

Optimización de un protocolo para la criopreservación del espermátforo y masa espermática del langostino blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Optimization of a protocol for cryopreservation of the spermatophore and sperm mass of the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Luz Dominguez M.^{1,5}, Carlos Torres P.^{1,2}, Max Salvatierra A.¹, Emmerik Motte D.¹, Juan Quimi M.¹, Martha Valdivia C.², María Solís L.³, Yovani Rosales M.⁴, Juan Luzardo S.⁴, Eric Mialhe M.¹

RESUMEN

Se evaluó el efecto de seis soluciones crioprotectoras basadas en MgCl₂ y metanol, acompañado de sucrosa y gel de *Aloe vera* al 10% o yema de huevo al 10%, sobre la viabilidad espermática en espermátforo y masa espermática de *Litopenaeus vannamei*. Además, se usaron tasas de enfriamiento de -0.5, -1 y -2°C/min hasta lograr descensos de temperatura a -35, -80 y -100 °C previo a la inmersión en nitrógeno líquido. La tasa de viabilidad espermática fue determinada mediante la tinción eosina-nigrosina. Los resultados mostraron que las soluciones basadas en MgCl₂, sucrosa más yema de huevo o gel de *Aloe vera* preservaron mejor la viabilidad espermática en espermátforo (82.8 ± 2.3% y 72.6 ± 3.1%) y en masa espermática (83.4 ± 2.5% y 76 ± 1.1%), sin diferencias significativas con el grupo control (p>0.05). La curva de congelamiento que mostró menor daño en espermátforo inició desde 25 °C y llegó a -35 °C con una tasa de -1 °C/min empleando una solución crioprotectora con yema de huevo y MgCl₂, mostrando una viabilidad espermática mayor a 80% sin diferencias significativas con el grupo control (p>0.05), y una tasa de -2 °C/min en el mismo rango de temperaturas para el grupo con masa espermática y una solución basada en gel de *Aloe vera*. En conclusión, el uso de una solución compuesta por MgCl₂, sucrosa, gel de *Aloe vera* o yema de huevo y una tasa de enfriamiento de -1°C/min o -2°C/min hasta alcanzar -35°C permite una protección exitosa en el congelamiento de espermátforos o masa espermática de *Litopenaeus vannamei*.

Palabras clave: criopreservación, espermátforo, masa espermática, *Litopenaeus vannamei*

¹ Departamento de Acuicultura, Incabiotec SAC, Tumbes, Perú

² Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, San José, Ica, Perú

⁴ Laboratorio de investigación de larvas y postlarvas, Marinasol S.A, Punta Mero, Tumbes, Perú

⁵ E-mail: fernanda.dominguezm@gmail.com

Recibido: 29 de noviembre de 2019

Aceptado para publicación: 25 de julio de 2020

Publicado: 29 de septiembre de 2020

ABSTRACT

The effect of six cryoprotective solutions based on $MgCl_2$ and methanol, in addition with sucrose and 10% *Aloe vera* gel or 10% egg yolk, on the sperm viability in spermatophore and sperm mass of *Litopenaeus vannamei* was evaluated. Besides, cooling rates of -0.5, -1 and -2 °C/min were used until temperature reached -35, -80 and -100 °C prior to immersion in liquid nitrogen. The sperm viability rate was determined by eosin-nigrosin staining. The results showed that the solutions based on $MgCl_2$, sucrose plus egg yolk or *Aloe vera* gel better preserved sperm viability in spermatophore ($82.8 \pm 2.3\%$ and $72.6 \pm 3.1\%$) and in sperm mass ($83.4 \pm 2.5\%$ and $76 \pm 1.1\%$) without significant differences with the control group ($p > 0.05$). The freezing curve that presented less damage in spermatophore started from 25 °C and reached -35 °C with a rate of -1 °C/min using a cryoprotective solution with egg yolk and $MgCl_2$, showing a sperm viability greater than 80% without significant differences with the control group ($p > 0.05$), and a rate of -2 °C/min in the same temperature range for the group with sperm mass and a solution based on *Aloe vera* gel. In conclusion, the use of a solution based of $MgCl_2$, sucrose, *Aloe vera* gel or egg yolk and at a cooling rate of -1 °C/min or -2 °C/min until reaching -35 °C allows a successful freezing of spermatophores or sperm of *Litopenaeus vannamei*.

Key words: cryopreservation, spermatophore, sperm mass, *Litopenaeus vannamei*

INTRODUCCIÓN

El cultivo del «langostino blanco» *Litopenaeus vannamei* ha sido desarrollado desde la década del 70, y posee una gran importancia económica en la región norte del Perú. Esto ha conllevado al avance tecnológico enfocado en la reproducción en laboratorio (Gutiérrez *et al.*, 2012), así como en programas de mejoramiento genético (Castillo-Juárez *et al.*, 2015) con el objetivo de optimizar su cultivo.

La criopreservación de gametos es de gran relevancia en la acuicultura ya que permite preservar el material genético de variedades de especies de gran valor, y ha sido utilizado de manera exitosa en peces (Figuroa *et al.*, 2016; Tirpan *et al.*, 2016; Cuevas *et al.*, 2017,) en algunos moluscos de los géneros *Crassostrea* (Yang *et al.*, 2013; Riesco *et al.*, 2017) y *Ostrea* (Horváth *et al.*, 2012; Hassan *et al.*, 2017), equinodermos como el erizo de mar (Adams y Hessianand,

2004) y en crustáceos como cangrejos (Jeyalectumie y Subramoniam, 1989) y langostas (Fatihah *et al.*, 2016). Mediante la criopreservación es posible preservar los gametos a temperaturas de -196 °C, donde el metabolismo disminuye deteniendo el envejecimiento celular hasta su posterior uso mediante inseminación artificial.

