

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio
Natural**



**Influencia del pH ambiental en la motilidad
del esperma de la anguila europea (*Anguilla
anguilla*)**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autor: Emilio Francés Herrero

Tutora: Dra. Luz Pérez Igualada

Curso académico: 2017/2018

Valencia, julio 2018



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL**

Ficha resumen del Trabajo Fin de
Grado

Datos personales

Nombre y apellidos: EMILIO FRANCÉS HERRERO

Datos del Trabajo de Fin de Grado

Título del TFG: Influencia del pH ambiental en la motilidad del espermatozoide de la anguila europea (*Anguilla anguilla*).

Lugar de realización: DEPARTAMENTO CIENCIA ANIMAL (UPV) Localidad y fecha: Valencia, julio de 2018

Titulación: GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Especialidad: Biología celular, Reproducción

Tutor/a: LUZ PÉREZ IGUALADA

Resumen

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, los espermatozoides de la mayoría de los peces se encuentran inactivos en los testículos. Su activación se produce como consecuencia de un choque osmótico (hiper o hipoosmótico, según se trate de especies de agua salada o dulce), cuando son liberados al medio externo. Sin embargo, no existe un consenso en la comunidad científica sobre cuál es el mecanismo fisiológico que induce la activación espermática. En la anguila europea, objeto de estudio, trabajos previos han mostrado que la composición iónica del plasma seminal es más importante para la activación que la del medio activador; además, han presentado al pH como el factor más importante de este último. El principal objetivo de este trabajo es estudiar la influencia del pH del medio extracelular (pHe), tanto del plasma seminal como del agua de mar, en la activación de la motilidad espermática en la anguila europea.

Un grupo de machos de anguila europea fue sometido semanalmente a inyecciones de gonadotropina coriónica humana recombinante (rec-hCG) para inducir en ellos la maduración sexual y, a partir de la sexta dosis suministrada, la espermiación. Veinticuatro horas después de cada inyección se extrajeron las muestras de espermatozoides y se evaluó, en diferentes condiciones, la motilidad total y otros parámetros cinéticos de las mismas, mediante sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). El pH intracelular (pHi) se evaluó por medio de citometría de flujo.

Los ensayos que se llevaron a cabo en el seno de este proyecto, incluyen: estudio del efecto del pH del medio diluyente (plasma seminal artificial) y del medio activador (agua de mar) en la motilidad del espermatozoide y en el pH intracelular; estudio de la interacción del pH con el potasio (K^+) del medio diluyente en la motilidad espermática; y análisis del efecto del pH intracelular en la motilidad de los espermatozoides, mediante el uso de un intercambiador de iones K^+/H^+ .

Los resultados mostraron que el pH del medio activador tiene una mayor influencia sobre la motilidad espermática que el pH del medio diluyente. Asimismo, se observó la existencia de un gradiente de pH entre el interior y el exterior celular en estado quiescente, así como de variaciones en el pH intracelular tras el inicio de la motilidad. Por último, no se observó efecto alguno de la interacción del pH con el potasio del medio diluyente sobre la motilidad espermática, pero sí del pH intracelular fijado con nigericin sobre esta.

Palabras clave

Anguilla, motilidad espermática, pH, CASA, citometría de flujo.



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL

Fitxa resum del Treball de Fi de
Grau

Dades personals

Nom y cognoms: EMILIO FRANCÉS HERRERO

Dades del Treball de Fi de Grau

Títol del TFG: Influència del pH ambiental en la motilitat de l'esperma de l'anguila europea (*Anguilla anguilla*).

Lloc de realització: DEPARTAMENT CIÈNCIA ANIMAL (UPV) Localitat y data: València, juliol de 2018

Titulació: GRAU EN BIOTECNOLOGIA

Especialitat: Biologia cel·lular, Reproducció

Tutor/a: LUZ PÉREZ IGUALADA

Resum

A diferència del que passa en mamífers, els espermatozoides de la majoria dels peixos es troben inactius als testicles. La seva activació es produeix com a conseqüència d'un xoc osmòtic (hiper o hipoosmòtic, segons es tracti de peixos d'aigua salada o dolça), quan són alliberats al medi extern. No obstant això, no existeix un consens en la comunitat científica sobre quin és el mecanisme fisiològic que induïx l'activació espermàtica. En l'anguila europea, objecte d'estudi, treballs previs han mostrat que la composició iònica del plasma seminal és més important per a l'activació que la del medi activador; a més, han presentat el pH com el factor més important d'aquest últim. El principal objectiu d'aquest treball és estudiar la influència del pH del medi extracel·lular (pHe), tant del plasma seminal com de l'aigua de mar, en l'activació de la motilitat espermàtica de l'anguila europea.

Un grup de mascles d'anguila europea va ser sotmès setmanalment a injeccions de gonadotropina coriònica humana recombinant (rec-hCG) per induir la maduració sexual i, a partir de la sisena dosi subministrada, l'espermació. Vint-i-quatre hores després de cada injecció es van extraure les mostres d'esperma i es va avaluar, en diferents condicions, la motilitat total i altres paràmetres cinètics de les mateixes mitjançant sistemes CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). El pH intracel·lular (pHi) es va avaluar per mitjà de citometria de flux.

Els assajos que es van dur a terme en el si d'aquest projecte, inclouen: estudi de l'efecte del pH del medi diluent (plasma seminal artificial) i del medi activador (aigua de mar) en la motilitat de l'esperma i en el pH intracel·lular; estudi de la interacció del pH amb el potassi (K^+) del medi diluent en la motilitat espermàtica; i anàlisi de l'efecte del pH intracel·lular en la motilitat dels espermatozoides, fent ús d'un intercanviador d'ions K^+/H^+ .

Els resultats van mostrar que el pH del medi activador té una major influència sobre la motilitat espermàtica que el pH del medi diluent. Així mateix, es va observar l'existència d'un gradient de pH entre l'interior i l'exterior cel·lular en estat quiescent, així com de variacions en el pH intracel·lular després de l'inici de la motilitat. Per últim, no es va observar cap efecte de la interacció del pH amb el potassi del medi diluent sobre la motilitat espermàtica, però sí del pH intracel·lular fixat amb nigericin sobre aquesta.

Paraules Clau

Anguilla, motilitat espermàtica, pH, CASA, citometria de flux.



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA
SUPERIOR DE
INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL
MEDIO NATURAL

Summary of the Degree Final
Project

Personal information

Name and surname: EMILIO FRANCÉS HERRERO

Data of the Degree Final Project

Title: Influence of ambient pH on motility of European eel sperm (*Anguilla anguilla*).

Place of performance: DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE (UPV) City and date: Valencia, July de 2018

Degree: BACHELOR'S DEGREE IN BIOTECHNOLOGY

Speciality: Cell biology, Reproduction

Tutor: LUZ PÉREZ IGUALADA

Abstract

Unlike what happens in mammals, most fish sperm is inactive in the testicles. Its activation occurs as a consequence of an osmotic shock (hyper or hypoosmotic, depending on whether it is marine or freshwater species), when they are released to the external environment. However, there is no consensus in the scientific community about what is the physiological mechanism that induces sperm activation. In the European eel, object of study, previous research projects have shown that the ionic composition of the seminal plasma is more important for the activation than that of the activating medium; in addition, pH was shown as the most important factor of the latter. The main objective of this paper is to study the influence of the pH of the extracellular medium (pHe), both seminal plasma and seawater, in the activation of sperm motility in European eel.

