



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Optimización de los protocolos de conservación de gametos de anguila europea a corto y largo plazo

Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología

Presentado por:

María Teresa Ortiz Casanova

Dirigido por:

Víctor Gallego Albiach

Juan F. Asturiano

Curso académico: 2020/2021

Valencia, 15 de junio de 2021



Título: Optimización de los protocolos de conservación de gametos de anguila europea a corto y largo plazo

Alumna: Dña. M^a Teresa Ortiz Casanova

Tutor: D. Víctor Gallego Albiach **Cotutor:** D. Juan F. Asturiano

Valencia, 15 junio de 2021

Resumen

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie de elevado interés pesquero y una de las especies importantes para la acuicultura mundial, pero su producción actual todavía depende de las capturas de angulas en el medio natural. Catalogada actualmente como especie en peligro de extinción, la reproducción *ex situ* se presenta como un elemento clave para su conservación.

La maduración en cautividad de esta especie requiere tratamientos hormonales largos y costosos que, en muchas ocasiones, conducen a una maduración asincrónica entre sexos. En este sentido, la optimización de los métodos de almacenamiento de esperma a corto y largo plazo pueden ser un factor clave a la hora de optimizar los procesos de fertilización *in vitro*. Durante el presente trabajo se llevaron a cabo una serie de experimentos con el objetivo de i) mejorar los protocolos existentes de conservación de gametos a corto plazo; y de ii) optimizar los protocolos de criopreservación gametos utilizados en la actualidad.

Para el experimento de almacenamiento a corto plazo se probaron diferentes ratios de dilución (1:9 *versus* 1:49), diferentes temperaturas de almacenamiento (4 °C *versus* 20 °C), y el mantenimiento de la muestra en agitación o sin agitación. Las muestras se almacenaron durante 7 días y se evaluaron distintos parámetros cinéticos a diferentes tiempos. Los resultados mostraron que la calidad del esperma no mostró diferencias significativas durante las primeras 24 h entre ambos ratios de dilución. Sin embargo, el ratio de dilución 1:49 mostró mejores resultados en tiempos de almacenamiento superiores. En este sentido, los resultados sugieren que para una conservación mayor de 48 h es recomendable diluir el esperma a 1:49 y conservarlo a una temperatura de 4 °C.

En los experimentos de criopreservación, se evaluaron diferentes viales de congelación (pajuelas *versus* criotubos), diferentes rampas de congelación y descongelación y, finalmente, diferentes combinaciones de crioprotectores (metanol, FBS, BSA y yema de huevo). La combinación de metanol (10%) y yema de huevo (5%) como medio de congelación generó los mejores resultados tras la descongelación, y algunas muestras alcanzaron valores de más del 50% de motilidad. Además, también se validó la congelación en viales de grandes volúmenes (criotubos de 2 y 5 ml), sin diferencias significativas respecto a las muestras criopreservadas en pajuelas (0,5 mL).

Por tanto, el presente trabajo describe i) un método simple para la conservación a corto plazo de esperma de anguila europea durante un máximo de 7 días, ii) y un protocolo de criopreservación que mejora los resultados obtenidos en estudios previos y que aplicable en grandes volúmenes para su uso a escala comercial.

Palabras clave: *Anguilla anguilla*; criopreservación; esperma; reproducción; peces; motilidad.

Title: European eel sperm storage: Optimization of short-term protocols and cryopreservation in large volumes.

Student: Dña. M^a Teresa Ortiz Casanova

Supervisor: D. Víctor Gallego Albiach **Cosupervisor:** D. Juan F. Asturiano

Valencia, 15 June 2021

Abstract

European eel (*Anguilla anguilla*) is a species of high fishing interest and one of the most important for worldwide aquaculture. However, its current production still depends on the capture of glass eels from the wild. Currently catalogued as an endangered species, *ex situ* reproduction is presented as a key element for its conservation.

Maturation in captivity of this species requires long and costly hormonal treatments that, in many cases, lead to an asynchronous maturation between sexes. In consequence, optimization of sperm short-term and long-term storage methods can be a key factor for improving *in vitro* fertilization processes. During the work, some experiments were carried out with the objective of i) improving the existing short-term gamete conservation protocols, and ii) optimizing the cryopreservation protocols currently used.

For the short-term storage experiment, samples were diluted at different ratios (1:9 versus 1:49), were preserved at different temperatures (4 °C versus 20 °C) and were kept in constant agitation or still. Samples were stored for 7 days and different kinetic parameters were evaluated at different times. The results showed that the quality of the sperm did not show significant differences during the first 24 h between both dilution ratio. However, the 1:49 dilution ratio showed better results in longer storage times. In this sense, the results suggest that for longer conservation than 48 h it is desirable to dilute the sperm at 1:49 and keep it at a temperature of 4 °C.

In the cryopreservation experiments, different freezing vials (straws versus cryotubes), different freezing and thawing ramps and, finally, different combinations of cryoprotectants (methanol, FBS, BSA and egg yolk) we evaluated. The combination of methanol (10%) and egg yolk (5%) as a freezing medium generated the best results after thawing, and some samples reached values of more than 50% of motility. Also, freezing in large volume vials (2 and 5 ml cryotubes) was also validated, without significant differences concerning the cryopreserved straws (0,5 mL) samples.

Therefore, the present work describes i) a simple method for the short-term conservation of European eel sperm for a maximum of 7 days, and ii) a cryopreservation protocol that improves the results obtained in previous studies and that can be applied in large volumes for its use on a commercial scale.

Key words: *Anguilla anguilla*; cryopreservation; sperm; reproduction; fish; motility.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecerle a mi tutor Víctor Gallego por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su infinita paciencia y por haberme transmitido la pasión por la biotecnología azul, las anguilas y los petirrojos. Gracias también a mi cotutor Juan Asturiano, por su dedicación y por haber hecho que este trabajo sea posible, y a Iraida, mi mentora en el laboratorio, por su ayuda y sus sabios consejos que me arrancaron más de una carcajada.

En el terreno más personal, quisiera darle las gracias a Sara, por no faltarme nunca y por conseguir levantarme el ánimo siempre a base de videollamadas y canciones de Queen. Y, cómo no, a mis "Girasolis", Dani, David y Yolanda, por su apoyo constante, por su confianza y por recorrer este camino conmigo desde el principio y hasta el final.

Y, sobretodo, gracias a mi familia por creer en mí y no soltarme nunca de la mano. Va por vosotros.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ANGUILA EUROPEA.....	1
1.2 ESTATUS ACTUAL DE LA ESPECIE: POBLACIÓN, PESCA Y ACUICULTURA	2
1.3 EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN: ÚNICA ALTERNATIVA SOSTENIBLE.....	3
1.4 MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE GAMETOS.....	3
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS	6
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	6
3.2 INDUCCIÓN HORMONAL Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESPERMA.....	6
3.3 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.....	7
3.4 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD.....	7
3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	7
3.5.1 Almacenamiento a corto plazo	8
3.5.2 Almacenamiento a largo plazo: criopreservación.....	8
3.6 PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN	8
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
4. RESULTADOS	10
4.1 ALMACENAMIENTO A CORTO PLAZO.....	10
4.2 ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO (CRIOPRESERVACIÓN).....	11
4.2.1 Criopreservación en diferentes viales.....	11
4.2.2 Criopreservación con aditivos	13
5. DISCUSIÓN	14
5.1 PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO	14
5.2 PRESERVACIÓN A LARGO PLAZO: CRIOPRESERVACIÓN.....	16
6. CONCLUSIONES	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporción volumétrica de los componentes de la disolución de criopreservación. Los aditivos corresponden a albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) y yema de huevo. Todos los volúmenes están representados como mL de un volumen final de 10 mL..... 9

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del ciclo biológico de la anguila europea	1
Figura 2. Capturas mundiales de anguila europea y producción mundial de anguila europea mediante acuicultura	2
Figura 3. Esquema del proceso de conservación de gametos a largo plazo y posibles aplicaciones	4
Figura 4. Inyección semanal de la gonadotropina coriónica humana recombinante (hCGrec)....	6
Figura 5. Realización de masaje abdominal (<i>stripping</i>) y recolección de muestra de esperma....	7
Figura 6. Proceso de criopreservación de criotubos siguiendo una rampa de congelación.....	9
Figura 7. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) de las dos diluciones experimentales (1:9 y 1:49) a diferentes tiempos de almacenamiento (1, 24, 48, 72 horas y 7 días). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las diluciones y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control	10
Figura 8. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) en diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura y en agitación o estático) a diferentes tiempos (1, 24, 48, 72 horas y 7 días). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las diluciones y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control	11
Figura 9. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) en diferentes condiciones de criopreservación (pajuela <i>versus</i> criotubo, altura de enfriamiento y tiempo de enfriamiento). Las diferentes letras indican diferencias significativas	12
Figura 10. Viabilidad de los espermatozoides de muestras de esperma frescas y descongeladas en diferentes condiciones de criopreservación (pajuela/ tamaño del tubo, altura de enfriamiento y tiempo de enfriamiento). Las distintas letras indican diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad	12
Figura 11. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) de muestras frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo). Las distintas letras indican diferencias significativas.....	13
Figura 12. Datos de viabilidad de muestras de esperma frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo) o sin ellos (control). Las distintas letras indican diferencias significativas	13
Figura 13. Resultados de los análisis de motilidad transcurridas 24 horas de muestras de esperma frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo) o sin ellos (metanol (MeOH)). Las distintas letras indican diferencias significativas	14

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina de suero fetal
CPE	Extracto de hipófisis de carpa
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBS	Suero fetal bovino
hCG	Gonadotropina coriónica humana
hCGrec	Gonadotropina coriónica humana recombinante
IGS	Índices gonadosomáticos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LN ₂	Nitrógeno Líquido
MeOH	Metanol
MOT	Motilidad
pMOT	Motilidad progresiva
VAP	Velocidad de trayectoria media

1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ANGUILA EUROPEA

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es un pez teleosteo perteneciente a la familia *Anguillidae*, que cuenta únicamente con el género *Anguilla*. Las 19 especies que forman este género se encuentran distribuidas en los Océanos Atlántico, Pacífico e Índico, y en el caso de la anguila europea, su área de distribución abarca todo el Mediterráneo y el Atlántico oriental.