El éxito de los protocolos de criopreservación depende del uso de adecuadas soluciones para la protección celular ante caídas extremas de temperatura y el uso de tasas de congelamiento y descongelamiento óptimos para cada tipo celular. Las soluciones de crioprotección incrementan la sobrevivencia celular ante una reducción de temperatura, así que deben ser mínimamente tóxicos (Barrett y Woodruff, 2010). Algunos de las soluciones más utilizadas en la acuicultura son el DMSO, con una gran eficiencia en gametos de una amplia variedad de especies animales (Bart *et al.*, 2006; Tirpan *et al.*, 2016; Riesco *et al.*, 2017), pero también se han utilizado el metanol, el etilenglicol

(Vuthiphandchai *et al.*, 2007; Cierieszko *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2018) y el $MgCl_2$, aunque con una frecuencia menor (Memon *et al.*, 2012). Estos compuestos, a su vez, pueden ser utilizados en combinación o en complemento con soluciones de extensión para mejorar la sobrevivencia de las células (Muchlisin *et al.*, 2005). Por ejemplo, el gel de *Aloe vera* y la yema de huevo fueron utilizados en la criopreservación de esperma de la tilapia roja (Yong *et al.*, 2017), donde la yema de huevo permitió mejores tasas de sobrevivencia.

Además de las soluciones de crioprotección, la velocidad de cambio de la temperatura juega un rol importante para la protección celular en el proceso de congelamiento y descongelamiento. Es así como se han diseñado procedimientos de congelación lenta, los cuales son realizados con ayuda de un equipamiento especial (Baust *et al.*, 2009), y aquellos de congelación rápida también llamados vitrificación (Tavukcuoglu *et al.*, 2012).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue optimizar un protocolo de criopreservación para el espermatóforo y masa espermática del langostino blanco *Litopenaeus Vannamei* evaluando seis soluciones crioprotectoras y nueve protocolos de congelamiento para la criopreservación de ambas muestras en nitrógeno líquido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Estudio y Langostinos

Los langostinos reproductores *L. vannamei* con madurez sexual alcanzada fueron provistos por el centro de investigación y desarrollo de poslarvas de langostinos de la empresa Marinasol S.A., ubicada en la región Tumbes, Perú. Los trabajos experimentales con los animales y parte de los análisis fueron desarrollados en sus instalaciones, y otra parte en el laboratorio de la empresa Incabiotec SAC, Tumbes. Se utilizaron lan-

gostinos saludables acondicionados en un estanque rectangular de 2 m³ de agua de mar, a temperatura entre 27 y 29 °C. El alimento utilizado fue pellet Vitalis (Skretting), suministrado tres veces al día en complemento con alimento fresco. El peso promedio de los langostinos machos utilizados en el estudio fue de 33.35 g.

Colecta de Espermatóforos y Masa Espermática

Se colectaron 296 espermatóforos de machos maduros mediante la técnica de estimulación manual aplicando una leve presión sobre la base de la esquina exterior de los espermatóforos hasta ser expulsado por el poro genital ubicado en la base del quinto par de periopodos. En el caso de ensayos con masa espermática, estas fueron extraídas con ayuda de unas pinzas a partir de los espermatóforos; es decir, una muestra de masa espermática fue extraída de un espermatóforo.

Los espermatóforos y las masas espermáticas fueron colocados inmediatamente y de forma individual en crioviales de 2 ml conteniendo 500 µl de solución de crioprotección o 250 µl de solución base (grupo en tratamiento) y 500 µl de solución tampón libre de calcio suplementado con vitamina C a 5 mM (grupo control).

Soluciones Crioprotectoras

Se preparó una solución tampón libre de calcio (NaCl 21.63 g/l, KCl 1.12 g/l, H_3BO_3 0.53 g/l, NaOH 0.19 g/l, $MgSO_4$ 4.93 g/l) suplementado con vitamina C a 5 mM. Posteriormente, con esta solución se prepararon seis soluciones crioprotectoras de prueba:

- *Solución 1*: 500 µl de una solución de sucrosa a 0.2M y $MgCl_2$ al 15%. El tiempo de exposición fue de 30 min (Hossain y Osuamkpe, 2007; Memon *et al.*, 2012).
- *Solución 2*: 500 µl de una solución de sucrosa a 0.2M y MeOH al 20%. El tiempo de exposición fue de 30 min (Lezciano *et al.*, 2004; Vuthiphandchai *et al.*, 2007).

- *Solución 3:* 250 µl de una solución de yema de huevo al 10% y sucrosa a 0.2M (medio base) durante 5 min. Luego de la toma de muestra, se adicionó 250 µl de MgCl₂ (Solución stock al 30%) llegando a una concentración final de 15%. El tiempo de exposición fue de 10 min y fue contado a partir de la conformación de la solución crioprotectora según Lezcano *et al.* (2004) y Memon *et al.* (2012) con las modificaciones descritas.
- *Solución 4:* 250 µl de una solución de yema de huevo al 10% y sucrosa a 0.2M (medio base) durante 5 min. Luego de la toma de muestra, se adicionó 250 µl MeOH (Solución stock al 20%) llegando a una concentración final de 10%. El tiempo de exposición fue de 10 min y fue contado a partir de la conformación de la solución crioprotectora según Lezcano *et al.* (2004) y Vuthiphandchai *et al.* (2007) con las modificaciones descritas.
- *Solución 5:* 250 µl de una solución de gel de *Aloe vera* al 10% y sucrosa a 0.2M (medio base) durante 5 min. Luego de la toma de muestra, se adicionó 250 µl de MgCl₂ (Solución stock al 30%) llegando a una concentración final de 15%. El tiempo de exposición fue de 10 min y fue contado a partir de la conformación de la solución crioprotectora según Memon *et al.* (2012), Melo *et al.* (2015) y Yong *et al.* (2017) con las modificaciones descritas.
- *Solución 6:* 250 µl de una solución de suero fetal bovino al 10% y sucrosa a 0.2M (medio base) durante 5 min. Luego de la toma de muestra, se adicionó 250 µl de MgCl₂ (Solución stock al 30%) llegando a una concentración final de 15%. El tiempo de exposición fue de 10 min y fue contado a partir de la conformación de la solución crioprotectora según Memon *et al.* (2012) y Mizuno *et al.* (2018) con las modificaciones descritas.