A group of European eel males underwent weekly injections of recombinant human chorionic gonadotropin (rec-hCG) to induce sexual maturation and, from the sixth dose supplied, the spermiation. Twenty-four hours after each injection, the sperm samples were collected and, under different conditions, the total motility and other kinetic parameters of the same were evaluated by means of CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) systems. The intracellular pH (pHi) was evaluated via flow cytometry.

The tests that were carried out within this project include: study of the effect of the pH of the diluting medium (artificial seminal plasma) and the activating medium (seawater) on sperm motility and intracellular pH; study of the interaction of the pH and the potassium (K^+) of the diluent in sperm motility; and analysis of the effect of intracellular pH on sperm motility, through the use of a K^+/H^+ ion exchanger.

The results showed that the pH of the activating medium has a greater influence on sperm motility than the pH of the diluting medium. Likewise, the existence of a pH gradient between cellular interior and exterior in a quiescent state, as well as variations in intracellular pH after the onset of motility were observed. Finally, no effect of the interaction of the pH and the potassium of the diluent medium was observed on sperm motility, but the intracellular pH fixed with nigericin had an effect on it.

Key Words

Anguilla, motilidad espermática, pH, CASA, citometría de flujo.

ÍNDICES

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y taxonomía de la anguila europea.....	1
1.2. Ciclo biológico y situación actual.....	1
1.3. Estructura general del espermatozoide de los peces.....	3
1.4. Plasma seminal de los peces.....	4
1.5. Motilidad espermática en peces.....	4
1.5.1. Factores que afectan a la motilidad espermática.....	5
1.5.1.1. Osmolalidad.....	5
1.5.1.2. pH.....	6
1.5.1.3. Flujo de iones.....	7
1.5.1.4. Quimiotaxis.....	7
1.5.2. Transducción de señales: AMP cíclico.....	8
1.5.3. Mecanismo de activación espermática en especies marinas.....	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo general.....	10
2.2. Objetivos específicos.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	11
3.1. Químicos y soluciones.....	11
3.2. Mantenimiento de los peces y tratamiento hormonal.....	11
3.3. Recolección de esperma y muestreo.....	12
3.4. Medios diluyentes y activadores.....	13
3.5. Evaluación de la motilidad del esperma.....	14
3.6. Mediciones relativas de pH intracelular.....	14
3.7. Pruebas realizadas.....	15
3.7.1. Efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática.....	15
3.7.2. Efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular.....	15
3.7.3. Efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática.....	16
3.7.4. Efecto del pH del medio diluyente en la variación del pH intracelular post-activación.....	16
3.8 Pruebas piloto complementarias.....	16
3.8.1. Interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática.....	16
3.8.2. Efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pH _i con nigericin.....	17
3.9. Análisis estadístico.....	17

4. RESULTADOS.....	18
4.1. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática.....	18
4.2. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular	19
4.3. Estudio del efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática.....	20
4.4. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en la variación del pHi post-activación.....	21
4.4.1. Variación del pHi post-activación con agua de mar a pH 8.2	21
4.4.2. Variación del pHi post-activación con agua de mar a pH 6.5	22
4.5. Estudio de la interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática....	23
4.6. Estudio del efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pHi con nigericin.....	24
5. DISCUSIÓN.....	25
5.1. Efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática	25
5.2. Efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular	26
5.3. Efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática	26
5.4. Efecto del pH del medio diluyente en la variación del pHi post-activación	27
5.5. Efecto de la interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática	28
5.6. Efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pHi con nigericin.....	29
6. CONCLUSIONES.....	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31
8. ANEXOS	41
8.1. Anexo I.....	41
8.2. Anexo II.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Rangos de los valores registrados para los principales parámetros de calidad del agua	12
Tabla 2. Composición (mM), osmolalidad (mOsm/kg) y pH de los medios empleados. Medios diluyentes: P1 estándar y 100-K (enriquecido en potasio). Medio activador: ASW.....	13
Tabla 3. Combinación de medios empleados para las medidas de motilidad.	16
Tabla 4. Efecto del pH del medio diluyente sobre los diferentes parámetros de motilidad espermática, a 0 y 24 horas. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 14).....	18
Tabla 5. Efecto del pH del medio activador sobre los diferentes parámetros de motilidad espermática. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 10)	20
Tabla 6. Efecto del pH y del potasio del medio diluyente sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 3).....	23
Tabla 7. Efecto del pH intracelular en el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 3).....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de la anguila europea.....	1
Figura 2. Captura en toneladas de anguila europea a nivel mundial	2
Figura 3. Estructura de los axonemas de espermatozoides de diferentes especies marinas	3
Figura 4. Ilustración esquemática que muestra como los espermatozoides de salmónidos (A), peces de agua dulce (B) y peces marinos (C) inician su motilidad durante el desove natural	5
Figura 5. Esquema del mecanismo de la iniciación de la motilidad espermática en especies de agua marina.....	9
Figura 6. Acuarios donde se mantuvieron a las anguilas durante el experimento.....	11
Figura 7. Recolección del esperma de anguila europea	12
Figura 8. Efecto del pH del medio P1 y del Tiempo sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 14).....	19
Figura 9. Regresión entre el pHi y el pHe del diluyente (n = 6)	20
Figura 10. Efecto del pH del agua de mar sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 10)	21
Figura 11. Cambio en el pHi tras la activación con agua de mar a pH 8.2, en muestras diluidas en P1 a diferentes pHe (n = 5).....	21
Figura 12. Variación del pH intracelular tras la activación con agua de mar a pH 6.5, en muestras diluidas en P1 a diferentes pHe (n = 4)	22
Figura 13. Efecto del pH y del potasio del medio P1 sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) en tres muestras diferentes (A, B y C).	23
Figura 14. Efecto del pH intracelular (igualado al pH del medio diluyente con nigericin) sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) en tres muestras diferentes (A, B y C).....	24

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de los espermatozoides
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA (MR)	Análisis de la varianza con un factor de medidas repetidas
ASW	<i>Artificial Sea Water</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BCF	Frecuencia de batido cruzado
BSA	Albúmina de suero bovino
CASA	<i>Computer-assisted sperm analysis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
FA	Porcentaje de espermatozoides rápidos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FPS	Fotogramas por segundo
HSAP	Péptido activador del esperma del arenque
ICES VGEEL	Grupo de Trabajo en Anguilas del Consejo Internacional para la Exploración del Mar
LIN	Índice de linealidad
ME	Porcentaje de espermatozoides con velocidad media
MOT	Motilidad total
MP	Motilidad progresiva
MP FA	Motilidad progresiva rápida
PCB	Policloruro de bifenilo
pHe	pH extracelular
pHi	pH intracelular
rec-hCG	Gonadotropina coriónica humana recombinante
SEM	Error estándar de la media
SL	Porcentaje de espermatozoides lentos
SMIF	Factor de iniciación de la motilidad del esperma
STR	Índice de rectitud
UI	Unidad Internacional
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
VAP	Velocidad promedio
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
WOB	Índice de oscilación

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción y taxonomía de la anguila europea

La anguila europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758) es un pez teleósteo eurihalino presente en aguas de Europa y norte de África. Pertenece al antiguo superorden Elopomorpha, al orden Anguilliformes y a la familia Anguillidae. Se caracteriza por tener un cuerpo alargado de entre 40 y 60 cm, aunque el tamaño de las hembras puede llegar a superar los 130 cm (Dekker *et al.*, 1998). Dicho cuerpo, parecido al de una serpiente, es cilíndrico en la mitad anterior y tiene el extremo posterior comprimido lateralmente. Cuenta con dos pequeñas aletas pectorales y una única aleta larga y continua que deriva de la fusión de las aletas dorsal y anal con la caudal (Deelder, 1984).