Este pez, típico de aguas continentales europeas, es una especie catádroma que destaca por tener un ciclo de vida muy complejo, el cual comprende tanto migraciones transoceánicas como diversos procesos de metamorfosis (Figura 1). Gracias a las expediciones que realizó hace cien años el biólogo danés Johannes Schmidt, quien encontró larvas de leptocéfalos en el Mar de los Sargazos, se descubrieron las migraciones de esta especie, así como los primeros conocimientos sobre su ciclo de vida (Van Ginneken y Maes, 2005).

La primera migración trasatlántica tiene una duración de unos 8 o 9 meses, la realizan en forma de larvas desplazándose hacia el este, empujadas por la Corriente del Golfo y la Corriente del Atlántico norte, a Europa y el norte de África (Feunteun, 2002). A su término, sufren una metamorfosis convirtiéndose en angulas, que nadan adentrándose en aguas interiores de Europa y del norte de África.

Una vez alcanzados los 30 cm de longitud pasan a denominarse anguilas amarillas. Continúan creciendo durante un periodo prolongado de tiempo (entre 8 y 15 años los machos; y 10 y 18 años las hembras) en función de la latitud. Una vez finalizada esta etapa, estos especímenes metamorfosean en anguilas plateadas, preparándose así para dejar las aguas continentales y realizar una nueva migración trasatlántica hasta el Mar de los Sargazos, donde alcanzan su madurez sexual y finalizan su ciclo de vida (van den Thillart *et al.*, 2009). El inicio de la migración se produce en otoño, y debido a que las larvas más pequeñas se suelen encontrar desde el mes de febrero hasta el mes de mayo, se estima que esta segunda migración se completa en unos 80-170 días (Righton *et al.*, 2016).



Figura 1. Diagrama del ciclo biológico de la anguila europea (imagen modificada de EPGGráficos).

1.2 ESTATUS ACTUAL DE LA ESPECIE: POBLACIÓN, PESCA Y ACUICULTURA

La población mundial de la anguila europea se encuentra en una situación crítica. Esta especie lleva sufriendo un fuerte declive desde 1980 y, actualmente, figura en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (Bolland *et al.*, 2019). La sobrepesca (tanto en su fase de angula como en su fase adulta), junto con otros factores como la contaminación, la construcción de barreras que impiden su migración, la pérdida de hábitat, el cambio climático, etc., han sido la causa de este marcado descenso poblacional (ICES 2019). De acuerdo con los estudios llevados a cabo por la FAO, esta especie que en 1950 constituía el 7.5% de los desembarques totales de aguas interiores, se vio reducida al 1.5% en el año 2010. Asimismo, el nivel de pesca también se ha visto comprometido, disminuyendo hasta el 10% en relación con la cantidad capturada medio siglo atrás (Dekker y Beaulaton, 2016). Debido a la gravedad del problema, en 2007, la Unión Europea tomó medidas y elaboró un plan de protección y recuperación para la anguila denominado “Reglamento de la anguila” (CE nº 1100/2007 del Consejo). En él se recogía que los estados miembros debían de desarrollar planes de gestión con la finalidad de reducir la mortalidad antropogénica de la especie y permitir así la migración y el desove de al menos el 40% de la población (Dekker, 2016).

A pesar de su delicado estatus de conservación, la anguila europea sigue siendo una especie de elevado interés acuícola a nivel mundial (Figura 2), con una elevada producción en el contexto de la acuicultura europea (7760 Tm, FAO 2018). A pesar de que su consumo se extiende desde países del Mediterráneo (España, Francia o Italia) hasta las regiones escandinavas (Noruega, Suecia o Dinamarca), es en el continente asiático (principalmente en Japón) donde la anguila se presenta como un producto estrella de la gastronomía, y donde se consume la mayor parte de la producción mundial.

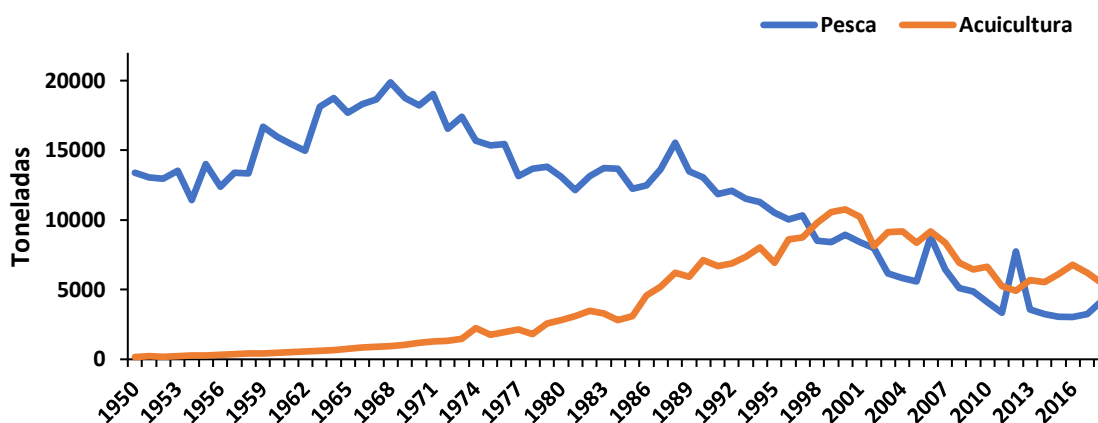


Figura 2. Capturas mundiales de anguila europea y producción mundial de anguila europea mediante acuicultura (FAO 2004-2021).

No obstante, la piscicultura de anguilas se presenta como una actividad no sostenible en el tiempo, debido fundamentalmente a que las empresas dependen del abastecimiento de juveniles (angulas) para su engorde hasta talla comercial. En este sentido, la reproducción en cautividad se presenta como una pieza clave para su conservación, lo que ayudará a reducir la presión sobre las poblaciones naturales, facilitará el abasteciendo a las piscifactorías, e incluso podría permitir repoblaciones en zonas en las que históricamente se localizaba la anguila.

1.3 EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN: ÚNICA ALTERNATIVA SOSTENIBLE

Uno de los problemas fundamentales en la producción de cualquier especie acuícola es el abastecimiento de alevines de forma regular y sostenible en el tiempo. A pesar del interés económico y medioambiental, actualmente todavía no se ha podido completar el ciclo reproductivo de la anguila en cautividad, debido principalmente a las particularidades de su migración transoceánica y al desconocimiento de las condiciones reales de freza en el Mar de los Sargazos. Dado que esta especie no madura espontáneamente en cautividad, es necesario la administración de hormonas para inducir la maduración sexual y obtener gametos de buena calidad en ambos sexos. Los primeros experimentos de inducción hormonal de la maduración en la anguila europea se realizaron por Fontaine *et al.* (1964) en el Museo Nacional de Historia Natural de París. Por primera vez se obtuvieron huevos maduros de anguila aplicando tratamientos de extractos de hipófisis de carpa. Desde entonces cabe destacar algunos estudios como el Boëtius *et al.* (1980) en el que, aplicando tratamientos combinados de gonadotropina coriónica humana (hCG, del inglés *human chorionic gonadotropin*) y extracto de hipófisis de carpa (CPE), lograron inducir índices gonadosomáticos (IGS) máximos de 60.7%.

1.4 MÉTODOS DE PRESERVACIÓN DE GAMETOS

En el ámbito acuícola, la conservación de gametos puede generar ventajas como *i)* la sincronización de la disponibilidad de gametos de ambos sexos, *ii)* el transporte de gametos entre instituciones, *iii)* el almacenamiento de germoplasma para programas de selección genética o conservación de especies, etc. (Cabrita *et al.*, 2010; Martínez-Páramo *et al.*, 2017) (Figura 3). Existen dos tipos de preservación de gametos: la preservación a corto plazo y la preservación a largo plazo. En cuanto a la preservación a corto plazo, esta se basa en el almacenamiento de la muestra espermática a temperaturas bajas, pudiendo mantener la calidad del esperma durante un tiempo corto limitado. Por otro lado, la preservación a largo plazo o criopreservación se basa en el almacenamiento de las células a temperaturas extremadamente bajas para disminuir las funciones vitales de las células con el objetivo de mantener su calidad durante un largo periodo de tiempo.

Conservación de gametos a corto plazo

Diversos grupos de investigación se han dedicado a estudiar los efectos que tenían de las diferentes condiciones de almacenamiento sobre el esperma de la anguila europea, a temperaturas superiores al punto de congelación (Peñaranda *et al.*, 2010a,b). En estos estudios se observó que la motilidad de los espermatozoides se preservaba correctamente durante un tiempo superior a 3 días, e incluso más de una semana si se limitaba la presencia de aire (Peñaranda *et al.*, 2010a). Para el correcto almacenamiento del esperma, este se suele conservar a bajas temperaturas para prevenir el crecimiento de microorganismos. Asimismo, estos gametos se diluyen en un medio que recrea la composición fisiológica del plasma seminal de la anguila, permitiendo así mantener las capacidades del espermatozoide por un mayor tiempo. No obstante, los peces constituyen un grupo de vertebrados muy diverso, cuyas diferencias alcanzan también a las características de los gametos, siendo necesario el desarrollo de un protocolo de preservación característico para cada especie (Asturiano *et al.*, 2017).

Conservación de gametos a largo plazo

La criopreservación ha demostrado ser el método ideal para preservar el esperma durante un largo periodo de tiempo, pudiendo llegar a mantener la calidad de los espermatozoides durante muchos años (Fabbrocini *et al.*, 2015). Esta técnica se basa en la conservación del material biológico en nitrógeno líquido a temperaturas sumamente bajas (-196 °C) para conservar la viabilidad de los gametos. No obstante, se trata de una técnica difícil de aplicar puesto que, para lograr una criopreservación exitosa, las células deben superar factores de estrés a los que son sometidas, como la deshidratación y la presión mecánica (Raju *et al.*, 2020).

A la hora de poner en práctica este método, se suelen usar agentes crioprotectores, que son totalmente necesarios para lograr una correcta criopreservación (Cloud y Patton, 2009). Estos son capaces de minimizar el daño causado a las células inhibiendo la formación de hielo, preservando las membranas y promoviendo la vitrificación. Entre estos compuestos, los más usados son el glicerol y el dimetilsulfóxido (DMSO). No obstante, aunque los crioprotectores presentan muchas ventajas, se trata de compuestos muy tóxicos para las células lo que dificulta a su vez su uso (Raju *et al.*, 2020). También se suelen emplear protectores de membrana como azúcares, albúmina de suero bovino (BSA) o yema de huevo, permitiendo mantener la integridad de las células (Cabrita *et al.*, 2010; Martínez-Páramo *et al.*, 2017).