Como grupo control se utilizaron muestras frescas inmersas en solución tampón libre de calcio suplementada con vitamina C a 5 mM.

Posteriormente, las muestras en solución crioprotectora fueron colocados en un criocongelador programable (ASYMPTOTE - VIA Freeze Research), donde la temperatura descendió desde 25 °C hasta -35 °C utilizando una tasa de 2 °C/min. Se mantuvieron en dicha temperatura durante 5 min y luego se colocaron en nitrógeno líquido (-196 °C) por 1 h para la selección de la solución crioprotectora óptima. Transcurrido el tiempo de almacenamiento en nitrógeno líquido, las muestras fueron descongeladas en baño maría a 20 °C por 4 min para proceder a la evaluación de la viabilidad espermática. En este ensayo se utilizaron cuatro espermatozoides y cuatro masas espermáticas por tratamiento.

Curvas de Congelamiento

A partir del ensayo anterior se seleccionaron las dos soluciones de crioprotección con mayor éxito en la preservación de las células espermáticas de langostino. Para determinar el mejor protocolo de criopreservación se prepararon las muestras con ambas soluciones, como fue indicado en el ensayo previo. Se evaluaron nueve protocolos de congelación, siendo ocho de congelación lenta utilizando el criocongelador y uno de naturaleza semirápida por exposición de las muestras en vapor de nitrógeno líquido (Cuadro 1). Al final del mantenimiento de las muestras en la temperatura más baja, las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -196°C.

Los crioviales fueron almacenados en nitrógeno líquido por 24 h. El descongelamiento de las muestras se realizó a 35 °C por 4 min. Como grupo control se utilizaron muestras frescas inmersas en solución tam-

pón libre de calcio suplementada con vitamina C a 5 mM. En este ensayo se utilizaron seis espermátóforos y seis masas espermáticas por tratamiento.

Viabilidad Espermática

Los crioviales fueron descongelados y centrifugados a 1500 rpm por 5 min y se retiró la solución crioprotectora. En el caso de la masa espermática se resuspendió el pellet directamente en 200 μ l de sucrosa a 0.2 M y se dejó por 10 min para permitir la hidratación celular. En el caso de espermátóforos se adicionaron 200 μ l de sucrosa a 0.2 M dejando reposar por 1 min, luego se extrajo la masa espermática y se resuspendió en la misma solución por 10 min.

La evaluación de la viabilidad espermática fue realizada mediante la tinción eosina-nigrosina (eosina Y al 5% y nigrosina al 10%) y observación al microscopio (Vuthiphandchai *et al.*, 2007). Un volumen de 10 μ l de células espermáticas fueron colocados en una lámina con 5 μ l de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 s. Las lecturas se realizaron en microscopio óptico a 400X y se contaron 250 células espermáticas. El cálculo de la viabilidad espermática (ASV) se realizó según la fórmula: $ASV (\%) = (N^\circ \text{ de células viables} / N^\circ \text{ total de células contadas}) \times 100$. Se consideró la presencia de la «espina» en las células espermáticas como señal de viabilidad según refiere Lezcano *et al.* (2004).

Análisis de Datos

Los datos de la viabilidad espermática fueron evaluados mediante un análisis de varianza de dos vías usando un nivel de significancia de $p < 0.05$ y las diferencias entre tratamientos para los ensayos de soluciones crioprotectoras y de curvas de congelamiento fueron evaluadas mediante el método de Tukey y Duncan. Los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. El programa utilizado para el análisis fue SPSS 21.

RESULTADOS

Solución de Crioprotección

Las evaluaciones realizadas con los espermátóforos (Cuadro 1) y con las masas espermáticas (Cuadro 2) indican que los grupos tratados con las soluciones 3, 5 y 6 presentaron tasas de viabilidad estadísticamente semejantes al grupo control (no congelado), en tanto que las dos soluciones con metanol tuvieron una nula o baja viabilidad y significativamente diferente al grupo control ($p < 0.05$) (Cuadro 1).

Las soluciones 3, 5 y 6 mostraron el mayor grado de preservación de la viabilidad, tanto para espermátóforos como para masa espermática. En el sentido de la selección de una solución crioprotectora óptima tanto para espermátóforos como para masa espermática la solución 6 no fue considerada en los siguientes ensayos debido a la gran desviación estándar mostrada en masa espermática, a diferencia de la solución 3 y la solución 5 con las cuales se obtuvieron porcentajes de viabilidad semejantes y óptimas en ambas muestras.

Criopreservación

El estudio del efecto de las nueve curvas de congelamiento fue realizado para las muestras de espermátóforo y de masa espermática con la solución 3 (yema de huevo 10%, sucrosa 0.2M y $MgCl_2$ 15%) y la solución 5 (gel de *Aloe vera* 10%, sucrosa 0.2M y 250 μ l de $MgCl_2$ 15%).

El protocolo de congelación C (-1 $^\circ$ C/min desde 25 $^\circ$ C hasta -35 $^\circ$ C) utilizando la solución con gel de *Aloe vera* obtuvo el mayor porcentaje de viabilidad espermática con espermátóforos ($83.00 \pm 7.25\%$) y fue estadísticamente similar al grupo control no congelado ($97.53 \pm 5.04\%$). Por otro lado, los demás protocolos de congelación presentaron valores significativamente inferiores al grupo control ($p < 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 1. Protocolos de congelamiento de células espermáticas de langostino

Protocolo	Tasa de congelamiento (°C/minuto)	Rango de temperatura (°C)	Tiempo de espera (minutos)	Fuente
A	-0.5	25 a -35	5	Lezcano <i>et al.</i> (2004)
B	-0.5	25 a -100	5	(este estudio)
C	-1	25 a -35	5	Anchordoguy <i>et al.</i> (1988); Diwan (1999)
D	-1	25 a -80	5	(este estudio)
E	-1	25 a -100	5	(este estudio)
F	-2	25 a -35	5	(este estudio)
G	-2	25 a -80		Bart <i>et al.</i> (2006); Vuthiphandchai <i>et al.</i> (2007)
H	-2	25 a -100	5	(este estudio)
I	Aprox.-10	25 a -110	5	Uberti <i>et al.</i> (2014); Goldberg <i>et al.</i> (2000)

En el ensayo con la masa espermática utilizando la solución que contenía el gel de *Aloe vera*, se encontró que el protocolo F (-2 °C/min desde 25°C hasta -35°C) presentó el mayor porcentaje de viabilidad espermática ($79.00 \pm 18.36\%$) y sin diferencia significativa con el grupo control no congelado ($94.67 \pm 10.35\%$). Por otro lado, los demás protocolos de congelación presentaron valores significativamente inferiores al grupo control ($p < 0.05$) (Cuadro 4).