La piel de la anguila europea está compuesta por diminutas escamas elípticas y contiene abundantes glándulas mucosas que le aportan viscosidad y resistencia a cambios osmóticos (Gutiérrez, 2003). En su estado de larva leptocephala son pequeñas, con forma de hoja y transparentes, color que mantendrán en la siguiente fase de angula sin pigmentar (*glass eel* en inglés). Tras un proceso de metamorfosis, los jóvenes ejemplares adquieren un lomo de color verdoso y un vientre amarillento (estado de anguila amarilla), que tras 6-20 años de crecimiento cambiarán a negruzco en el lomo y plateado en los costados y vientre (etapa de anguila plateada), antes de comenzar la migración reproductiva al mar (Van Ginneken & Thillart, 2000).

1.2. Ciclo biológico y situación actual

Gracias a las expediciones en el Océano Atlántico realizadas por el biólogo danés Johannes Schmidt, que encontró pequeñas larvas de anguila europea en el Mar de los Sargazos hace aproximadamente 100 años, se obtuvieron las primeras evidencias acerca del ciclo biológico y del sitio de desove de esta especie (**Figura 1**; Van Ginneken & Maes, 2005).



Figura 1. Ciclo biológico de la anguila europea (Jiménez, 2016).

Cuando las anguilas alcanzan una longitud de 30-40 cm (6-12 años) en el caso de los machos y 55-65 cm (10-20 años) en el de las hembras, los ejemplares abandonan los ríos y lagos continentales en otoño (en función de la fase lunar y las condiciones atmosféricas; Desaunay & Guerault, 1997; Okamura *et al.*, 2002; Tesch, 2003) y comienzan su migración reproductiva, que durará alrededor de 6-7 meses. Entre otros cambios fisiológicos, en esta etapa migratoria sus ojos se agrandan, su color cambia y se cree que se inicia su desarrollo sexual. Tras el desove en el Mar de los Sargazos, los adultos mueren (Usui, 1991) y las larvas nacidas viajan con la Corriente del Golfo durante aproximadamente 1 año (Lecomte-Finiger, 1994; Arai *et al.*, 2000), hasta alcanzar las costas europeas. Acto seguido, experimentan una primera metamorfosis (*glass eel*), ascienden por los ríos y colonizan áreas de agua dulce, donde inician su actividad trófica y crecen, permaneciendo sexualmente inmaduras (Tesch, 2003). Su principal fuente de alimento son los invertebrados acuáticos, pero adaptan su dieta a la fuente nutritiva más abundante en cada zona, incluyendo organismos muertos (Sinha & Jones, 1975).

Alrededor de 5.000 toneladas de anguila europea se consumen anualmente en el mundo (FishStatJ, 2016). La cría en cautividad de la anguila europea es actualmente inviable y, por ello, su producción en acuicultura se basa en la captura de especímenes en etapa de angula y posterior engorde en piscifactorías (Usui, 1991). Esto ha llevado a una sobreexplotación pesquera (Castonguay *et al.*, 1994; Dekker, 2003) que, sumada a otros factores como la contaminación (especialmente por PCB tóxicos que se liberan de las reservas de grasa de las anguilas durante su migración; Castonguay *et al.*, 1994), cambios climáticos y oceanográficos (Knights, 2003) e infecciones virales y parasitarias (Norton *et al.*, 2005), han provocado, desde los años 1970, un descenso muy grave de las poblaciones y capturas de anguila europea (**Figura 2**) y de otras especies de anguila alrededor de todo el mundo (Stone, 2003).

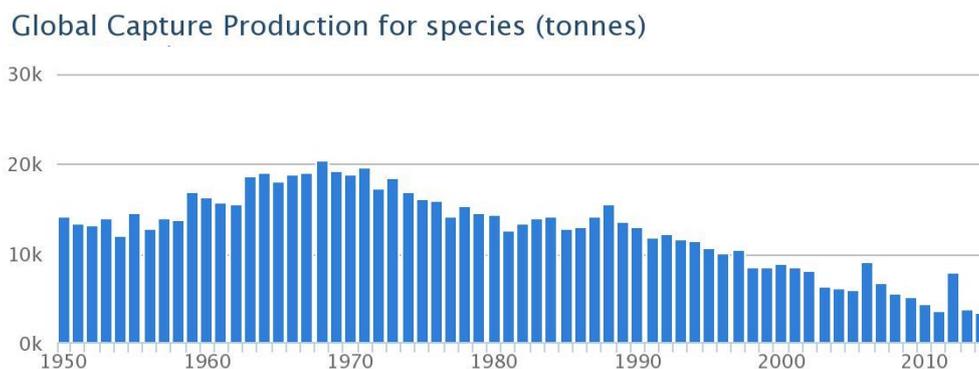


Figura 2. Captura en toneladas de anguila europea a nivel mundial (FishStatJ, 2016).

Según el informe del Grupo de Trabajo en Anguilas del Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES WGEEL) de 2017, el índice de captura de angula sin pigmentar (que es una medida del éxito del desove reciente) ha descendido hasta situarse en un mínimo histórico de aproximadamente el 1-8% del registrado en el período 1960-1979. Ante tal situación de emergencia, la anguila europea ha sido clasificada en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como una especie en “peligro crítico de extinción”. Por su parte, la Unión Europea aprobó en 2007 el Reglamento (CE) 1100/2007, por el que se establecen medidas para la recuperación de la población de anguila a través de planes nacionales de gestión específicos.

A nivel de investigación, la anguila constituye un excelente modelo para el estudio del espermatozoide de peces, ya que es posible obtener su semen durante todo el año por medio de inyecciones semanales de gonadotropina coriónica humana recombinante (rec-hCG), que provocan la espermiación al cabo de unas 5-6 semanas (Pérez *et al.*, 2000).

1.3. Estructura general del espermatozoide de los peces

Los espermatozoides de los organismos acuáticos son células móviles flageladas, que se liberan al agua durante la puesta. En los espermatozoides de la mayoría de las especies acuáticas, se distinguen tres secciones principales (Stoss, 1983): una cabeza ovalada, que alberga al núcleo y al acrosoma (ausente en gran parte de peces teleósteos; Afzelius, 1959), envueltos por una membrana plasmática; una pieza media que contiene el centríolo y gran cantidad de mitocondrias; y, por último, un flagelo encargado de impulsar al espermatozoide mediante rápidos movimientos helicoidales. En muchas especies marinas, el flagelo (50-60 μm de largo) adopta forma de cinta, en vez de cilíndrica, lo que proporciona una mejor movilidad al espermatozoide (Cosson *et al.*, 1997).