Otro factor que juega un gran papel en la criopreservación es la velocidad de enfriamiento. A una velocidad baja de enfriamiento, las células estarán expuestas a elevadas concentraciones de solutos lo cual provocará una deshidratación que puede llegar a ser letal para las células. No obstante, a una velocidad de enfriamiento demasiado alta, se formará hielo intracelular lo cual tiene un efecto letal. Teniendo en cuenta estos dos fenómenos, la hipótesis de los dos factores propone que debe existir una velocidad de enfriamiento que consiga maximizar la viabilidad de las células criopreservadas (Raju *et al.*, 2020).

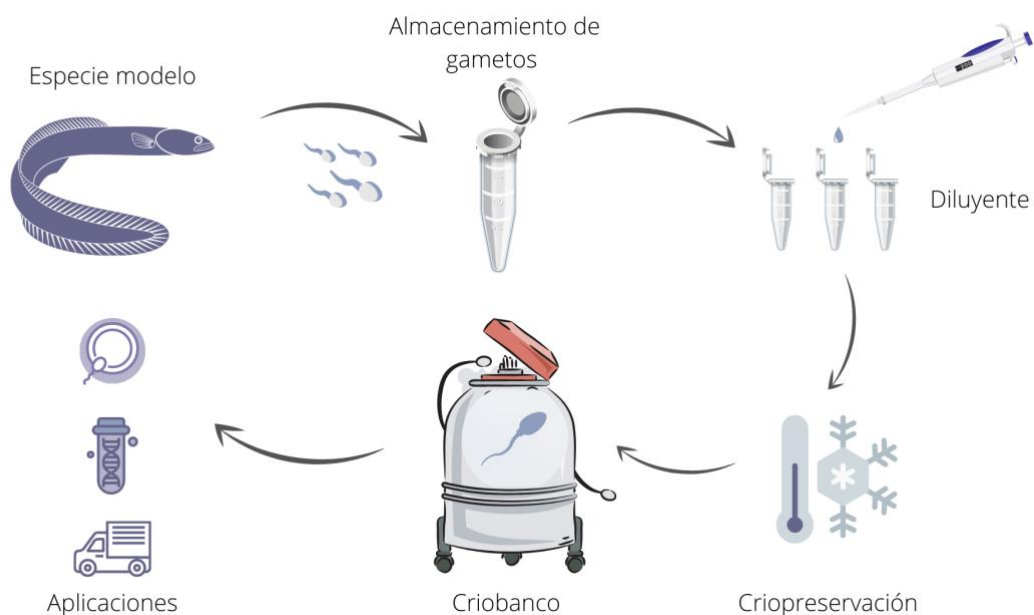


Figura 3. Esquema del proceso de conservación de gametos a largo plazo y posibles aplicaciones.

Como se ha explicado anteriormente, las características morfológicas y biológicas de los espermatozoides varían entre las distintas especies, por lo que es conveniente desarrollar un protocolo de criopreservación específico adaptado a cada una de ellas (Asturiano *et al.*, 2017). En el caso de la anguila europea, diversos grupos de investigación han trabajado en desarrollar protocolos de criopreservación de esperma (Asturiano *et al.*, 2003, 2004; Herranz-Jusdado *et al.*, 2018a; Müller *et al.*, 2004; Peñaranda *et al.*, 2009; Szabó *et al.*, 2005). Además, se ha llegado incluso a efectuar una correcta fertilización empleando esperma criopreservado (Asturiano *et al.*, 2016) así como a realizar ensayos de hibridación con óvulos de anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Müller *et al.*, 2012, 2018). Lamentablemente, muchas de las larvas nacidas de estos experimentos presentaban deformidades (Müller *et al.*, 2018), demostrando que los protocolos de criopreservación necesitaban ser mejorados. Para ello, se han comparado los protocolos de criopreservación de anguila existentes con la finalidad de elegir el más eficiente y estandarizar su uso (Herranz-Jusdado *et al.*, 2018a). Sin embargo, este protocolo se basa en el manejo de volúmenes pequeños (0.5 mL), por lo que no se puede aplicar a los procesos de fertilización a gran escala. Además, se ha visto que el uso de aditivos puede mejorar la protección de la membrana de los espermatozoides, aumentando la viabilidad de los gametos que son criopreservados y optimizando los resultados de motilidad de los espermatozoides descongelados.

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo, enmarcado dentro del proyecto europeo IMPRESS “*Improved production strategies for endangered freshwater species*”, se basa en optimizar los protocolos de almacenamiento a corto plazo, así como los protocolos de criopreservación de esperma de la anguila europea en grandes volúmenes, para poder aplicarlos en proyectos de fertilización a gran escala. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos distintos:

- I. En el primero de ellos se estudiaron diferentes condiciones de almacenamiento a corto plazo. Concretamente, se analizó si la proporción de dilución del esperma con disolución P1 (1:9 o 1:49) o la temperatura (4 o 20 °C) afectaban de alguna manera al tiempo de conservación del esperma. Además, también se estudió si la agitación tenía algún efecto beneficioso en el almacenamiento de las muestras.
- II. En el segundo experimento se procedió a desarrollar un protocolo de criopreservación enfocado al almacenamiento a largo plazo de muestras de esperma en grandes volúmenes, usando viales de 2 y 5 mL. Asimismo, se comprobó si el uso de aditivos como suero fetal bovino (FBS), albúmina de suero bovino (BSA) o yema de huevo, que habían resultado favorables para conservar los gametos de otros tipos de peces, podía ayudar a conservar la motilidad del esperma criopreservado de anguila europea.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Un lote de 30 machos de anguila europea procedentes de la piscifactoría Valenciana de Acuicultura, S.A. (Puzol, Valencia), fue trasladado al Laboratorio de Acuicultura de la Universitat Politècnica de València. Estos ejemplares fueron ubicados en dos acuarios de 150 L cada uno (en total, 15 anguilas por acuario) y se aclimataron progresivamente al agua del mar (salinidad = $37 \pm 0,4$ g/L) durante una semana. Las anguilas se mantuvieron a una temperatura constante de 20 °C y los acuarios se mantuvieron cubiertos para reducir la intensidad de la luz, minimizando así el estrés de los peces. Este estudio fue llevado a cabo respetando las indicaciones recogidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Real Decreto 53/2013, en el que se establecen las normas básicas para la protección de los animales empleados con fines científicos (BOE, 2013). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la UPV y el permiso final fue otorgado por el gobierno local (Generalitat Valenciana, Número de permiso: 2015/VSC/PEA/00064).

3.2 INDUCCIÓN HORMONAL Y EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESPERMA

La maduración sexual del grupo Control se indujo mediante inyecciones semanales intraperitoneales de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG_{rec} Ovitrelle®), siguiendo el procedimiento descrito por Gallego *et al.* (2012). De esta manera, cada semana las anguilas fueron anestesiadas y pesadas antes de administrar la dosis de 1.5 UI/g (Figura 4); este procedimiento se realizó durante 15 semanas.



Figura 4. Inyección semanal de la gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG_{rec}).

Para la extracción del esperma los ejemplares fueron anestesiados con benzocaína a una concentración final de 60 ppm. Una vez anestesiada, la muestra de esperma era extraída mediante un masaje abdominal o *stripping* (Figura 5). Las muestras se diluyeron en medio P1 (en mM: NaCl 125, NaHCO₃ 20, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 1, KCl 30; con pH ajustado a 8.5 según Peñaranda *et al.*, 2010b), a una proporción de 1:9 (esperma: diluyente), y se mantuvieron en tubos de 15 mL a una temperatura de 4 °C hasta que se trasladaron al laboratorio de análisis para evaluar los diferentes parámetros de viabilidad y cinética espermática.

3.3 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS

Para evaluar la motilidad, las muestras se activaron mezclando 0.5 μl del esperma diluido en P1, con 4.5 μl de agua de mar artificial (Aqua Medic mEersalz 37g/l, con albúmina de suero bovino (BSA) al 2% (p/v) y pH ajustado a 8.2). Cada muestra se analizó por triplicado usando el módulo de motilidad de ISAS (Proiser R+D, S.L.; España). Se capturaron secuencias de vídeo de 0.5 segundos a 60 fotogramas por segundo usando una cámara (Nikon Digital Sight DS-5M) acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon ECLIPSE 80i) a 100 aumentos (objetivo 10x).

Todas muestras se analizaron transcurridos 10-15 segundos después de la activación. Con ayuda del software ISAS (Proiser R + D, España) se analizaron dos parámetros cinéticos: el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) y la motilidad progresiva (pMOT), definida como el porcentaje de espermatozoides que nadan de manera progresiva. También se registró el porcentaje de espermatozoides lentos (velocidad de trayectoria media (VAP) = 10-50 $\mu\text{m/s}$), medios (VAP = 50-100 $\mu\text{m/s}$) y rápidos (VAP >100 $\mu\text{m/s}$). Tras el estudio, las muestras que poseían unos valores de motilidad superiores al 65% fueron las elegidas para realizar los experimentos de preservación a corto y largo plazo.



Figura 5. Realización de masaje abdominal (*stripping*) y recolección de muestra de esperma.

3.4 ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD

Para poder llevar a cabo el experimento de criopreservación, se realizó un análisis de la viabilidad del esperma a cada muestra fresca y descongelada. Este análisis se llevó a cabo mediante citometría de flujo utilizando un kit de fluorescencia (LIVE / DEAD Sperm Viability Kit, Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU). Este kit incluía el fluorocromo SYBR 14, el cual tiñe de verde los núcleos de las células vivas, y yoduro de propidio (PI), el cual actúa tiñendo de rojo los núcleos de las células muertas. Se añadieron 0.5 μL de SYBR 14 (concentración final 100 nM) y 2 μL de PI (concentración final 12 μM) a 50 μL de cada muestra y se incubaron a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 10 minutos. A continuación, cada muestra se analizó con el citómetro de flujo (Beckman Coulter FC500) para un número máximo de 5000 eventos.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Este estudio se dividió en dos experimentos diferentes. El primero de ellos consistió en encontrar las mejores condiciones de almacenamiento a corto plazo para el esperma de la anguila europea. Por otro lado, el segundo experimento se basó en adaptar el último protocolo de criopreservación desarrollado en anguila europea a volúmenes más grandes y comprobar si el uso de aditivos podía mejorar la calidad del esperma.