En los ensayos que utilizaron la yema de huevo dentro de la solución crioprotectora para la congelación de las muestras de espermátforo se obtuvo un mayor porcentaje de viabilidad cuando se congelaron las muestras con el protocolo C (-1 °C/min desde 25 °C hasta -35 °C), obteniendo $87.6 \pm 6.55\%$ de viabilidad espermática luego de la congelación, y sin diferencia significativa con el grupo control no congelado ($97.53 \pm 5.04\%$); mientras que los demás tratamientos presentaron valores significativamente

inferiores ($p < 0.05$) con excepción del protocolo F ($82.87 \pm 8.5\%$) (Cuadro 5).

En el caso de las muestras de masa espermática congeladas utilizando la solución con yema de huevo, el protocolo C presentó igualmente el mayor porcentaje de viabilidad espermática pos-congelación ($85.73 \pm 7.39\%$), aunque estadísticamente similar a los resultados de los protocolos F, G e I (Cuadro 6).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran el éxito en la preservación en nitrógeno líquido a corto plazo de espermátforos y masa espermática del langostino *Litopenaeus vannamei*. La mayoría de los estudios enfocados en la preservación del esperma de langostinos emplea el espermátforo como muestra; así en *Penaeus monodon* (Bart *et al.*, 2006), *Litopenaeus*

Cuadro 2. Efecto de seis soluciones crioprotectoras sobre la viabilidad espermática (promedio \pm DE) en espermátóforos de *Litopenaeus vannamei*

Solución crioprotectora	Composición	Viabilidad espermática (%)
1	500 μ l de solución (sucrosa 0.2M + MgCl ₂ 15%)	52.0 \pm 23.2
2	500 μ l de solución (sucrosa 0.2M + MeOH 20%)	0
3	250 μ l de solución base (yema de huevo 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	82.8 \pm 2.3 ^a
4	250 μ l de solución base (yema de huevo 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MeOH a concentración final de 10%	12.8 \pm 11.3
5	250 μ l de solución base (gel de <i>Aloe vera</i> 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	72.6 \pm 3.1 ^a
6	250 μ l de solución base (suero fetal bovino 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	80.0 \pm 1.7 ^a
Control	-	95.6 \pm 2.3

^a Valores con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$)

El grupo control consiste en espermátóforos frescos

vannamei (Uberti *et al.*, 2014), *Machrobrachium rosenbergii* (Valentina *et al.*, 2016) y *Penaeus merguensis* (Memon *et al.*, 2012), aunque también se ha utilizado la masa espermática para el congelamiento (Castelo *et al.*, 2015) con altos valores de viabilidad luego de una vitrificación. Por otro lado, algunos estudios compararon la congelación del espermátóforo, masa espermática y células en suspensión (Lezcano *et al.*, 2004; Salazar *et al.*, 2008), encontrando que la masa espermática soporta mejor los tratamientos de congelación, posiblemente debido a que en la suspensión espermática hay una mayor exposición conduciendo a una mayor toxicidad para las células, mientras que el ingreso

a las células en los espermátóforos puede ser heterogéneo al estar demasiado protegidas. No obstante, en el presente estudio no hubo diferencias notables en la viabilidad espermática obtenida entre el grupo de espermátóforo y de masas espermáticas,

Además del tipo de muestra, las soluciones de criopreservación son de gran importancia debido a las propiedades fisicoquímicas que poseen, protegiendo las células en el proceso de congelamiento. En el presente trabajo se evaluaron soluciones de criopreservación basadas en el uso del metanol al 20% y de MgCl₂ al 15% más sucrosa 0.2M, comparando su efecto con las

Cuadro 3. Efecto de seis soluciones crioprotectoras sobre la viabilidad espermática (promedio \pm DE) en la masa espermática de *Litopenaeus vannamei*

Solución crioprotectora	Composición	Viabilidad espermática (%)
1	500 μ l de solución (sucrosa 0.2M + MgCl ₂ 15%)	1.2 \pm 0.0
2	500 μ l de solución (sucrosa 0.2M + MeOH 20%)	1.8 \pm 1.4
3	250 μ l de solución base (yema de huevo 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	83.4 \pm 2.5 ^a
4	250 μ l de solución base (yema de huevo 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MeOH a concentración final de 10%	15.4 \pm 14.4
5	250 μ l de solución base (gel de <i>Aloe vera</i> 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	76.0 \pm 1.1 ^a
6	250 μ l de solución base (suero fetal bovino 10% + sucrosa 0.2M) y 250 μ l de MgCl ₂ a concentración final de 15%	65.6 \pm 20.4 ^a
Control	-	95.6 \pm 2.3

^a Valores con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control ($p > 0.05$)

El grupo control consiste en espermátóforo frescos

mismas soluciones en conjunto de aditivos (gel de *Aloe vera* y yema de huevo). Los resultados muestran una relativa mayor viabilidad espermática al utilizar MgCl₂ con yema de huevo (*Solución 3*) con porcentajes de viabilidad mayores al 80% en muestras de espermátóforo y masa espermática. Luego, se observaron valores altos de viabilidad utilizando MgCl₂ con suero fetal bovino (*Solución 6*), pero solo en el congelamiento de espermátóforos (80 \pm 1.7%), a diferencia del uso de MgCl₂ con gel de *Aloe vera* (*Solución 5*), el cual mostró niveles altos de viabilidad espermática en ambos tipos de muestras.