A la estructura interna del flagelo, que constituye la maquinaria esencial para la motilidad, se la conoce como axonema (**Figura 3**). En la mayoría de los peces, el axonema es de tipo “9+2”, es decir, está compuesto por 9 pares de microtúbulos periféricos (A y B) unidos por anexina y un par central. El microtúbulo A, de menor tamaño y más interno que el B, presenta dos brazos de dineína capaces de interaccionar de manera ATP-dependiente con este último, generando así el movimiento.

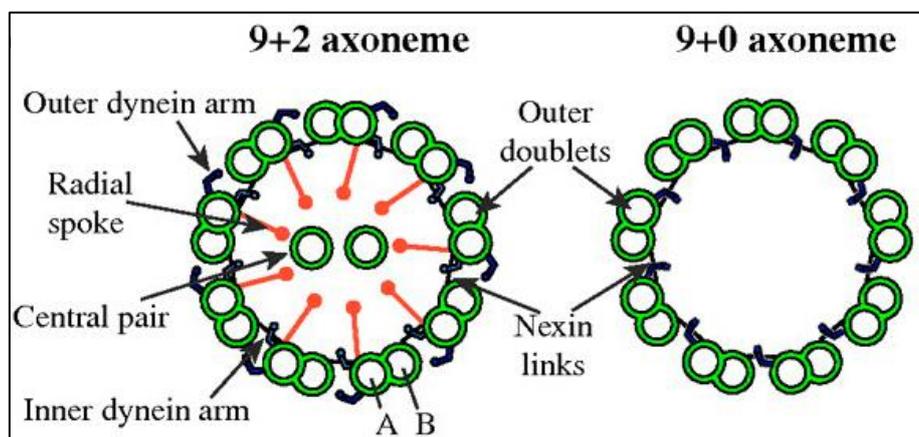


Figura 3. Estructura de los axonemas de espermatozoides de diferentes especies marinas (adaptado de Dawe *et al.*, 2007).

No obstante, el flagelo de algunas especies, como es el caso de la anguila europea, carece del par central de microtúbulos (9+0; Billard *et al.*, 1973; Todd, 1976), rasgo característico de los peces del superorden Elopomorpha (Mattei & Mattei, 1975). También es característica en alguna de las especies pertenecientes a la infraclase Teleostei (incluida la anguila europea), la ausencia de las conexiones radiales y de los brazos de dineína externos (Baccetti *et al.*, 1979; Gibbons *et al.*, 1983, 1985). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en otras especies eucariotas con una estructura reducida del axonema, el flagelo de la anguila europea sigue siendo capaz de alcanzar frecuencias de batido excepcionalmente altas, equiparables a la de flagelos con estructura “9+2” (Gibbons & Gibbons, 1973).

Como se ha adelantado, la motilidad de los espermatozoides viene dada por acción de los brazos de dineína, que producen fuerza a través de la hidrólisis de ATP, logrando el deslizamiento activo de un par de microtúbulos respecto al adyacente. Esto produce un movimiento ondulatorio que se transmite rápidamente a lo largo del flagelo (Inaba, 2011).

1.4. Plasma seminal de los peces

El semen está compuesto por espermatozoides suspendidos en un medio fluido, denominado plasma seminal. La composición bioquímica del plasma seminal es muy compleja y variable entre las diferentes especies de peces (Billard, 1983), pero no deja de ser en todas ellas un medio nutritivo y protector para las células espermáticas suspendidas en él, además de jugar un papel clave en su metabolismo, función y supervivencia (Juyena & Stelletta, 2012).

El plasma seminal de los teleósteos es producido por los testículos (Clemens *et al.*, 1964) y el conducto espermático (Billard *et al.*, 1971), cuyo epitelio es secretor. En ambos compartimentos, los espermatozoides permanecen inmóviles por las condiciones del plasma seminal. Existen amplias variaciones en la fisiología y composición del plasma seminal entre las especies de la infraclase Teleostei, habiéndose determinado las concentraciones de varios compuestos orgánicos, tales como azúcares, lípidos, aminoácidos libres, ácido cítrico, glicerol o vitaminas, así como de compuestos minerales (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+), en varias de ellas (Billard & Menezo, 1984; Piironen, 1985; Morisawa, 1985). Una peculiaridad del plasma seminal de los teleósteos es su elevada concentración proteica, superior a la de cualquier otro compuesto orgánico (Loir *et al.*, 1990). Esto ha fomentado la realización de varios estudios proteómicos de este fluido en las últimas décadas (Mochida *et al.*, 1999; Lahnsteiner, 2007; Ciereszko *et al.*, 2012), revelándose la importancia de ciertas proteínas (transferrinas, lipoproteínas, etc.) en la protección, motilidad y calidad espermática.

En el caso concreto de la anguila europea, las características fisicoquímicas y la composición iónica del plasma seminal fueron estudiadas por Asturiano *et al.* (2004). Sus resultados, además de evidenciar la importancia de este fluido en el almacenamiento y calidad espermática, permitieron determinar las mejores condiciones para diseñar un medio isoiónico diluyente (P1) para el manejo y la criopreservación del espermatozoides de anguila europea (Peñaranda *et al.*, 2009). Por otra parte, Peñaranda *et al.* (2010a) y Vélchez *et al.* (2016a) identificaron los principales cambios en el perfil proteico del plasma seminal de la anguila europea durante la espermiación inducida.

1.5. Motilidad espermática en peces

Tras un largo período de espermatogénesis que, según la especie, puede prolongarse durante varias semanas o meses, los espermatozoides de los organismos marinos con fertilización externa se liberan al agua durante la puesta, desde donde tendrán que alcanzar el micropilo ovárico en un corto período de tiempo (varios segundos a minutos) para la entrega de la información genética (Cosson *et al.*, 2008). Esto requiere que su motilidad se active por completo inmediatamente después del contacto con el agua, para acto seguido impulsarse a una alta velocidad.

La transición entre el estado quiescente que los espermatozoides mantienen en el tracto genital masculino y el estado activado que requiere la fertilización, viene dada por diferentes estímulos, como pueden ser cambios en la presión osmótica, composición iónica y gaseosa del medio externo o sustancias derivadas del óvulo (Dzyuba & Cosson, 2014). No existe pues, un desencadenante común para todas las especies acuáticas, siendo los más relevantes la hiperosmolalidad del agua en peces marinos, la hipoosmolalidad de esta en peces de agua dulce y una disminución en la concentración del potasio circundante en salmónidos (Figura 4; Morisawa & Suzuki, 1980; Morisawa *et al.*, 1983; Billard & Cosson, 1992; Billard *et al.*, 1993; Linhart *et al.*, 1999).