3.5.1 Almacenamiento a corto plazo

En primer lugar, se estudió qué ratio de dilución era capaz de conservar mejor la calidad del esperma a lo largo del tiempo. Para ello, se seleccionaron 11 muestras de esperma (motilidad >65%) y se diluyeron en P1 a razón de 1:9 y de 1:49, alcanzando un volumen final de 1 mL. Estas muestras se almacenaron a 4 °C en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente, se analizaron los parámetros cinéticos de cada muestra (ver sección 3.3) a 1, 24, 48 y 72h y 7 días.

A continuación, seleccionando la ratio 1:49, que había dado mejores resultados, se evaluaron los efectos de la temperatura y de la agitación sobre la calidad del esperma a lo largo del tiempo. Para ello, se tomaron muestras de esperma de 12 machos diferentes (con motilidad >65%) y se diluyeron con una ratio 1:49 con solución P1 obteniendo un volumen final de 1 mL. Estas muestras se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml a temperaturas de 4 o 20 °C, manteniéndose en agitación o en reposo. La agitación consistió en colocar las muestras sobre un dispositivo de agitación a 80 rpm. Finalmente, las muestras se analizaron de nuevo con el sistema CASA-Mot (ver sección 3.3) a 1, 24, 48 y 72h y 7 días del inicio del experimento.

3.5.2 Almacenamiento a largo plazo: criopreservación

En primer lugar, se estudió si el último protocolo de criopreservación desarrollado para el esperma de la anguila europea era aplicable a volúmenes más grandes (2 y 5 mL). Para ello, se tomaron muestras de esperma de 14 machos distintos, con una motilidad >65%, y se congelaron en pajuelas de 0.5 mL (IMV Technologies, l'Aigle, Francia) y en criotubos (Deltalab SL, Barcelona, España) de 2 y 5 mL, respectivamente. Para la congelación de las pajuelas se siguió el protocolo descrito por Herranz-Jusdado *et al.* (2018b). En el caso de los criotubos se optó por experimentar con diferentes rampas de congelación (ver sección 3.6).

Para la segunda parte del estudio, se partió del mejor resultado obtenido en los viales y se analizó si la adición de albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) (Sigma Aldrich Química SA, Madrid, España) o yema de huevo (huevo de gallina comercial) tenía algún efecto positivo en la preservación de los espermatozoides.

En ambos experimentos se analizaron los parámetros cinéticos tanto antes como después de la descongelación. Asimismo, las muestras se analizaron con el citómetro de flujo para determinar la viabilidad celular, tal y como se ha explicado en la sección 3.4.

3.6 PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN

Para cada una de las muestras se preparó una dilución que consistía en esperma:diluyente:crioprotector a una proporción de 1:8:1. Estas muestras diluidas se incubaron, posteriormente, durante 1 hora a una temperatura de 4 °C para asegurar una correcta penetración del crioprotector en las células. A continuación, las pajuelas se enfriaron durante 3 minutos a 3 cm sobre el nitrógeno líquido (LN₂) y, seguidamente, se arrojaron al LN₂. Respecto a los criotubos de 2 mL se siguió el mismo procedimiento. Se enfriaron durante 15-20 minutos a 1 y 3 cm por encima del LN₂, y después se sumergieron en LN₂ (Figura 6). En el caso de los tubos de 5 mL, los estudios previos habían determinado que 15 minutos no bastaban para

enfriar suficientemente el esperma antes de arrojarlo al LN₂. Por ello, todas las muestras de 5 mL se colocaron durante 20 minutos a 1 y 3 cm sobre el LN₂, para después sumergirlas en él.

Para la descongelación las muestras se sumergieron en agua caliente durante un tiempo determinado; la temperatura y tiempo de duración variaba según el volumen de la muestra: 40 °C durante 13 segundos, en el caso de las pajuelas; 70 °C durante 75 segundos, para los criotubos de 2 mL; o a 70 °C durante 105 segundos, en el caso de los criotubos de 5 mL. Tras la descongelación, las muestras se analizaron con CASA-Mot (ver 4 sección 3.3), para determinar la motilidad, y citometría de flujo para determinar la viabilidad de los espermatozoides.

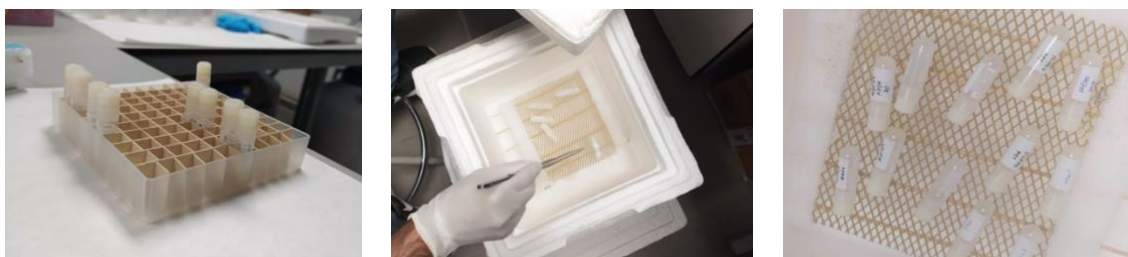


Figura 6. Proceso de criopreservación de criotubos siguiendo una rampa de congelación.

TRATAMIENTO CON ADITIVOS

Para la segunda parte del experimento se aplicó el mismo protocolo de criopreservación. No obstante, en este caso, cada muestra de esperma se sometió a cuatro tratamientos distintos que contenían 5% de yema de huevo, 20% suero fetal bovino (FBS, del inglés *fetal bovine serum*), 5% albúmina de suero fetal (BSA, del inglés *bovine serum albumine*) o ningún aditivo, empleándose este último como control. La mezcla contenía esperma, diluyente P1 más aditivo, y metanol a una proporción 1:8:1, respectivamente; la dilución se preparó diluyendo primero el aditivo con la solución P1, seguido del metanol y, finalmente, el esperma (Tabla 1). A continuación, las muestras sometidas a cada tratamiento se introdujeron en criotubos de 5 mL (se utilizaron dos tubos por tratamiento) y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Acto seguido, se congelaron durante 20 minutos encima de una superficie que se encontraba a 1 cm del LN₂. Seguidamente, las muestras se arrojaron al LN₂ y se almacenaron en un criotank. Finalmente, las muestras se descongelaron sumergiéndolas en agua a 70 °C durante 105 segundos y pasaron a almacenarse a 4 °C durante 24 horas. Los parámetros cinéticos se analizaron con el sistema CASA-Mot, realizándose además un análisis adicional 24 horas después de la congelación. Asimismo, se empleó el citómetro de flujo para estimar la viabilidad celular de las muestras, aproximadamente una hora después de la descongelación.

Tabla 1. Proporción volumétrica de los componentes de la disolución de criopreservación. Los aditivos corresponden a albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) y yema de huevo. Todos los volúmenes están representados como mL de un volumen final de 10 mL.

Aditivos	Esperma	Solución P1	Metanol	Aditivo
Control	1	8	1	-
FBS	1	6	1	2
BSA	1	7.5	1	0.5
Yema de huevo	1	7.5	1	0.5

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis de los parámetros de viabilidad, movilidad y velocidad de los espermatozoides se sometieron a un análisis de varianza (Modelo Lineal General, GLM). Para los experimentos de almacenamiento a corto plazo, los efectos fijos considerados fueron, primero, los ratios de dilución y, después, la temperatura de incubación y la agitación o la ausencia de ella a cada tiempo (1, 24, 48, 72 horas y 7 días).

Por otro lado, el experimento de criopreservación, tomó, en la primera parte del experimento, como efectos fijos cada una de las diferentes condiciones de enfriamiento, así como el tamaño de tubo; mientras que, en la segunda parte del experimento, se seleccionaron los diferentes tratamientos de Metanol, FBS, BSA y yema de huevo.

4. RESULTADOS

4.1 ALMACENAMIENTO A CORTO PLAZO

Los resultados obtenidos indicaron que la dilución 1:49 (esperma:P1) era la que mejor preservó los parámetros de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) a lo largo del tiempo y, por tanto, la indicada para el almacenamiento de gametos a corto plazo (Figura 7). Pese a que en las primeras 24 horas la motilidad (MOT) no se vio prácticamente afectada en ninguna de las dos diluciones, al cabo de 48 horas este parámetro sufrió una notable reducción, siendo este efecto mucho más drástico en la dilución 1:9. Por otro lado, la motilidad progresiva (pMOT) disminuyó notablemente en las primeras 24 horas en ambos tipos de dilución. Sin embargo, tanto a las 48 como a las 72 horas, este parámetro se conservó mucho mejor en la muestra que presentaba una relación de dilución de 1:49.

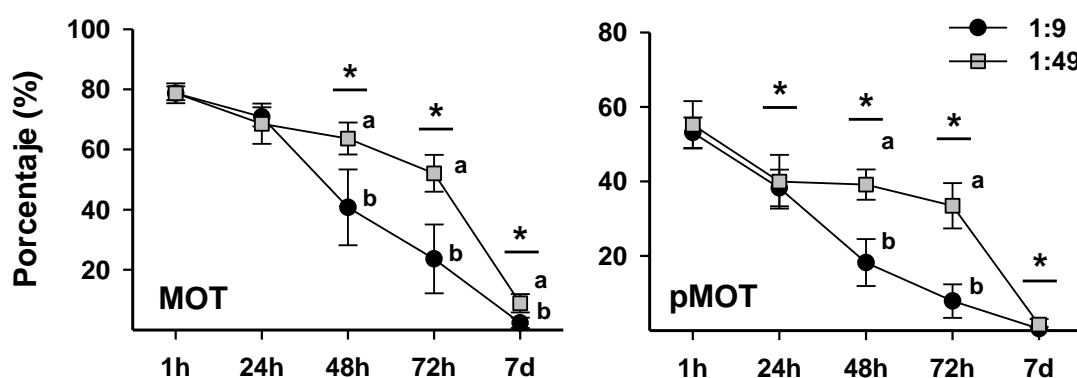


Figura 7. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) de las dos diluciones experimentales (1:9 y 1:49) a diferentes tiempos de almacenamiento (1, 24, 48, 72 horas y 7 días). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las diluciones y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control.

La segunda parte de este experimento se llevó a cabo tomando como referencia la dilución 1:49, que era la que había dado mejores resultados. En este caso se comprobó cómo afectaban la temperatura de almacenamiento y la aplicación de movimiento a la calidad del espermatozoide.