A pesar de que el metanol es considerado citotóxico a temperatura ambiente (Arun y Subramoniam, 1997), es uno de los agentes crioprotectores más comunes, ya que debido a su pequeño tamaño molecular penetra rápidamente la membrana celular a bajas temperaturas propiciando así una rápida deshidratación celular, evitando el daño por la formación de cristales en el interior celular (Hubalek, 2003). El metanol ha sido utilizado como solución crioprotectora de manera exitosa en la preservación de la masa espermática o espermátóforo de *L. vannamei* (Lezcano *et al.*, 2004; Vuthiphandchai *et al.*,

Cuadro 4. Efecto de nueve protocolos de congelamiento sobre la viabilidad espermática del espermátforo usando la Solución 5¹

Protocolo de congelamiento	Tasa de descenso de la temperatura (°C/min)	Rango de temperatura (°C)	Viabilidad espermática (%)
A	-0.5	25 a -35	66.20 ± 14.54
B	-0.5	25 a -100	44.20 ± 7.50
C	-1	25 a -35	83.00 ± 7.25 ^a
D	-1	25 a -80	57.67 ± 6.23
E	-1	25 a -100	67.33 ± 20.01
F	-2	25 a -35	57.73 ± 37.40
G	-2	25 a -80	72.67 ± 11.52
H	-2	25 a -100	54.33 ± 20.18
I	Aprox.-10	25 a -110	43.27 ± 57.69
Control	-		97.53 ± 5.04

¹ 250 µl de solución base (gel de Aloe vera 10% + sucrosa 0.2M) y 250 µl de MgCl₂ a concentración final de 15%

^a Valor con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control (p>0.05)

El grupo control consiste en espermátforo frescos

Cuadro 5. Efecto de nueve protocolos de congelamiento sobre la viabilidad espermática de la masa espermática usando la Solución 5¹

Protocolo de congelamiento	Tasa de descenso de la temperatura (°C/min)	Rango de temperatura (°C)	Viabilidad espermática (%)
A	-0.5	25 a -35	57.13 ± 18.41
B	-0.5	25 a -100	45.87 ± 10.54
C	-1	25 a -35	72.27 ± 10.26
D	-1	25 a -80	55.73 ± 3.89
E	-1	25 a -100	71.73 ± 24.20
F	-2	25 a -35	79.00 ± 18.36 ^a
G	-2	25 a -80	76.07 ± 7.57
H	-2	25 a -100	56.73 ± 14.20
I	Aprox.-10	25 a -110	19.87 ± 6.83
Control	-		94.67 ± 10.35

¹ 250 µl de solución base (gel de Aloe vera 10% + sucrosa 0.2M) y 250 µl de MgCl₂ a concentración final de 15%

^a Valor con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control (p>0.05)

El grupo control consiste en espermátforo frescos

Cuadro 6. Efecto de nueve protocolos de congelamiento sobre la viabilidad espermática del espermátforo usando la Solución 3¹

Protocolo de congelamiento	Tasa de descenso de la temperatura (°C/min)	Rango de temperatura (°C)	Viabilidad espermática (%)
A	-0.5	25 a -35	75.73 ± 5.05
B	-0.5	25 a -100	33.53 ± 10.07
C	-1	25 a -35	87.60 ± 6.55 ^a
D	-1	25 a -80	52.80 ± 13.06
E	-1	25 a -100	53.80 ± 47.80
F	-2	25 a -35	82.87 ± 8.50 ^a
G	-2	25 a -80	77.53 ± 10.94
H	-2	25 a -100	71.27 ± 23.61
I	Aprox.-10	25 a -110	72.33 ± 12.53
Control	-		97.53 ± 5.04

¹ 250 µl de solución base (gel de Aloe vera 10% + sucrosa 0.2M) y 250 µl de MgCl₂ a concentración final de 15%

^a Valor con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control (p>0.05)

El grupo control consiste en espermátforo frescos

Cuadro 7. Efecto de nueve protocolos de congelamiento sobre la viabilidad espermática de la masa espermática usando la Solución 3¹

Protocolo de congelamiento	Tasa de descenso de la temperatura (°C/min)	Rango de temperatura (°C)	Viabilidad espermática (%)
A	-0.5	25 a -35	69.53 ± 12.96
B	-0.5	25 a -100	45.93 ± 21.30
C	-1	25 a -35	85.73 ± 7.39 ^a
D	-1	25 a -80	59.40 ± 9.25
E	-1	25 a -100	68.93 ± 13.47
F	-2	25 a -35	83.47 ± 11.76 ^a
G	-2	25 a -80	81.60 ± 14.23 ^a
H	-2	25 a -100	53.33 ± 42.34
I	Aprox.-10	25 a -110	84.67 ± 19.35 ^a
Control	-		94.67 ± 10.35

¹ 250 µl de solución base (gel de Aloe vera 10% + sucrosa 0.2M) y 250 µl de MgCl₂ a concentración final de 15%

^a Valor con mayor viabilidad espermática y que no presentan diferencias significativas respecto al control (p>0.05)

El grupo control consiste en espermátforo frescos

2007) sobre otros reactivos como DMSO, etilenglicol, propilenglicol o formamida. Así también, se demostró una alta viabilidad espermática luego de una vitrificación de la masa espermática de *L. vannamei* utilizando el metanol al 10% como crioprotector (Castelo *et al.*, 2015). Por otro lado, Salazar *et al.* (2008) demostraron que no existieron diferencias significativas cuando se comparó su efecto con el DMSO y glicerol en masa espermática de *L. vannamei*. Sin embargo, otros estudios han mostrado menor capacidad de preservación espermática en langostinos (Memon *et al.*, 2012; Valentina *et al.*, 2016).