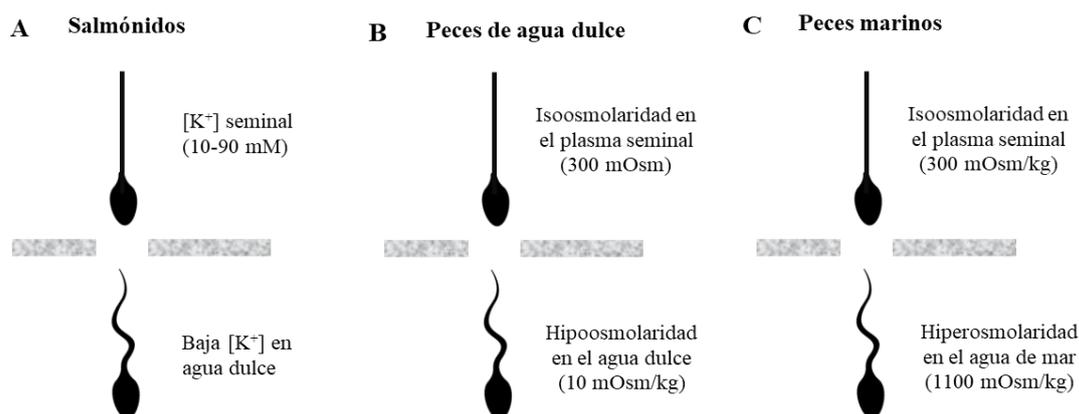


Figura 4. Ilustración esquemática que muestra como los espermatozoides de salmónidos (A), peces de agua dulce (B) y peces marinos (C) inician su motilidad durante el desove natural (adaptado de Morisawa, 2008).

A los diferentes estímulos ambientales les siguen cambios fisiológicos a nivel de membrana plasmática y una transducción intracelular de señales, de la mano de segundos mensajeros, como el Ca²⁺ o el AMPc (Morisawa, 1994, 2008; Cosson *et al.*, 2008; Dzyuba & Cosson, 2014), que culmina en la activación de las dineínas del axonema tras una serie de fosforilaciones y desfosforilaciones (Inaba *et al.*, 1999; Inaba, 2003; Nomura *et al.*, 2000).

1.5.1. Factores que afectan a la motilidad espermática

Si bien se ha visto que existen diferentes mecanismos por los que el espermatozoide de las diferentes especies de peces inicia su motilidad, los factores implicados en este proceso son comunes en la mayoría de ellas. Dichos factores son, principalmente, la osmolalidad, el pH, el flujo de iones y, en algunas especies, los atrayentes químicos liberados por el huevo (Alavi & Cosson, 2006).

1.5.1.1. Osmolalidad

En contraste con lo que ocurre en reptiles o mamíferos, los espermatozoides de la mayoría de los peces, incluidos los teleósteos, son inmóviles en el tracto genital masculino (Stoss, 1983). Esta condición quiescente viene dada, salvo excepciones, por la osmolalidad y la composición del plasma seminal (Billard, 1986). La osmolalidad del plasma seminal difiere significativamente entre los peces de agua dulce y salada, oscilando entre 230 y 346 mOsm/kg y entre 249 y 400 mOsm/kg, respectivamente (Morisawa & Suzuki, 1980; Alavi & Cosson, 2006), pero tanto el agua dulce (20-40 mOsm/kg) como el agua de mar (600-1800 mOsm/kg) representan, respectivamente, un ambiente hipotónico o

hipertónico capaz de desencadenar la activación de los espermatozoides (Billard *et al.*, 1993; Morisawa, 1994).

Así pues, el modelo actual para explicar el proceso de activación de la motilidad espermática, indica que la primera señal recibida por la membrana es de carácter osmótico. A esta le sigue un flujo de agua en dirección opuesta al gradiente osmótico, que conlleva cambios de volumen y distorsiones en la membrana plasmática de los espermatozoides (Cosson *et al.*, 2008). A su vez, las alteraciones en la bicapa lipídica constituyen una segunda señal mecánica que es percibida por canales iónicos mecanosensibles, que aumentan la permeabilidad de la membrana a iones como el Ca^{2+} y el K^+ (Krasznai *et al.*, 2003; Yang & Sachs, 1993). Los canales mecanosensibles pueden, además, asociarse con otras proteínas de membrana y modular su actividad (Vandorpe *et al.*, 1994); estas proteínas asociadas pueden ser, por ejemplo, canales de agua (acuaporinas) involucrados en el transporte de agua a través de la membrana, aumentando hasta 1000 veces la velocidad de difusión de la misma (Abascal *et al.*, 2007).

1.5.1.2. pH

Tanto el pH extracelular como el pH intracelular constituyen importantes factores en el inicio de la motilidad espermática en especies marinas. Ya en el espermiducto, una alcalinización del plasma seminal hasta valores de pH de alrededor de 8.0, es requerida para la completa maduración de los espermatozoides en salmónidos (Morisawa & Morisawa, 1988) y en anguila japonesa (Ohta *et al.*, 1997).

Asimismo, el pH del plasma seminal sigue ejerciendo un papel clave en la viabilidad y conservación de la motilidad de los espermatozoides *in vitro*. Se ha podido comprobar en diversas especies de teleósteos, como el pez globo (*Takifugu niphobles*; Oda & Morisawa, 1993), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*; Boitano & Omoto, 1991), la carpa común (*Cyprinus carpio*; Lahnsteiner *et al.*, 1996) y la anguila japonesa (*Anguilla japonica*, Miura *et al.*, 1995), que la incubación del esperma en medios diluyentes ácidos (pH 6.5-7.4) origina una reducción de la motilidad que no es observada en medios básicos (pH 7.8-8.5). Además, tal y como describieron Gatti *et al.* (1990) en estudios realizados en salmónidos, el pH extracelular tiene una influencia directa sobre el pH intracelular de los espermatozoides en estado quiescente, existiendo entre ambos un gradiente importante para el mantenimiento de la funcionalidad del esperma. A su vez, se ha descrito que el pH ejerce un efecto directo sobre la actividad de las dineínas del axonema en salmónidos (Woolsey & Ingermann, 2003).

En aquellas especies acuáticas con fecundación externa, el pH del medio activador al cual son liberados los espermatozoides también influye enormemente en el inicio de la motilidad espermática (Alavi & Cosson, 2005). En varias especies de peces, como los esturiones (*Acipenser baeri*; Gallis *et al.*, 1991), el pez globo (Takai & Morisawa, 1995), la anguila japonesa (Tanaka *et al.*, 2004) o la trucha arcoíris (Kutluyer, 2018), se ha probado que aguas alcalinas (pH 7.4-9.0) favorecen la activación de la motilidad del esperma, mientras que aguas ácidas (pH 6.0-7.2) la reducen o inhiben.

Durante el proceso de activación espermática, el pH intracelular también sufre cambios, cuya relación con la motilidad de los espermatozoides difiere entre las distintas especies de peces. En invertebrados, mamíferos, ciprínidos y pez globo, se ha observado un incremento del pH con el inicio de la motilidad

del espermatozoide (Wong *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1983; Boitano & Omoto, 1991; Krasznai *et al.*, 1995), mientras que en salmónidos y anguila europea se ha observado un descenso del mismo (Boitano & Omoto, 1991; Gallego *et al.*, 2014). Todos los estudios, excepto los realizados por Oda & Morisawa (1993) coinciden, no obstante, en que los cambios en el pH intracelular no son capaces de inducir la motilidad espermática por sí solos, como sí lo son los cambios en la osmolalidad del medio.