Tal y como se puede ver en la figura 8, hasta las 48 horas no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes condiciones. Únicamente la muestra almacenada a 20 °C en estado estático mostró una importante reducción de la motilidad (MOT) con respecto al control (1 hora de almacenamiento). Transcurridas 48 horas, tanto la motilidad (MOT) como la motilidad progresiva (pMOT) se vieron reducidas en todas las condiciones estudiadas. No obstante, este efecto fue mayor en las muestras almacenadas a 20 °C y, principalmente, en las que no estaban sometidas a movimiento. Pasadas 72 horas, las muestras con mejores resultados de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) fueron las almacenadas a 4 °C, tanto las estáticas como las que estaban en agitación. Finalmente, a los 7 días todas las muestras sufrieron una gran reducción en la motilidad (MOT) y la motilidad progresiva (pMOT).

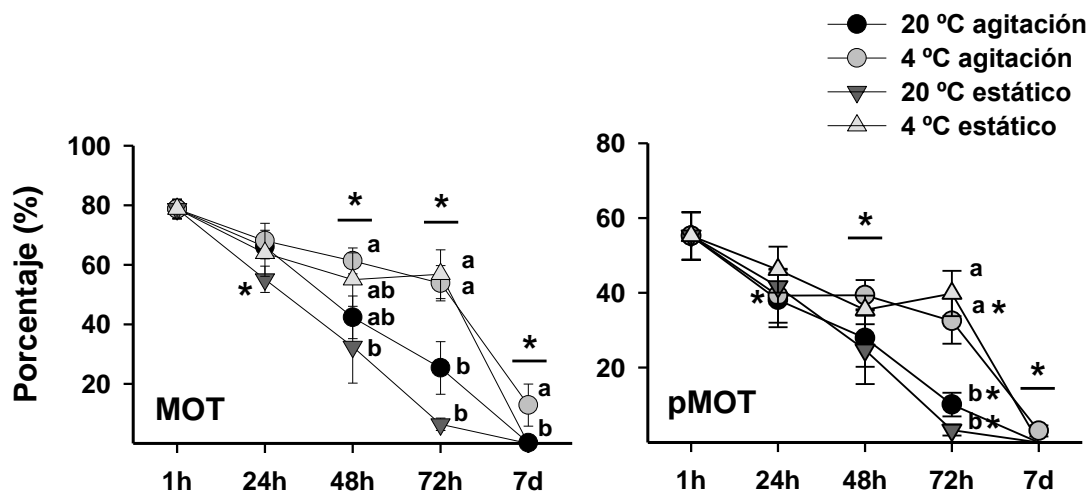


Figura 8. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) en diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura y en agitación o estático) a diferentes tiempos (1, 24, 48, 72 horas y 7 días). Las diferentes letras indican diferencias significativas entre las diluciones y los asteriscos indican diferencias significativas respecto al grupo control.

4.2 ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO (CRIOPRESERVACIÓN)

4.2.1 Criopreservación en diferentes viales

La figura 9 muestra cómo tras un proceso de criopreservación y descongelación, los parámetros de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) se vieron drásticamente reducidos en todas las muestras. Las muestras que sufrieron una disminución de la motilidad (MOT) fueron los criotubos de 2 mL, congelados a 3 cm sobre el LN₂ durante 15 minutos, y los criotubos de 5 mL, congelados a 3 cm sobre el LN₂ durante 20 minutos. El resto de las muestras de los criotubos no presentaron diferencias significativas entre ellas, ni tampoco en relación con las pajuelas. En cuanto a motilidad progresiva (pMOT), se observó que respecto a la muestra de la pajuela el criotubo de 5 mL, congelado a 3 cm sobre el LN₂ durante 20 minutos, era el único que mostró una reducción notable. El resto de las muestras presentaron unos valores similares e incluso superiores, como la muestra de 2 mL, situada a 3 cm sobre el LN₂ durante 20 minutos, la cual indicó un porcentaje de motilidad más elevado.

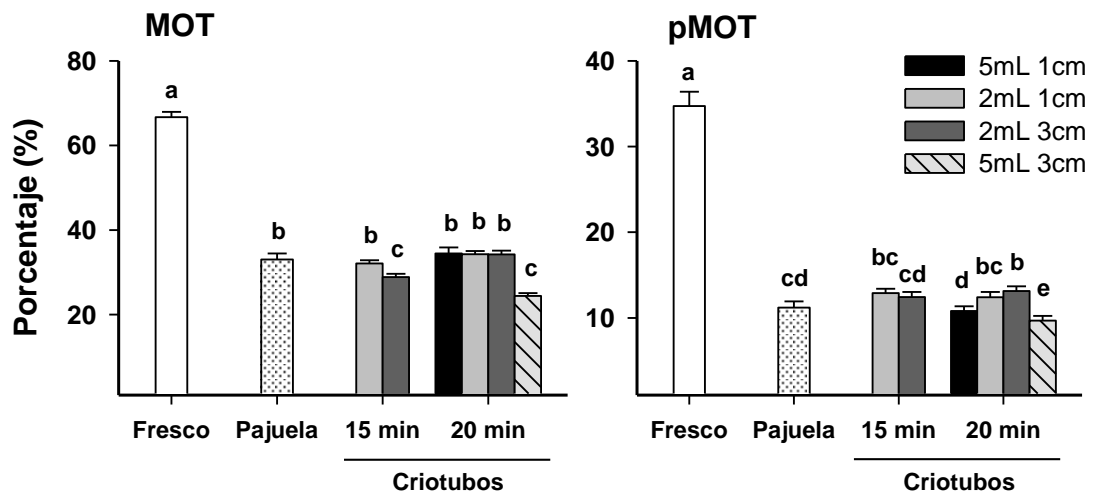


Figura 9. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) en diferentes condiciones de criopreservación (pajuela *versus* criotubo, altura de enfriamiento y tiempo de enfriamiento). Las diferentes letras indican diferencias significativas.

Los resultados indicaron que la viabilidad también se vio reducida en todas las muestras tras la criopreservación, sin diferencias significativas con respecto a las pajuelas (Figura 10). Las que mostraron una mayor reducción fueron las muestras de 2 mL congeladas a 1 cm sobre el LN₂, independientemente del tiempo de congelación, y las muestras de 5 mL congelados a 3 cm sobre el LN₂ durante 20 minutos.

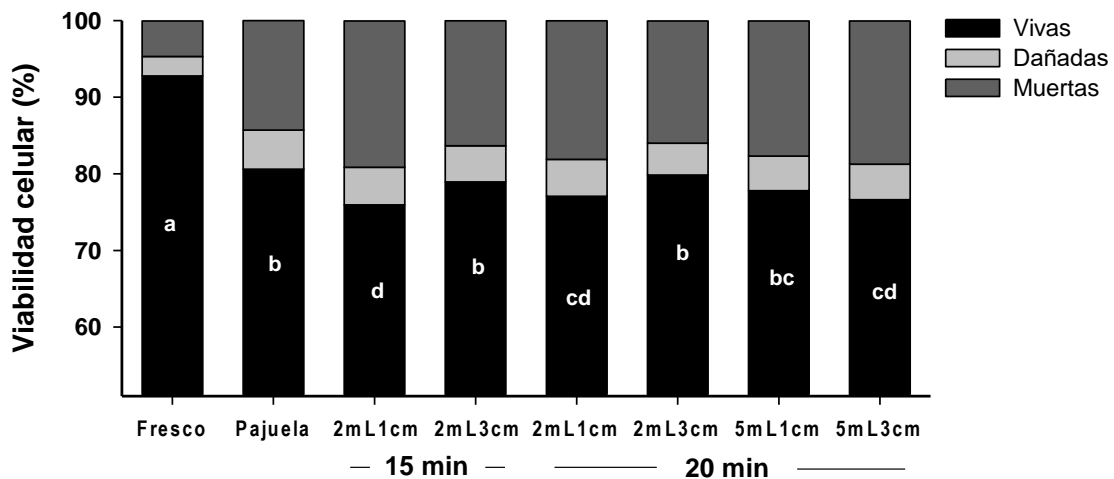


Figura 10. Viabilidad de los espermatozoides de muestras de espermatozoides frescos y descongelados en diferentes condiciones de criopreservación (pajuela/ tamaño del tubo, altura de enfriamiento y tiempo de enfriamiento). Las distintas letras indican diferencias significativas en el porcentaje de viabilidad.

4.2.2 Criopreservación con aditivos

Los resultados mostraron que tanto las motilidades como las velocidades se vieron afectadas en todas las muestras que habían sufrido un proceso de criopreservación, en comparación con las muestras frescas (Figura 11). El tratamiento de las muestras con diferentes aditivos demostró que las muestras tratadas con yema de huevo eran las presentaban un valor más elevado de motilidad (MOT), en relación con la muestra control y con aquellas tratadas con otros aditivos. Concretamente, el tratamiento con yema de huevo permitió mantener un porcentaje de motilidad (MOT) superior al 50%, siendo el mayor valor que se ha alcanzado en anguila europea. En cambio, los tratamientos BSA y FBS no provocaron ninguna mejora de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) en comparación con el control.

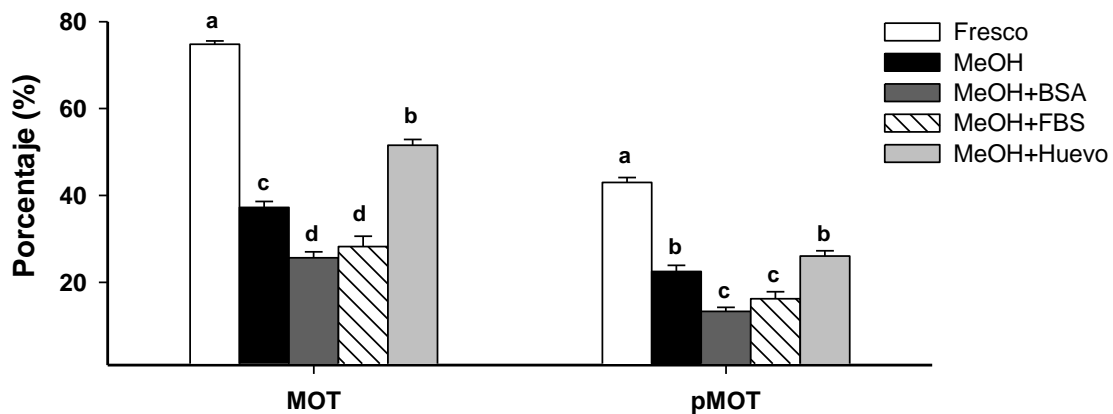


Figura 11. Porcentaje de motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT) de muestras frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo). Las distintas letras indican diferencias significativas.