El $MgCl_2$ ha sido menos reportado que el metanol como agente de criopreservación, siendo mencionado en un estudio en *P. merguensis* superando a otros agentes protectores en capacidad de preservación espermática (Memon *et al.*, 2012). De manera distinta, el $MgCl_2$ ha sido utilizado principalmente como parte de diluyentes celulares previos a la congelación en especies acuícolas (Babiak *et al.*, 1997; Diwan y Kandasami, 1997; Zhang *et al.*, 2003; Yavap *et al.*, 2014) para mantener estables las condiciones extracelulares. En el presente estudio se encontraron regulares niveles de viabilidad usando el $MgCl_2$ con sucrosa ($52.0 \pm 23.2\%$), pero esto pudo ser debido a las propiedades crioprotectoras intrínsecas de la sucrosa (Hossain y Osuamkpe, 2007).

En el caso de los aditivos utilizados dentro de las soluciones de criopreservación, el gel de *Aloe vera* ha sido empleado por la presencia de azúcares que podrían beneficiar la protección de tipo extracelular frente a un congelamiento (Hu *et al.*, 2009; Chauhan *et al.*, 2014), además de contener antioxidantes como ácido fólico y zinc, que protegen a las células de procesos apoptóticos por el congelamiento (Pfeifer *et al.*, 2001). Se ha reportado su uso en criopreservación de semen de pecarí y de cerdos en concentraciones de 20 y 10%, respectivamente (Souza *et al.*, 2016; Guachun 2017), así como

en la preservación de espermatozoides del pez tambaqui (*Colossoma macropomum*), aunque en este caso los resultados mostraron una baja viabilidad que en combinación con DMSO (Melo *et al.*, 2015). En el presente estudio, la solución crioprotectora conformada por gel de *Aloe vera* junto con $MgCl_2$ (solución 5) mostró mejores resultados de viabilidad en masa espermática y espermatozoides en comparación a la solución con solo $MgCl_2$ (Solución 1)

Diversos estudios han demostrado que la yema de huevo en bajos porcentajes es muy considerada en la criopreservación debido a su composición de lípidos, proteínas y apolipoproteínas, las cuales pueden formar agregados dentro de una consistencia gelatinosa provocada por el plasma y los gránulos, a temperaturas de congelación, evitando la formación de cristales en las primeras etapas del congelamiento (Au *et al.*, 2015). Este aditivo ha sido empleado en la criopreservación de espermatozoides de pez gato africano (*Clarias gariepinus*) mostrando una alta tasa de fertilización y de eclosión (Muchlisin *et al.*, 2015). Además, en el pez barbo plateado (*Barbonymus gonionotus*) se determinó que la conservación del espermatozoides a $-34\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h resultó con alta viabilidad y movilidad (Abinawanto & Lestari 2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo con lo anteriormente descrito, ya que la solución con yema de huevo al 10% permitió una viabilidad espermática estadísticamente similar al control y colocándola como un aditivo mejor que el gel de *Aloe vera*.

El suero fetal bovino (FBS) es convencionalmente incluido en las soluciones de criopreservación debido a que contiene una mezcla de factores de crecimiento y sustancias indefinidas (Tae *et al.*, 2017) que potencian la supervivencia de los espermatozoides durante del proceso de criopreservación y descongelamiento (Yong *et al.*, 2014). Se ha reportado su uso como agente crioprotector a concentraciones entre 10 a 20% lo cual se

considera recomendable, dado que una mayor concentración presenta efectos negativos sobre la movilidad espermática (Mizuno *et al.*, 2018). En este trabajo se utilizó FBS al 10% junto a sucrosa a 0.2M y MgCl₂ a concentración final 15% (Solución 6) obteniendo un porcentaje de viabilidad de 80.0 ± 1.7 (espermatozoides) y 65.6 ± 20.4 (masa espermática), estadísticamente semejante a los valores obtenidos con las soluciones seleccionadas. La gran desviación estándar en masa espermática podría relacionarse a la presencia de citocinas en FBS, lo cual podría inducir reacciones a nivel celular (Seah Park *et al.*, 2018) generando inestabilidad en los resultados.

Los ensayos de evaluación de curvas de congelación demostraron mayor viabilidad espermática con tasas de descenso de temperatura hasta -35 °C, antes de ser sumergidas las muestras en nitrógeno líquido (protocolos C y F), a diferencias de los demás protocolos que permiten el descenso controlado hasta temperaturas mayores. Esto es acorde con el hecho de que una velocidad lenta de congelamiento podría generar mayor daño a nivel celular (Woods *et al.*, 2004). Otros trabajos han reportado resultados concordantes con el uso de tasas pequeñas de enfriamiento, aunque no tanto con las temperaturas intermedias alcanzadas, tales como la preservación de espermatozoides de *M. rosenbergii* con una tasa de congelamiento de -1.5 °C/min hasta -39°C logrando 64% de viabilidad (Valentina *et al.*, 2016), de 2°C/min hasta de -80 °C en células espermáticas de espermatozoides de *P. monodon* (Vuthiphanchai *et al.*, 2007) y de una tasa de enfriamiento entre 1.5 y 2.5°C hasta alcanzar -70 °C con espermatozoides de *M. rosenbergii* logrando una viabilidad mayor de 80% (Akarasanon *et al.*, 2004). Sin embargo, otros autores han mostrado que el uso de tasas mayores de descenso de temperatura también puede ser efectivo; así Arun y Subramoniam (1997) utilizaron con éxito tasas de -5°C/min hasta -39°C.

CONCLUSIONES

- El espermatozoides y la masa espermática del langostino *L. vannamei* pueden ser criopreservados utilizando una solución crioprotectora constituida por MgCl₂ al 15%, sucrosa 0.2 M y gel de *Aloe vera* al 10% o yema de huevo al 10%.
- Las tasas de congelamiento de -1 °C/min o -2 °C/min a una temperatura inicial de 25°C y llegando hasta -35°C son eficientes para la congelación del espermatozoides y la masa espermática en nitrógeno líquido (-196 °C).