1.5.1.3. Flujo de iones

El uso de inhibidores específicos de canales iónicos, así como de técnicas fluorométricas y electrofisiológicas de cuantificación intracelular de iones, ha permitido demostrar la existencia de flujos de iones durante la activación del espermatozoide de diversas especies de peces. Morisawa & Suzuki (1980) establecieron que altas concentraciones de K^+ en el plasma seminal inhiben la motilidad espermática en salmónidos, siendo necesaria para su activación la salida de K^+ en aguas dulces con baja concentración en este ion. El flujo de salida de potasio, con el consiguiente descenso de su concentración intracelular, también se da en el espermatozoide de la carpa, para que este adquiera motilidad (Krasznai *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios en peces marinos como el pez globo (Takai & Morisawa, 1995) o la anguila europea (Gallego *et al.*, 2014) han descrito un incremento en la concentración intracelular de K^+ durante la activación del espermatozoide.

Otros trabajos han revelado que el papel del Ca^{2+} es crucial en la señalización e inicio de la motilidad espermática en peces. En la carpa, tanto la ausencia de este catión en el medio activador, como el bloqueo de canales específicos del mismo, inhiben el inicio de la motilidad espermática y evidencian que un influjo de calcio es indispensable en este proceso (Krasznai *et al.*, 2000). Un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} durante la activación del espermatozoide también se ha reportado en la anguila europea (Gallego *et al.*, 2014) y el pez globo (Oda & Morisawa, 1993).

En cuanto a la función de otros iones, como el Na^+ , en el inicio de la motilidad de los espermatozoides, existen pocos estudios en peces. Krasznai *et al.* (2003) reportaron que en la carpa se da una disminución en la concentración intracelular de Na^+ durante la activación espermática, mientras que Vélchez *et al.* (2016b) describieron un aumento en la concentración intracelular de dicho ion en la anguila europea.

1.5.1.4. Quimiotaxis

Dan (1950) describió el fenómeno de quimiotaxis espermática por primera vez en el reino animal en el hidrozoo *Spirocodon saltatrix*, entendiéndolo a este como la capacidad de atracción y activación que el óvulo es capaz de ejercer sobre los espermatozoides. Desde entonces, los mecanismos moleculares de la quimiotaxis se han investigado en numerosos filos animales: Chordata, Cnidaria, Mollusca (Cosson *et al.*, 1984; Miller, 1985; Ralt *et al.*, 1991) y Echinodermata (Punnett *et al.*, 1992).

La quimioatracción ha sido estudiada en profundidad en invertebrados marinos como el erizo de mar (Ohtake, 1976) y varios ascidiáceos (Miller, 1975; Kaupp *et al.*, 2006; Shiba *et al.*, 2006), pero entre los vertebrados, el único pez en el que hay estudios sólidos es el arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*). Cuando los espermatozoides de esta especie son liberados al agua de mar, su motilidad apenas es

activada por el choque hiperosmótico (Morisawa *et al.*, 1992), pudiendo llegar a permanecer totalmente inmóviles (Yanagimachi *et al.*, 1992). El posterior depósito de los huevos por parte de las hembras y las sustancias derivadas de los mismos son, en cambio, los verdaderos inductores de la motilidad espermática en esta especie (Yanagimachi, 1957).

Se han identificado dos factores activadores de espermatozoides en los huevos del arenque del Pacífico: el péptido activador del esperma del arenque (HSAP) y el factor de iniciación de la motilidad del esperma (SMIF; Oda *et al.*, 1995). El primero es una proteína soluble en agua liberada por el huevo en el agua circundante (Morisawa *et al.*, 1992) y el segundo, una glicoproteína localizada sobre el corion de los huevos, en las proximidades de los micropilos (Pillai *et al.*, 1993). Ambos metabolitos causan una despolarización en la membrana de los espermatozoides y un aumento de Ca^{2+} intracelular, activando y guiando a estos en el proceso de fecundación (Vines *et al.*, 2002).

1.5.2. Transducción de señales: AMP cíclico

El espacio interno de un espermatozoide es limitado, pero una delgada capa de citoplasma conecta las diferentes áreas de la célula y contiene mediadores que permiten que esta decodifique las señales recibidas y las entregue, en última instancia, al axonema (Dzyuba & Cosson, 2014). Si bien se requieren más estudios para elucidar el mecanismo de transducción de señales en el inicio de la motilidad de los espermatozoides, se ha podido comprobar que, en mamíferos, ascidiáceos, erizo de mar y salmónidos, segundos mensajeros como el AMPc juegan un papel clave en esta señalización (Okamura *et al.*, 1985; Bracho *et al.*, 1998; Kho *et al.*, 2001).

En salmónidos, se ha observado que la hiperpolarización de la membrana y el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular producen la activación de la adenilil ciclasa, involucrada en la síntesis de AMPc (Morisawa & Ishida, 1987). Este nucleótido activa a la proteína quinasa A, que inicia una cascada de fosforilaciones en la que participan tirosina quinasas y cuyo último objetivo son los brazos de dineína de los microtúbulos del axonema (Inaba *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 2003).

Sin embargo, en los peces marinos y en el resto de peces de agua dulce, varios estudios apuntan a una activación del flagelo por fosforilación de proteínas en rutas independientes del AMPc, cuyos mecanismos moleculares no han sido elucidados (Morisawa, 2008). Esto se ha podido comprobar en la lubina rayada (*Morone saxatilis*; He *et al.*, 2004), la tilapia (*Oreochromis mossambicus*; Morita *et al.*, 2006) y la carpa, donde la motilidad de espermatozoides sin membrana se puede reactivar en ausencia de AMPc, y donde el nivel intracelular de este tampoco cambia durante el inicio de la motilidad en espermatozoides con la membrana intacta (Krasznai *et al.*, 2000).

1.5.3. Mecanismo de activación espermática en especies marinas

La activación de la motilidad de los espermatozoides de los peces es un proceso que dura fracciones de segundo, haciendo que los estudios de los procesos bioquímicos que subyacen a la actividad de las estructuras del axonema sean técnicamente difíciles (Cosson, 2010). Hasta el momento, se ha podido comprobar en varios teleósteos, como el pez globo (Oda & Morisawa, 1993), el bacalao (Morisawa &

Suzuky, 1980) o la anguila europea (Peñaranda *et al.*, 2009), que, como se ha adelantado, las células espermáticas son quiescentes en el plasma seminal y adquieren motilidad cuando entran en contacto con un medio hipertónico.

En la **Figura 5** se resume el modelo general de activación espermática en especies marinas, propuesto por Morisawa (2008). Básicamente, el choque hiperosmótico que sufren los espermatozoides al ser liberados al agua de mar, provoca sobre su membrana plasmática un choque osmótico, liberándose agua citoplasmática a través de acuaporinas y activándose canales de Ca^{2+} (que también se libera de reservas intracelulares) y K^+ (Ho & Suarez, 2003; Krasznai *et al.*, 2003; Cosson *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2014). El aumento de la concentración citoplasmática de estos iones provoca la despolarización de la membrana (Cosson, 2010) y la consiguiente activación de una cascada de señalización intracelular.

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos y salmónidos, en los que se ha demostrado el papel de segundos mensajeros como el AMPc y de diversas quinasas en la activación de las dineínas del axonema (Morisawa & Ishida, 1987; Inaba, 2003), en las especies marinas se sabe poco sobre este tema. En la lubina rayada, la actividad del flagelo parece iniciarse mediante la fosforilación de algunas proteínas específicas a través de una vía insensible a la presencia de AMPc, pero dependiente de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y de la presencia de proteínas de unión al calcio en el axonema, como la calmodulina (He *et al.*, 2004). Resultados similares se observaron en la tilapia (Morita *et al.*, 2006).