La figura 12 indica como, tras un proceso de criopreservación, la cantidad de células vivas se redujo notablemente. La muestra tratada con yema de huevo es la que presentó un mayor porcentaje de células vivas, aunque no se observaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con aditivos y las que no recibieron ningún tipo de tratamiento.

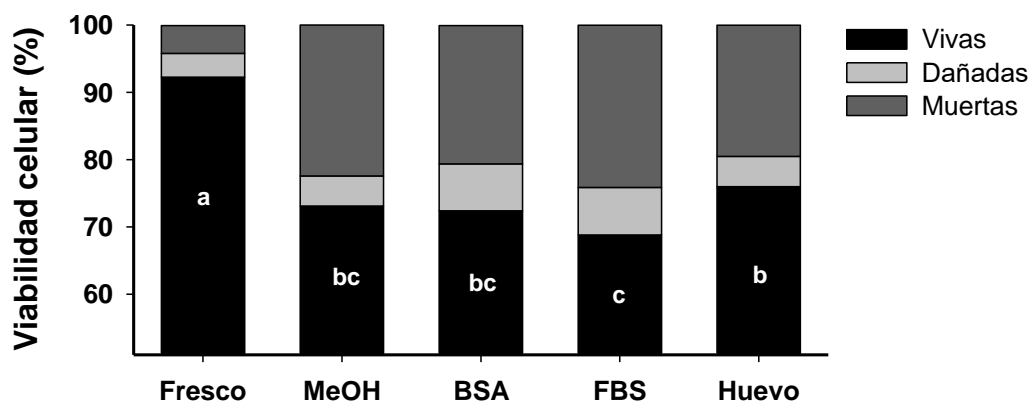


Figura 12. Datos de viabilidad de muestras de esperma frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo) o sin ellos (control). Las distintas letras indican diferencias significativas.

Los resultados representados en la figura 13 indicaron que las muestras tratadas con yema de huevo presentaron unos valores de motilidad (MOT) similares a los de las muestras control (MeOH). El tratamiento con BSA y FBS redujo la motilidad de los espermatozoides. Aún así, todas las muestras mantuvieron su porcentaje de motilidad inalterado tras 24 horas almacenados a 4 °C.

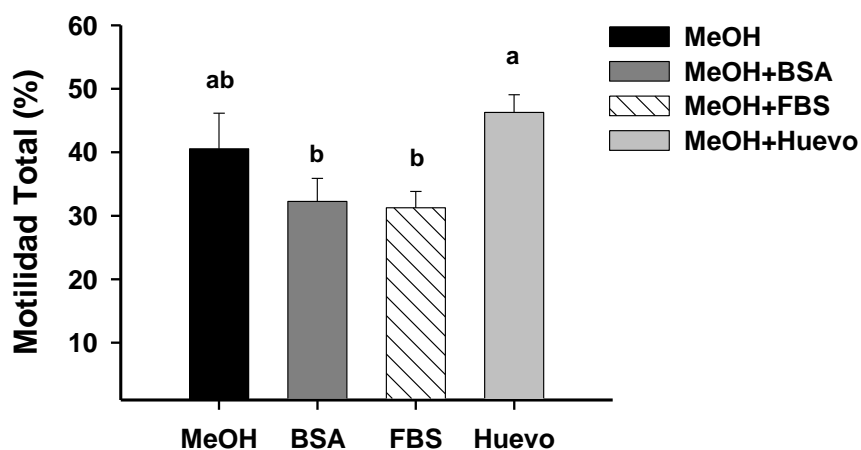


Figura 13. Resultados de los análisis de motilidad transcurridas 24 horas de muestras de esperma frescas y criopreservadas tratadas con diferentes aditivos (albúmina de suero bovino (BSA), suero fetal bovino (FBS) o yema de huevo) o sin ellos (metanol (MeOH)). Las distintas letras indican diferencias significativas.

5. DISCUSIÓN

La situación actual de la anguila europea postula la cría en cautividad como la opción más viable para la preservación de esta especie y el mantenimiento de su producción acuícola. No obstante, las complicaciones derivadas de la asincronía de la maduración sexual entre los dos sexos en la reproducción artificial (Butts *et al.*, 2014) dificulta la fertilización y obliga a recurrir a la conservación de muestras de esperma. Por ello, en este trabajo se ha procedido a optimizar los protocolos de conservación de esperma, tanto a corto como a largo plazo, con la finalidad de que sean aplicables a procesos reproductivos a gran escala.

5.1 PRESERVACIÓN A CORTO PLAZO

En el caso del almacenamiento de muestras a corto plazo, los diluyentes han sido fundamentales para el desarrollo de protocolos de conservación de esperma efectivos, siendo muy empleados en los experimentos de reproducción de peces gracias a su bajo coste y su gran eficiencia para mantener la motilidad de los espermatozoides, estabilizar las condiciones fisicoquímicas del plasma seminal y mejorar la capacidad de fertilización en algunas especies (Bobe y Labbé, 2009; Pérez-Cerezales *et al.*, 2009; Trigo *et al.*, 2015; Peñaranda *et al.*, 2010b). En este caso concreto se ha optado por emplear un diluyente denominado P1, que ha sido estudiado y mejorado para su uso en experimentos de conservación de esperma (Asturiano *et al.*, 2003; Peñaranda *et al.*,

2010a,b), demostrando su efectividad en estudios de reproducción de anguila europea. Este diluyente tiene la capacidad de imitar las condiciones fisicoquímicas del plasma seminal: se trata de una solución isoosmótica, isotónica y presenta un pH ajustado a 8,5. De esta forma, se consigue mantener los espermatozoides en estado quiescente, tal y como se encuentran en estado natural (Lahnsteiner *et al.*, 1997; Ohta y Izawa, 1996).

En el caso de la anguila europea, todas las diluciones de esperma que se encuentran en el rango de la 1:10 hasta la 1:100 han sido testadas bajo diferentes condiciones (Peñaranda *et al.*, 2010a,b). Peñaranda *et al.* (2010b) determinaron que las diluciones 1:50 y 1:100 eran las que mostraban el mejor resultado, sin diferencias significativas entre ellas. En estos casos, aunque ambas diluciones se pueden aplicar para la conservación del esperma, se suele optar por aquella que se supone una mayor concentración de células ya que, por un lado, resulta más práctico y, por otro lado, para alcanzar una correcta fertilización se necesita una elevada cantidad de esperma (Butts *et al.*, 2014). Pese a que estos estudios han contribuido a obtener un mayor conocimiento en este campo, el análisis de la motilidad se llevó a cabo de modo subjetivo lo que supone ciertos problemas relacionados con la limitación del ojo humano y la propia experiencia del observador (Gallego *et al.*, 2018). Esto dificulta la interpretación y la comparación de resultados entre los diferentes grupos de investigación debido a la falta de reproducibilidad (Gallego y Asturiano, 2018). En el presente estudio se testaron dos diluciones diferentes: 1:9 y la 1:49. Los resultados determinaron que, durante las primeras 24 horas, ambas proporciones mantenían correctamente la calidad del esperma, tal y como indican los biomarcadores motilidad (MOT) y motilidad progresiva (pMOT). No obstante, transcurridos dos días, la dilución 1:49 mostró mejores resultados siendo incluso capaz de mantener una elevada motilidad de los espermatozoides durante unos tres días. Este hecho puede deberse a que una mayor dilución de la muestra de esperma conlleva también una reducción de la contaminación urinaria, un mejor mantenimiento del pH, así como un menor crecimiento de microorganismos contaminantes debido a una menor concentración de espermatozoides (Bobe y Labbé, 2009). Estos resultados concuerdan con los de los estudios previamente mencionados, que mostraron que durante las primeras 24 horas ambas proporciones de dilución preservan con éxito la calidad de los gametos, pero para un tiempo de almacenamiento mayor, la dilución 1:49 es la que da mejores resultados. Estos resultados implican que, si el esperma va a ser usado en las primeras 24 horas, es recomendable emplear la dilución 1:9 para realizar un proceso de fertilización, ya que la concentración de espermatozoides en la muestra será mayor y, por tanto, habrá una mayor probabilidad de lograr una fertilización exitosa (Butts *et al.*, 2014). Sin embargo, para un tiempo superior (>24 h) se debe utilizar la dilución 1:49.

Como el ratio de dilución 1:49 fue el que dio mejores resultados, ya que fue capaz de mantener la calidad del esperma durante más tiempo, se tomó como referencia para determinar si la temperatura de almacenamiento o la aplicación de movimiento tenían algún efecto positivo en la preservación del esperma. En este sentido, estudios llevados a cabo anteriormente con trucha arcoíris (*O. mykiss*) demostraron que el almacenamiento de las muestras de esperma a bajas temperaturas reducía el metabolismo de los espermatozoides y el crecimiento de microorganismos (Cosson *et al.*, 1985) y, por tanto, mantenía su calidad en el tiempo. Pese a esto, el almacenamiento a temperaturas no tan frías puede resultar mucho más práctico en

algunos casos como cuando se requiera el transporte de las muestras, pudiéndose almacenar de ese modo a temperatura ambiente, ya que el mantenimiento a bajas temperaturas necesitaría de un sistema de enfriamiento.

Múltiples estudios realizados sobre el esperma de salmónidos aplicaron agitación durante el almacenamiento ya que provocaba una disminución de la mortalidad de los espermatozoides (Parodi *et al.*, 2017; Trigo *et al.*, 2015; Ubilla *et al.*, 2015). Debido a esto, esta forma de preservar las muestras es común en los protocolos de almacenamiento de esperma a corto plazo de diversas especies de salmónidos. En el presente estudio, la aplicación de movimiento no supuso diferencias significativas con respecto a aquellas muestras que no se estaban agitando. Sin embargo, el almacenamiento a bajas temperaturas (4 °C) permitió mantener la motilidad de los espermatozoides tras 2 días de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los de los estudios previos, que indican que la aplicación de bajas temperaturas (refrigeración) permite mantener mejor la calidad del esperma ya que se reduce el metabolismo de los espermatozoides y se previene el crecimiento bacteriano (Bobe y Labbé, 2009; Cosson *et al.*, 1985). No obstante, en este estudio se demostró que la motilidad del esperma se mantuvo correctamente durante las primeras 24 horas, sin diferencias significativas entre las distintas temperaturas.