Agradecimientos

El estudio se desarrolló con parte del Proyecto «Implementación y optimización de las tecnologías de criopreservación y transfección de gametos masculino del langostino *Litopenaeus vannamei*», Código 211-2015-FONDECYT-DE, financiado por FONDECYT-CONCYTEC en convenio con INCA-BIOTEC SAC. LDM recibió una beca (Convenio N° 000190-2017-FOND) otorgada por FONDECYT. Los autores agradecen a la empresa Marinasol S.A., en especial a la Ing. Katherine Araujo, al Blgo. Efraín Cayra y al Ing. César Solano por su participación dentro del proyecto.

LITERATURA CITADA

1. **Abinawanto SR, Lestari R. 2013.** Cryopreservation of java barb (*Barbonymus gonionotus*) using egg yolk as a cryoprotectant. *Global Vet* 10: 318-321. doi: 10.5829/idosi.gv.2013.10.3.72150
2. **Adams SL, Hessianand PA. 2004.** Cryopreservation of sea urchin (*Evechinus chloroticus*) sperm. *CryoLetters* 25: 287-299. doi: 10.1201/9780849380-549.ch41
3. **Akarasanon K, Damrongphol P, Poolsanguan W. 2004.** Long term cryopreservation of spermatozoides of the

- giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res* 35: 1415-1420. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01163.x
4. **Anchordoguy T, Crowe JH, Griffin FJ, Clark WH. 1988.** Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology* 25: 238-243. doi: 10.1016/0011-2240(88)90031-4
 5. **Arun R, Subramoniam T. 1997.** Effect of freezing rates on the survival of penaeid prawn larvae: a parameter analysis. *Cryo-letters* 18: 359-368.
 6. **Au C, Acevedo NC, Horner HT, Wang T. 2015.** Determination of the gelation mechanism of freeze-thawed hen egg yolk. *J Agric Food Chem* 63, 46: 10170-10180. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04109
 7. **Babiak I, Glogowski J, Brzuska E, Szumiec J, Adamek J. 1997.** Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquac Res* 28: 567-571. doi: 10.1006/cryo.2000.2284
 8. **Barrett SL, Woodruff TK. 2010.** Gamete preservation. In: *Oncofertility*, p 25-39. doi: 10.1007/978-1-4419-6518-9_3.
 9. **Bart AN, Choosuk S, Thakur DP. 2006.** Spermatophore cryopreservation and artificial insemination of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquac Res* 37: 523-528. doi: 10.1111/j.1365-2109.2006.01460.x
 10. **Baust JG, Gao D, Baust JM. 2009.** Cryopreservation: an emerging paradigm change. *Organogenesis* 5: 90-96. doi: 10.4161/org.5.3.10021
 11. **Castelo-Branco T, Batista AM, Guerra MM, Soares R, Peixoto S. 2015.** Sperm vitrification in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 436: 110-113. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.11.005
 12. **Castillo-Juárez H, Campos-Montes GR, Caballero-Zamora A, Montaldo HH. 2015.** Genetic improvement of Pacific white shrimp [*Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*]: perspectives for genomic selection. *Front Genet* 6: 93. doi: 10.3389/fgene.2015.00093
 13. **Chauhan S, Gupta KC, Agrawal M. 2014.** Application of biodegradable *Aloe vera* gel to control post harvest decay and longer the shelf life of grapes. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 3: 632-642.
 14. **Ciereszko A, Dietrich GJ, Nynca J, Dobosz S, Zalewski T. 2014.** Cryopreservation of rainbow trout semen using a glucose-methanol extender. *Aquaculture* 420: 275-281. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.014
 15. **Cuevas-Uribe R, Hu E, Daniels H, Gill AO, Tiersch TR. 2017.** Vitrification as an alternative approach for sperm cryopreservation in marine fishes. *N Am J Aquac* 79: 187-196. doi: 10.1080/15222055.2017.1281855
 16. **Diwan AD. 1999.** Cryopreservation of spermatophores of the marine shrimp, *Penaeus indicus* H. Milne Edwards. *Ind J Fisheries* 46: 159-166.
 17. **Diwan AD, Kandasami K. 1997.** Freezing of viable embryos and larvae of marine shrimp, *Penaeus semisulcatus* de Haan. *Aquac Res* 28: 947-950. doi: 10.1046/j.1365-2109.1997.00926.x
 18. **Fatiha SN, Jasmani S, Abol-Munafi AB, Noorbaiduri S, Muhd-Farouk H, Ikhwanuddin M. 2016.** Development of a sperm cryopreservation protocol for the mud spiny lobster, *Panulirus polyphagus*. *Aquaculture* 462: 56-63. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.04.025
 19. **Figuroa E, Valdebenito I, Merino O, Ubilla A, Risopatrón J, Farias JG. 2016.** Cryopreservation of Atlantic salmon *Salmo salar* sperm: effects on sperm physiology. *J Fish Biol* 89: 1537-1550. doi: 10.1111/jfb.13052
 20. **Goldberg R, Tenório de Albuquerque, Miyako L. 2000.** Criopreservação de material genético do camarão-de-água-doce *Macrobrachium rosenbergii*. *Rev Bras Zootec* 29: 2157-2161.
 21. **Guachun MH. 2017.** Efecto del extracto del *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* miller) en la congelabilidad del semen porcino. Tesis de Maestría. Ecuador: Univ. de Cuenca. 66 p.