Con todo, el flagelo de los espermatozoides empieza a batir a alta velocidad, pero disminuye rápidamente hasta detenerse debido, según Cosson *et al.* (2008), a dos razones: la concentración iónica intracelular se vuelve demasiado alta para que las dineínas mantengan una correcta actividad y la concentración de ATP mengua, volviéndose insuficiente para la actividad flagelar. Sin embargo, esta hipótesis no se ha demostrado todavía.

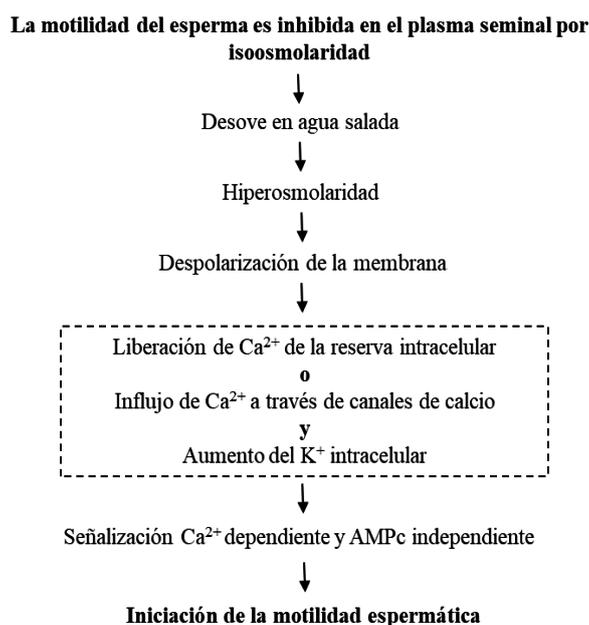


Figura 5. Esquema del mecanismo de la iniciación de la motilidad espermática en especies de agua marina (adaptado de Morisawa, 2008).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Con el presente trabajo se pretende aportar luz a los mecanismos involucrados en la activación de los espermatozoides de la anguila europea, a través del estudio del efecto del pH ambiental en el inicio de la motilidad de los mismos.

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos que se han fijado en este estudio, son:

1. Determinar el efecto del pH del medio diluyente (plasma seminal artificial) sobre los parámetros cinéticos del esperma de la anguila europea.
2. Evaluar el impacto de la modificación del pH del medio diluyente sobre el pH intracelular de los espermatozoides de la anguila europea.
3. Determinar el efecto del pH del medio activador (agua de mar) sobre los parámetros cinéticos que definen a la motilidad del esperma de la anguila europea.
4. Estudiar la variación del pH intracelular post-activación en función del pH del medio diluyente, en condiciones de motilidad (pH 8.2 del agua de mar) y de no motilidad (pH 6.5 del agua de mar).

Con el objetivo de estudiar la viabilidad e interés de realizar posteriores estudios a mayor escala, se han realizado, de manera adicional, dos pruebas piloto en las que se evalúa el efecto del ambiente iónico y del pH del medio diluyente, así como del pH intracelular, sobre la motilidad del esperma de la anguila europea. Sus propósitos concretos, son:

1. Estudiar la interacción entre la concentración de potasio y el pH del medio diluyente en la motilidad de los espermatozoides de la anguila europea.
2. Comprobar si existe un pH intracelular más adecuado para la adquisición de motilidad espermática en anguila europea, fijando el pHi del esperma con el ionóforo nigericin.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Químicos y soluciones

La albúmina sérica bovina o BSA (Bovine Serum Albumine) se adquirió a Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU). El fluorocromo SNARF-5F AM (colorante indicador de pH), los reactivos DMSO, Pluronic® F-127 y nigericin *free acid* se adquirieron en Molecular Probes (Life Technologies, Madrid, España). La solución stock 2 mM de SNARF-5F AM se preparó en Pluronic al 20% en DMSO; el stock 10 mM de nigericin se preparó en etanol 96 %; se usaron como se describe en las secciones 3.6 y 3.8.2. En todos los casos, la concentración final de DMSO en el esperma era inferior al 0.05 %, pudiéndose descartar, por lo tanto, cualquier efecto del mismo sobre la motilidad.

3.2. Mantenimiento de los peces y tratamiento hormonal

Un total de 24 machos de anguila (peso corporal medio 105.7 ± 4.2 g) fueron trasladados a las instalaciones de la Universitat Politècnica de València desde la piscifactoría Valenciana de Acuicultura, S.A. (Puzol, Valencia). Como se puede observar en la **Figura 6**, los peces se distribuyeron en dos acuarios de 90 L (12 anguilas por acuario), que fueron tapados y cubiertos con paneles negros para evitar la huida de las anguilas y la entrada de luz, y equipados con sistemas de recirculación de agua, filtros, termostatos y enfriadores. Durante una semana, los animales fueron aclimatados paulatinamente al agua de mar (elevando la salinidad hasta $37 \pm 0,3$ g/l) y, como en ensayos previos (Peñaranda *et al.*, 2010b; Vílchez *et al.*, 2017), se mantuvieron en dicha agua a 20 °C hasta el final del experimento.



Figura 6. Acuarios donde se mantuvieron a las anguilas durante el experimento.

Con tal de asegurar el bienestar de los animales y la estabilidad de las condiciones experimentales, se midieron los principales parámetros que reflejan la calidad del agua dos veces por semana. Para determinar dichos parámetros, cuyo rango de valores se muestran en la **Tabla 1**, se utilizaron los siguientes aparatos de medida: Handy Polaris (Oxyguard), para medir la temperatura y el oxígeno disuelto; tiras colorimétricas para medir el pH; *kits* colorimétricos (Aquamerck™ MERCK®) para medir los niveles de amonio, nitratos y nitritos, y un refractómetro para medir la salinidad. En caso de detectar valores anómalos en alguno de ellos, se procedía a renovar parcialmente el agua de los acuarios.

Tabla 1. Rangos de los valores registrados para los principales parámetros de calidad del agua.

Parámetros	Rango de valores
Temperatura	19-21 °C
Oxígeno disuelto	5.2-6.2 mg/L
pH	7.7-8.0
Salinidad	37-38 g/L
Amonio	0-1 mg/L
Nitratos	25-150 mg/L
Nitritos	0-0.075 mg/L

Tras cumplirse la semana de aclimatación de las anguilas desde el agua dulce al agua de mar, se inició el tratamiento hormonal con gonadotropina coriónica humana recombinante (rec-hCG; Ovitrelle, Merck Serono, Madrid). Una vez por semana, las anguilas se anestesiaban con benzocaína (60 ppm) y se pesaban individualmente, antes de recibir una dosis de 1.5 UI/g de pez de rec-hCG (diluida en NaCl al 0,9 %) mediante inyección intraperitoneal (Pérez *et al.*, 2000).

Las anguilas se mantuvieron en ayuno durante todo el experimento para simular su etapa migratoria en el mar y se manejaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos (Dir. 2010/63/UE).