Cabe destacar que la preservación de la motilidad en el tiempo varía enormemente entre las distintas especies, siendo específico de cada una de ellas. Por ejemplo, las muestras de fletán atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) conservadas bajo condiciones óptimas, pueden mantener su motilidad incluso después de 79 días de almacenamiento (Babiak *et al.*, 2006), mientras que en la carpa común (*Cyprinus carpio*), la motilidad de los espermatozoides se mantuvo durante un máximo de 84 horas (Ravinder *et al.*, 1997). Concretamente en la anguila europea, estudios anteriores demostraron que, en condiciones de limitación de aire, se podía mantener la motilidad de los espermatozoides durante 14 días (Peñaranda *et al.*, 2010a). Ese protocolo requirió el uso de bolsas de policarbonato que se cerraron en condiciones de vacío consiguiendo limitar la cantidad de oxígeno y, por tanto, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales son tremendamente tóxicas para las células.

5.2 PRESERVACIÓN A LARGO PLAZO: CRIOPRESERVACIÓN

En la segunda parte del experimento, se comprobó si el último protocolo desarrollado para la criopreservación de esperma de anguila europea (Herranz- Jurdado *et al.*, 2018b), que está basado en el uso de pajuelas de 0.5 mL, era aplicable a volúmenes más grandes consiguiendo mantener la calidad de la muestra. Los protocolos de criopreservación de espermatozoides se han desarrollado con la finalidad principal de resolver los problemas de sincronización entre hembras y machos y así poder impulsar la cría en cautividad, aunque suponen ventajas adicionales, como que facilitan el intercambio de gametos entre distintas instituciones (Cabrita *et al.*, 2010), por lo que el uso de volúmenes más grandes sería de gran utilidad para este propósito.

La criopreservación de grandes volúmenes de esperma ya se ha llevado a cabo en distintas especies de peces. Por ejemplo, en el caso de la trucha arcoíris (*O. mykiss*) se han criopreservado muestras utilizando pajuelas de diferentes tamaños (Cabrita *et al.*, 2001). No obstante, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la motilidad de los espermatozoides

independientemente del tamaño de la pajuela (0.5, 1.8 y 5 mL). En el caso de la anguila japonesa, tras muchos experimentos llevados a cabo, se logró criopreservar con éxito su esperma en pajuelas de 2.5 y 5 mL de volumen. Los resultados obtenidos fueron prometedores ya que se obtuvieron tasas de fertilidad, supervivencia y morfología larvaria similares a las del esperma fresco (Nomura *et al.*, 2018), demostrando la gran mejora del protocolo.

En el presente estudio se demuestra que es factible la utilización de criotubos de 2 o 5 mL para la criopreservación de espermatozoides de anguila europea. En comparación con el protocolo de criopreservación desarrollado por Herranz-Jusdado *et al.* (2018b), el cual usaba pajuelas de 0.5 mL, tras la descongelación se obtuvo una calidad del esperma similar mediante un ajuste de las condiciones de enfriamiento según el volumen empleado. Esto supone una gran ventaja práctica en los procesos de fertilización artificial ya que la cantidad de espermatozoides necesaria para lograr una fertilización con éxito es relativamente elevada (Butts *et al.*, 2012, 2014) y por tanto se necesita una gran cantidad de esperma en los programas de reproducción. En el presente trabajo no se comprobó el resultado de la fertilización empleando el esperma criopreservado resultante de la aplicación de estos protocolos, tal y como sí se hizo en su día en anguila japonesa (Nomura *et al.*, 2018), aun así se analizó el éxito del proceso estudiando la supervivencia, la motilidad y otros parámetros cinéticos importantes analizados con un programa CASA-Mot. Se trata de biomarcadores muy usados en los estudios de reproducción de peces ya que son capaces de permitir una buena evaluación de la calidad del esperma, y se ha demostrado que hay una fuerte correlación con el éxito de fertilización en varias especies de peces (Gallego y Asturiano, 2018).

La segunda parte del experimento de criopreservación tenía como objetivo mejorar el protocolo existente usando diferentes tipos de aditivos: suero bovino fetal (FBS), albúmina de suero bovino (BSA) y yema de huevo. Estos aditivos ya habían sido usados en protocolos de crioconservación de otras especies (Cabrita *et al.*, 2010; Labbé *et al.*, 2013; Magnotti *et al.*, 2018). Específicamente, FBS y BSA son unos aditivos muy empleados debido a su efecto amortiguador del choque osmótico, su efecto antioxidante y la protección mecánica que brindan a la membrana celular disminuyendo el riesgo de la cristalización, recristalización y derretimiento del hielo durante los procesos de congelación y descongelación (Cabrita *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1997; Peñaranda *et al.*, 2009). Por otro lado, la yema de huevo actúa estabilizando la membrana y reduciendo las lesiones provocadas por el choque térmico (Bozkurt *et al.*, 2014; Gallego *et al.*, 2017). Además, se ha visto que la fracción de la yema de huevo correspondiente a la LDL tiene la capacidad de proteger al ADN frente al daño que puede sufrir durante el proceso de congelación-descongelación (Hu *et al.*, 2008; Pérez-Cerezales *et al.*, 2010). De hecho, en el caso concreto de la trucha arcoíris se vio que si se añadía únicamente la fracción LDL en lugar de la yema de huevo entera se conseguía mejorar la calidad del esperma en términos de motilidad, integridad de membrana y daño del ADN (Pérez-Cerezales *et al.*, 2010).

En este estudio se demostró que la adición de yema de huevo tuvo un efecto beneficioso respecto a la motilidad de los espermatozoides después de la congelación, llegando a obtener porcentajes de supervivencia aproximadamente del 80% y porcentajes de motilidad alrededor del 50%. Es importante destacar que, después de un proceso de criopreservación, existe una gran variabilidad en el porcentaje de motilidad entre distintas especies (Asturiano *et al.*, 2017).

Por ejemplo, en el caso del pez espátula (*Polyodon spathula*), este puede alcanzar valores de motilidad del 85% después de un proceso de congelación (Horváth *et al.*, 2006). Por otro lado, los resultados de estudios sobre lubina rayada (*Morone saxatilis*) indicaron que solo se obtenía valores de motilidad inferiores al 10% (Frankel *et al.*, 2013). En el caso de la anguila europea, gracias a la adición de yema de huevo al medio de congelación se consiguió obtener el mayor valor de motilidad espermático postcongelación publicado en anguila europea. Además, los resultados indicaron que la calidad de este esperma se conservó durante 24 h tras la descongelación, siendo almacenado a 4 °C. Esto supone una gran ventaja ya que el esperma podría descongelarse y transportarse al sitio requerido durante estas 24 horas, con un sistema de refrigeración sencillo, consiguiendo mantener la calidad de la muestra sin necesidad de transportar un depósito con nitrógeno líquido.

Se cree que los beneficios generados por la adición de la yema de huevo son consecuencia de su composición química. Algunos grupos de investigación llevaron a cabo estudios con el fin de analizar las diferencias en el contenido de fosfolípidos, proteínas y colesterol entre los diferentes tipos de huevos de las aves y su capacidad crioprotectora en el esperma de peces (Bozkurt *et al.*, 2014). No obstante, solamente se encontraron pequeñas diferencias entre ellos, y ninguno de los componentes conseguía explicar la variación en la calidad de los espermatozoides después de la descongelación. Pese a que la yema de huevo utilizada proveniente de gallina, ya había sido usada en experimentos de criopreservación de esperma de peces (Babiak *et al.*, 2012). Todavía se necesitan más estudios para comprender los efectos de los diferentes componentes de la yema de huevo, no solo para entender su función como crioprotector, sino también para estandarizar los protocolos. Asimismo, cabe destacar que la yema de huevo utilizada en este estudio procede de huevos de gallina comerciales lo cual puede provocar que existan también variaciones en su composición y que habría que considerar en un futuro proceso de estandarización del protocolo.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha descrito un protocolo de preservación de esperma de anguila europea a corto plazo, el cual permite conservar la calidad de los espermatozoides hasta un máximo de 7 días. Por otro lado, también se ha optimizado un protocolo de criopreservación de esperma de anguila europea con la finalidad de aplicarlo a volúmenes más grandes. Además, se ha visto que el uso de aditivos, concretamente de yema de huevo, permite mantener la calidad del esperma obteniendo valores de motilidad en torno al 50%, siendo este el valor más alto que se ha logrado obtener en esta especie. Esto supone un avance en el campo de la reproducción de la anguila europea ya que, además de resolver el problema de la asincronía de la maduración entre sexos, puede llegar a emplearse en programas de fertilización a gran escala con el fin de preservar esta especie y garantizar su producción acuícola.

7. BIBLIOGRAFÍA

- AMILHAT, E., BASIC, T., BEAULATON, L., BELPAIRE, C., BERNOTAS, P., BRIAND, C., ... & WICKSTRÖM, H. (2019). Joint EIFAAC/ICES/GFCM Working Group on Eels (WGEEL).
- ASTURIANO, J. F., CABRITA, E., & HORVÁTH, Á. (2017). Progress, challenges and perspectives on fish gamete cryopreservation: a mini-review. *General and Comparative Endocrinology*, 245, 69-76.
- ASTURIANO, J. F., MARCO-JIMÉNEZ, F., OLIVARES, L., VICENTE, J. S., & JOVER, M. (2003). Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28. (1-4), 501-502
- ASTURIANO, J. F., PÉREZ, L., GARZÓN, D. L., MARCO-JIMÉNEZ, F., PEÑARANDA, D. S., VICENTE, J. S., & JOVER, M. (2004). Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(3), 283-293.
- ASTURIANO, J. F., SØRENSEN, S. R., PÉREZ, L., LAUESEN, P., & TOMKIEWICZ, J. (2016). First production of larvae using cryopreserved sperm: effects of preservation temperature and cryopreservation on European eel sperm fertilization capacity. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 485-491.
- BABIÁK, I., MARSCHHÄUSER, V., OTTESEN, O., RUDOLFSEN, G., EGGEN, B., & BABIÁK, J. (2012). Effects of extender, storage and sperm-to-egg ratio on cryopreservation success of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6), 941-947.
- BABIÁK, I., OTTESEN, O., RUDOLFSEN, G., & JOHNSEN, S. (2006). Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.: I: Optimizing the protocol. *Theriogenology*, 66(9), 2025-2035.
- BOBE, J., & LABBÉ, C. (2009). Chilled storage of sperm and eggs. In *Methods in Reproductive Aquaculture* (pp. 241-258). CRC Press.
- BOËTIUS, I., & BOËTIUS, J. (1980). Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*: estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana (Denmark)*, 1, 1-28.
- BOLLAND, J. D., MURPHY, L. A., STANFORD, R. J., ANGELOPOULOS, N. V., BAKER, N. J., WRIGHT, R. M., ... & COWX, I. G. (2019). Direct and indirect impacts of pumping station operation on downstream migration of critically endangered European eel. *Fisheries Management and Ecology*, 26(1), 76-85.
- BOZKURT, Y., YAVAŞ, İ., & YILDIZ, C. (2014). Effect of different avian egg yolk types on fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Aquaculture International*, 22(1), 131-139.
- BUTTS, I. A., ROUSTAIAN, P., & LITVAK, M. K. (2012). Fertilization strategies for winter flounder: effects of spermatozoa density and the duration of gamete receptivity. *Aquatic Biology*, 16(2), 115-124.
- BUTTS, I. A., SØRENSEN, S. R., POLITIS, S. N., PITCHER, T. E., & TOMKIEWICZ, J. (2014). Standardization of fertilization protocols for the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquaculture*, 426, 9-13.
- CABRITA, E., ROBLES, V., ALVAREZ, R., & HERRÁEZ, M. P. (2001). Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture*, 201(3-4), 301-314.