22. **Gutiérrez-Salazar GJ, González-González A, Hernández-Acosta M, Loredó-Osti J, Guzmán-Sáenz FM. 2012.** Evaluación de la maduración y la reproducción de camarones *Litopenaeus vannamei* en sistema de recirculación de agua. *Ciencia Pesquera* 20: 29-37.
23. **Hassan MM, Li X, Liu Y, Qin JG. 2017.** Sperm cryopreservation in the spermcasting Australian flat oyster *Ostrea angasi* by a programmable freezing method. *Cryobiology* 76: 119-124. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.03.007
24. **Horváth Á, Bubalo A, Èuèviæ A, Burtloviç V, Kotrik L, Urbanyi B, Glamuzina B. 2012.** Cryopreservation of sperm and larvae of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *J Appl Ichthyol* 28: 948-951. doi: 10.1111/jai.12066
25. **Hossain AM, Osuamkpe CO. 2007.** Sole use of sucrose in human sperm cryopreservation. *Arch Androl* 53: 99-103. doi:10.1080/01485010701225675
26. **Hu JH, Li QW, Zhang T, Jiang ZL. 2009.** Effect of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Cryobiology* 59: 244-249. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.04.008
27. **Jeyalectumie C, Subramoniam T. 1989.** Cryopreservation of spermatozoa and seminal plasma of the edible crab *Scylla serrata*. *Biol Bull* 177: 247-253. doi: 10.2307/1541940
28. **Lezcano M, Granja C, Salazar M. 2004.** The use of flow cytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cryobiology* 48: 349-356. doi: 10.1016/j.cryobiol.-2004.03.003
29. **Melo-Maciél MA, Leite-Castro LV, Leite JS, Oliverira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes JF, Salmito-Vanderley CS. 2015.** *Aloe vera* in the cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) sperm. *Arq Bras Med Vet Zoo* 67: 945-949. doi: 10.1590/1678-4162-7807
30. **Memon AJ, Talpur AD, Khan MI, Fanddudm MO, Jasmani S, Abol-Munafi AB, Ikhwanuddin M. 2012.** Optimization of spermatozoa cryopreservation protocol of banana shrimp (*Penaeus merguensis*) (De Man, 1888). *J Anim Vet Adv* 11: 1688-1704. doi: 10.3923/javaa.2012.1688.1704
31. **Mizuno Y, Fujiwara A, Yamano K, Ohta H. 2018.** Motility and fertility of cryopreserved spermatozoa of the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Aqua Res* 2018. doi: 10.1111/are.13872
32. **Muchlisin ZA, Nadiyah WN, Nadiya N, Fadli N, Hendri A, Khalil M, Siti-Azizah M. 2015.** Exploration of natural cryoprotectants for cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*, Burchell 1822 (Pisces: Clariidae) spermatozoa. *Czech J Anim Sci* 60: 10-15. doi: 10.17221/7906-CJAS.
33. **Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, Behne D. 2001.** Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* 15: 1236-1238.
34. **Riesco MF, Félix F, Matias D, Joaquim S, Suquet M, Cabrita E. 2017.** First study in cryopreserved *Crassostrea angulata* sperm. *Gen Comp Endocrinol* 245: 108-115. doi: 10.1016/j.yggen.2016.05.003
35. **Salazar M, Lezcano M, Granja C. 2008.** Protocol for cryopreservation of *Penaeus vannamei* sperm cells. In: *Methods in reproductive aquaculture - Marine and freshwater species*. CRC Press. p 505-508.
36. **Seah Park, Dong Ryul Lee, Ji Sun Nam, Chul Woo Ahn, Haekwon Kim. 2018.** Fetal bovine serum-free cryopreservation methods for clinical banking of human adipose-derived stem cells. *Cryobiology* 81: 65-73. doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.02.008

37. **Souza AL, Lima GL, Peixoto GC, Silva AM, Oliveira MF, Silva AR. 2016.** Use of *Aloe vera*-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. *Theriogenology* 85: 1432-1438. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.01.007
38. **Tae Hoon Jang, Sung Choel Park, Ji Hyun Yang, Jung Yoon Kim, Jae Hong Seok, Ui Seo Park, Chang Won Choi, et al. 2017.** Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* 6: 12-18. doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001
39. **Tavukcuoglu S, Al-Azawi T, Khaki AA, Al-Hasani S. 2012.** Is vitrification standard method of cryopreservation. *Middle East Fertil Soc J* 17: 152-156. doi: 10.1016/j.mefs.2012.07.007
40. **Tirpan MB, Özgöray ED, Alemdar H, Akçay E. 2016.** Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) semen and fertility. *Turk J Vet Anim Sci* 40: 200-206. doi: 10.3906/vet-1506-14
41. **Uberti M, Vieira F, Salência H, Vieira G, Vinatea L. 2014.** Assessment of viability of sperm cells of *Litopenaeus vannamei* on cryopreservation. *Braz Arch Biol Technol* 57: 374-380. doi: 10.1590/S1516-89132014005000013
42. **Valentina-Claudet P, Narasimman S, Natesan M. 2016.** Effect of cryoprotectants and cooling rates on fertility potential of sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Anim Reprod Sci* 171: 49-57. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.05.013
43. **Vuthiphandchai V, Nimrat S, Kotcharat S, Bart AN. 2007.** Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology* 68: 1192-1199. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.08.024
44. **Wei F, Yu L, Li R, Zhang X, Zhang X, Zhang Y, Wang Y, et al. 2018.** Studies of the cryopreservation condition of *Gymnocypris przewalskii* spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 188: 13-20. doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.10.021
45. **Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. 2004.** Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48: 146-156. doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.03.002
46. **Yang H, Supan J, Guo X, Tiersch TR. 2013.** Nonlethal sperm collection and cryopreservation in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *J Shellfish Res* 32: 429-437. doi: 10.2983/035.032.0223
47. **Yavaş Ý, Bozkurt Y, Yýldýz C. 2014.** Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinus carpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concentrations on post-thaw motility, fertilization and hatching success of embryos. *Aquacult Int* 22: 141-148. doi: 10.1007/s10499-013-9698-6
48. **Yong-An Lee, Yong-Hee Kim, Seung-Jung Ha, Bang-Jin Kim, Ki-Jung Kim, Mi-Seon Jung, et al. 2014.** Effect of sugar molecules on the cryopreservation of mouse spermatogonial stem cells. *Fertil Steril* 101: 1165-1175. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.12.033
49. **Yong SY, Nguang SI, Kari A. 2017.** Comparison between the effect of egg yolk-based extender and *Aloe vera* (*Aloe barbadensis*)-based extender on red tilapia (*Oreochromis niloticus*) sperm quality. *J Fundam Appl Sci* 9: 813-820. doi: 10.4314/jfas.v9i2s.50
50. **Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J, Chen SL. 2003.** Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology* 60: 989-996. doi: 10.1016/S0093-691X(03)00097-9