o su uso para la creación de un criobanco.

Sin embargo, el desarrollo de protocolos de criopreservación necesariamente requieren espermatozoides de buena calidad. Además, se necesita un método preciso para evaluar la calidad del espermatozoides tanto antes como después de la criopreservación. Sobre esta última cuestión, la motilidad de los espermatozoides de los peces se considera uno de los mejores biomarcadores para la evaluación de la calidad de los espermatozoides en los peces, y se puede estudiar de forma subjetiva u objetiva utilizando sistemas "computer assisted sperm analysis" (CASA-Mot).

Primero, se realizó un experimento para evaluar la precisión y la exactitud de ambos métodos para estudiar la motilidad del espermatozoides: el método subjetivo y la técnica objetiva que utiliza el sistema CASA-Mot. Además, se probó si el grado de experiencia de los técnicos en el caso del método subjetivo tiene un efecto en la precisión de la estimación de la motilidad y, por lo tanto, hay una influencia del personal del laboratorio en la evaluación de la motilidad del espermatozoides. Aquí concluimos que tanto el método como la experiencia técnica eran factores clave para evaluar con precisión la motilidad del espermatozoides en la anguila europea, por lo que se requiere el uso de CASA-Mot junto con material calificado para obtener resultados fehacientes.

En segundo lugar, se evaluaron métodos alternativos para la maduración de los machos de anguila europeos probando dos tratamientos hormonales diferentes: OVI, una gonadotropina recombinante; y VET, una gonadotropina purificada a partir de orina femenina. Después de elegir el mejor tratamiento hormonal de los dos, se evaluó el efecto de tres dosis diferentes con el objetivo de obtener el mayor rendimiento al menor coste. Los resultados de este experimento apuntaron a OVI como el mejor tratamiento hormonal en una dosis semanal de 1.5 UI/gr de pez, que proporciona la mayor rentabilidad, obteniendo espermatozoides de alta calidad a menor precio.

En un tercer experimento, y utilizando los conocimientos adquiridos en los dos primeros experimentos, se realizaron una serie de experimentos para estandarizar los protocolos de criopreservación de espermatozoides de anguila europea disponibles en ese momento (utilizando DMSO o metanol como crioprotector). Los resultados apuntaron al protocolo que utiliza el metanol como el mejor de ellos dos en términos de motilidad, velocidad y viabilidad de los espermatozoides y la preservación de la integridad del ADN.

Siguiendo este último método estandarizado, se realizó un cuarto experimento con el objetivo de mejorar el protocolo en términos de volumen (volúmenes de espermatozoides más grandes) y de calidad espermática. Además, se desarrolló un protocolo simple de almacenamiento a corto plazo para complementar las opciones de preservar el espermatozoides durante diferentes períodos de tiempo. De todas las condiciones de almacenamiento probadas, las diluciones 1/50 a 4 °C mostraron los mejores resultados, manteniendo la motilidad en comparación con el control

durante 3 días, y manteniendo cierta motilidad espermática (12%) después de 7 días. A partir del experimento de criopreservación, fue posible aumentar los volúmenes a 2 y 5 mL sin perder la calidad del esperma en comparación con volúmenes más pequeños. Además, el protocolo se mejoró aún más al complementarlo con yema de huevo como aditivo, obteniendo la mayor motilidad espermática criopreservada (más del 50%) jamás registrada en la anguila europea.

El último capítulo de esta tesis consiste en una revisión histórica de todo el trabajo llevado a cabo en criopreservación de esperma de anguilas, donde se describe en detalle la evolución de los diferentes protocolos desarrollados desde principios de siglo en la anguila japonesa y europea. En este, se incluyen los últimos resultados presentados en capítulos anteriores, lo que pone en perspectiva nuestros avances en criopreservación de esperma de anguila.