- CABRITA, E., ROBLES, V., CUÑADO, S., WALLACE, J. C., SARASQUETE, C., & HERRÁEZ, M. P. (2005). Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macro tubes. *Cryobiology*, 50(3), 273-284.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRÃO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., & HERRÁEZ, M. P. (2010). Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 623-635.
- CLOUD, J., & PATTON, S. (2008). Basic principles of fish spermatozoa cryopreservation. *Methods in Reproductive Aquaculture: marine and Freshwater Species* (pp. 237-250). CRC Press.
- COSSON, M. P., BILLARD, R., GATTI, J. L., & CHRISTEN, R. (1985). Rapid and quantitative assessment of trout spermatozoa motility using stroboscopy. *Aquaculture*, 46(1), 71-75.
- DEKKER, W. (2016). Management of the eel is slipping through our hands! Distribute control and orchestrate national protection. *ICES Journal of Marine Science*, 73(10), 2442-2452.
- DEKKER, W., & BEAULATON, L. (2016). Climbing back up what slippery slope? Dynamics of the European eel stock and its management in historical perspective. *ICES Journal of Marine Science*, 73(1), 5-13.
- FABBROCINI, A., D'ADAMO, R., PELOSI, S., OLIVEIRA, L. F. J., DEL PRETE, F., SILVESTRI, F., ... & SANSONE, G. (2015). Sperm motility evaluation following long-term storage (5 years) of cryopreserved sea bream (*Sparus aurata* L., 1758) semen. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 104-107.
- FAO 2004-2021. Cultured Aquatic Species Information Programme. *Anguilla anguilla*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Rome. Updated . [Cited 15 June 2021].
- FEUNTEUN, E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological engineering*, 18(5), 575-591.
- FONTAINE, M., BERTRAND, E., LOPEZ, E., & CALLAMAND, O. (1964). Gonadal maturation of female eel (*Anguilla anguilla*) and spontaneous emission of eggs in aquarium. *Rendus de l'Academie des Sciences*, 259, 2907-2910.
- FRANKEL, T. E., THEISEN, D. D., GUTHRIE, H. D., WELCH, G. R., & WOODS III, L. C. (2013). The effect of freezing rate on the quality of striped bass sperm. *Theriogenology*, 79(6), 940-945.
- GALLEGO, V., & ASTURIANO, J. F. (2018). Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(6), 820-832.
- GALLEGO, V., CAVALCANTE, S. S., FUJIMOTO, R. Y., CARNEIRO, P. C. F., AZEVEDO, H. C., & MARIA, A. N. (2017). Fish sperm subpopulations: changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology*, 87, 16-24.
- GALLEGO, V., HERRANZ-JUSDADO, J. G., ROZENFELD, C., PÉREZ, L., & ASTURIANO, J. F. (2018). Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(6), 1457-1467.
- GALLEGO, V., MAZZEO, I., VÍLCHEZ, M. C., PEÑARANDA, D. S., CARNEIRO, P. C. F., PÉREZ, L., & ASTURIANO, J. F. (2012). Study of the effects of thermal regime and alternative hormonal treatments on the reproductive performance of European eel males (*Anguilla anguilla*) during induced sexual maturation. *Aquaculture*, 354, 7-16.
- HERRANZ-JUSDADO, J. G., GALLEGO, V., MORINI, M., ROZENFELD, C., PÉREZ, L., KÁSA, E., ... & ASTURIANO, J. F. (2018a). Comparison of European eel sperm cryopreservation protocols with standardization as a target. *Aquaculture*, 498, 539-544.

- HERRANZ-JUSDADO, J. G., KÁSA, E., KOLLÁR, T., GALLEGRO, V., PEÑARANDA, D. S., ROZENFELD, C., ... & ASTURIANO, J. F. (2018b). Handling and treatment of male European eels (*Anguilla anguilla*) for hormonal maturation and sperm cryopreservation. *Journal of Visualized Experiments*, (131), e56835.
- HORVÁTH, Á., URBÁNYI, B., MIMS, S. D., BEAN, W. B., GOMELSKY, B., & TIERSCH, T. R. (2006). Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 37(4), 356-362.
- HU, J. H., LI, Q. W., JIANG, Z. L., & LI, W. Y. (2008). Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing–thawing. *Cryobiology*, 57(3), 257-262.
- LABBÉ, C., ROBLES, V., & HERRÁEZ, M. P. (2013). Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation. In *Advances in aquaculture hatchery technology* (pp. 76-116). Woodhead Publishing.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., WEISMANN, T., & PATZNER, R. (1997). Sperm motility and seminal fluid composition in the burbot, *Lota lota*. *Journal of Applied Ichthyology*, 13(3), 113-119.
- LEWIS, S. E., STERLING, E. S. L., YOUNG, I. S., & THOMPSON, W. (1997). Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 67(1), 142-147.
- MAGNOTTI, C., CERQUEIRA, V., LEE-ESTEVEZ, M., FARIAS, J. G., VALDEBENITO, I., & FIGUEROA, E. (2018). Cryopreservation and vitrification of fish semen: a review with special emphasis on marine species. *Reviews in Aquaculture*, 10(1), 15-25.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., HORVÁTH, Á., LABBÉ, C., ZHANG, T., ROBLES, V., HERRÁEZ, P., ... & CABRITA, E. (2017). Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472, 156-177.
- MÜLLER, T., HORVÁTH, Á., TAKAHASHI, E., KOLICS, B., BAKOS, K., DECSI, K., ... & YAMAHA, E. (2012). Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. *Aquaculture*, 350, 130-133.
- MÜLLER, T., MATSUBARA, H., KUBARA, Y., HORVÁTH, Á., KOLICS, B., TALLER, J., ... & URBÁNYI, B. (2018). Testing cryopreserved European eel sperm for hybridization (*A. japonica* × *A. anguilla*). *Theriogenology*, 113, 153-158.
- MÜLLER, T., URBÁNYI, B., VÁRADI, B., BINDER, T., HORN, P., BERCSÉNYI, M., & HORVÁTH, Á. (2004). Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35(2), 225-231.
- NOMURA, K., KOH, I. C. C., IIO, R., OKUDA, D., KAZETO, Y., TANAKA, H., & OHTA, H. (2018). Sperm cryopreservation protocols for the large-scale fertilization of Japanese eel using a combination of large-volume straws and low sperm dilution ratio. *Aquaculture*, 496, 203-210.
- OHTA, H., & IZAWA, T. (1996). Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142(1-2), 107-118.
- PARODI, J., GUERRA, G., CUEVAS, M., RAMÍREZ-REVECO, A., & ROMERO, F. (2017). Effects of storage time on the motility, mortality and calcium levels of Atlantic salmon *Salmo salar* spermatozoa. *Journal of Fish Biology*, 90(4), 1506-1516.
- PEÑARANDA, D. S., MARCO-JIMÉNEZ, F., PÉREZ, L., GALLEGRO, V., MAZZEO, I., VICENTE, J. S., ... & ASTURIANO, J. F. (2010a). Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5), 659-664.

- PEÑARANDA, D. S., PÉREZ, L., GALLEGO, V., BARRERA, R., JOVER, M., & ASTURIANO, J. F. (2010b). European eel sperm diluent for short-term storage. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 407-415.
- PEÑARANDA, D. S., PÉREZ, L., GALLEGO, V., JOVER, M., & ASTURIANO, J. F. (2009). Improvement of European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology*, 59(2), 119-126.
- PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., BEIRÃO, J., & HERRÁEZ, M. P. (2010). Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology*, 74(2), 282-289.
- PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., CABRITA, E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., DE PAZ, P., & HERRÁEZ, M. P. (2009). Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology*, 71(4), 605-613.
- RAJU, R., BRYANT, S. J., WILKINSON, B. L., & BRYANT, G. (2020). The need for novel Cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 129749.
- RAVINDER, K., NASARUDDIN, K., MAJUMDAR, K. C., & SHIVAJI, S. (1997). Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *Journal of Fish Biology*, 50(6), 1309-1328.
- RIGHTON, D., WESTERBERG, H., FEUNTEUN, E., ØKLAND, F., GARGAN, P., AMILHAT, E., ... & AARESTRUP, K. (2016). Empirical observations of the spawning migration of European eels: the long and dangerous road to the Sargasso Sea. *Science Advances*, 2(10), e1501694.
- SZABÓ, G., MÜLLER, T., BERCSÉNYI, M., URBÁNYI, B., KUCSKA, B., & HORVÁTH, A. (2005). Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biologica Hungarica*, 56(1-2), 173-175.
- TRIGO, P., MERINO, O., FIGUEROA, E., VALDEBENITO, I., SÁNCHEZ, R., & RISOPATRÓN, J. (2015). Effect of short-term semen storage in salmon (*Oncorhynchus mykiss*) on sperm functional parameters evaluated by flow cytometry. *Andrologia*, 47(4), 407-411.
- UBILLA, A., FORNARI, D., FIGUEROA, E., EFFER, B., & VALDEBENITO, I. (2015). Short-term cold storage of the semen of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) incorporating DMSO in the sperm diluent. Effects on motility and fertilizing capacity. *Aquaculture Research*, 46, 37-44.
- VAN DEN THILLART, G., DUFOUR, S., & RANKIN, J. C. (2009). Spawning migration of the European eel. *Fish and Fisheries Series*, 30.
- VAN GINNEKEN, V. J., & MAES, G. E. (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(4), 367-398.