3.3. Recolección de esperma y muestreo

Desde la 6ª semana de tratamiento hormonal, las muestras de esperma se recolectaron una vez por semana, hasta el final del experimento (con un total de 14 muestreos en el transcurso del mismo). Con el fin de obtener la máxima calidad de esperma (Pérez *et al.*, 2000), las muestras se extrajeron 24 h después de la administración de la hormona. Estas se recolectaron en tubos Falcon de 15 mL, aplicando una suave presión en el abdomen de las anguilas anestesiadas y con la ayuda de una bomba de vacío, tal y como se muestra en la **Figura 7**.

**Figura 7.** Recolección del esperma de anguila europea.

Previamente a la toma de muestras, el área genital de los animales se limpiaba con agua destilada y se secaba para evitar la contaminación del esperma con heces, orina y agua de mar (medio activador). Una vez obtenido el semen, se mantenía refrigerado a 4 °C hasta el análisis de motilidad, cuyo inicio acaecía dentro de la primera media hora después de la recolección.

3.4. Medios diluyentes y activadores

La **Tabla 2** muestra la composición de los medios diluyentes y de activación. Los primeros se usaron como plasma seminal artificial en este estudio (Peñaranda *et al.*, 2010b). Dichos diluyentes, además de permitir la reducción de la elevada densidad espermática ($3\text{-}6 \times 10^9$ espermatozoides $\cdot \text{mL}^{-1}$; Pérez *et al.*, 2000) y propiciar la activación simultánea de los espermatozoides en medios hiperosmóticos, ayudan a conservar las muestras a corto plazo. El diluyente estándar P1, que es un medio isoiónico e isoosmótico con el plasma seminal de la anguila europea (Asturiano *et al.*, 2004), fue empleado en la mayoría de las pruebas y utilizado como control por ser el más fiel a las condiciones que se dan en la naturaleza. Se preparó usando una concentración de 30 mM KCl, tal como existe en el plasma seminal de la especie (Asturiano *et al.*, 2004). En las pruebas realizadas para evaluar el efecto del potasio y del pH intracelular en la motilidad del esperma (3.8.1. *Interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática* y 3.8.2. *Efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pH_i con nigericin*), se usó un diluyente similar al estándar (P1 100-K), pero con una alta concentración de potasio (100 mM KCl), que equivale a la concentración intracelular de K⁺ del esperma de la anguila europea (L. Pérez, datos no publicados). En ambos medios, la osmolalidad era de 325 mOsm/kg y el pH se ajustó el mismo día de uso a 8.5, ya que este es el pH registrado en el plasma seminal de la anguila europea (Asturiano *et al.*, 2004). Para fijar estos valores, se contó con la ayuda de un osmómetro OSMOMAT 050 y un pHmetro CRISON.

Tabla 2. Composición (mM), osmolalidad (mOsm/kg) y pH de los medios empleados. Medios diluyentes: P1 estándar y 100-K (enriquecido en potasio). Medio activador: ASW.

	NaCl	MgCl ₂	CaCl ₂	KCl	NaHCO ₃	Na ₂ SO ₄	Osm	pH
Diluyentes:								
P1 (estándar)	125	2.5	1	30	20		325	8.5
P1 100-K	125	2.5	1	100	20		325	8.5
Activador:								
ASW	354.7	25.4	9.9	9.4	20	28.2	1100	8.2

El activador hiperosmótico fue, en todos los ensayos realizados, agua de mar artificial (ASW; Aqua Medic Meersalz, 37 g/l). En este medio, el pH se ajustó a 8.2, la osmolalidad era de 1100 mOsm/kg y se añadió BSA al 2% (p/v). Estudios previos de Peñaranda *et al.* (2010b) demostraron que añadiendo BSA al agua de mar se conseguía incrementar el porcentaje de células vivas y mejorar la motilidad espermática. Además, al añadir BSA se evitaba la adherencia del esperma a las superficies de la cámara de recuento, haciendo más fácil y precisa la evaluación de su motilidad con los sistemas CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; Peñaranda *et al.*, 2010b).

3.5. Evaluación de la motilidad del esperma

Dada la elevada densidad de las muestras frescas, el primer paso que seguía a su obtención era la dilución de estas en plasma seminal artificial. La activación de la motilidad espermática se llevó a cabo mezclando 1 μl de esperma diluido en P1 (dilución 1/25) con 4 μl de agua de mar artificial (ASW), según el método establecido por Gallego *et al.* (2013).

La mezcla del esperma con el medio activador se preparaba en una cámara SpermTrack-10® (Proiser R+D, SL; Paterna, España) y se observaba seguidamente en un microscopio Nikon Eclipse 80i, con un objetivo de contraste de fase 10x (Nikon 10 \times 0.25, Ph1 BM WD 7.0). Inmediatamente después de la activación de las muestras, la motilidad se registraba con la ayuda de una cámara de vídeo HAS-220 y el software ISAS (Proiser R+D, S.L., Paterna, España). El número de fotogramas por segundo (FPS) tomados fue de 60. En todas las pruebas de motilidad, se hicieron tres réplicas biológicas (activaciones de la motilidad) y se grabaron dos campos por activación. Durante la evaluación de la motilidad espermática, tanto las muestras de esperma como el agua de mar se mantuvieron refrigeradas en un baño de agua con hielo. Para los estudios posteriores se seleccionaron las mejores muestras (motilidad total superior al 40 %).

Los parámetros de la motilidad espermática contemplados para este trabajo fueron: motilidad total (MOT, %), definida como el porcentaje de espermatozoides móviles; motilidad progresiva (MP, %), definida como el porcentaje de los espermatozoides que nadan hacia adelante en línea recta; porcentaje de espermatozoides rápidos (FA, %), medios (ME, %) y lentos (SL, %); porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y rápida (MP FA, %); velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), definida como la velocidad promedio de una cabeza espermática en su trayectoria curvilínea; velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), definida como la velocidad promedio de una cabeza espermática a lo largo de la línea recta entre su primera posición detectada y su posición final; velocidad promedio de la cabeza espermática a lo largo de su trayectoria espacial promedio VAP ($\mu\text{m/s}$); índices de rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %) y oscilación (WOB, %), definidos como las relaciones porcentuales de los cocientes VSL/VAP, VSL/VCL y VAP/CVL, respectivamente; amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, μm) y la frecuencia de batido cruzado (BCF, Hz), definida como la frecuencia a la cual la trayectoria curvilínea del esperma cruza su trayectoria promedio. Si la VCL de los espermatozoides era inferior a 10 $\mu\text{m/s}$, estos se consideraron inmóviles (Martínez-Pastor *et al.*, 2008).

3.6. Mediciones relativas de pH intracelular

El pH intracelular relativo de los espermatozoides se determinó mediante citometría de flujo, haciendo uso del modelo Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Brea, CA), equipado con un láser de estado sólido (emite a 653 nm, rojo) y un láser de ion argón (emite a 488 nm, azul). Como indicador fluorescente de pH, se utilizó SNARF-5F AM, cuyo stock 2 mM en DMSO-pluronic 20% se mantuvo a -20 °C hasta ser usado. La solución de trabajo se preparó por dilución 1/8 del stock en agua bidestilada hasta una concentración 250 μM . Cada muestra de 50 μl de esperma diluido (1/25 en P1, v/v) se incubó con 1 μl de SNARF-5F AM 250 μM (concentración final 5 μM) a 4 °C durante 60 min, en la oscuridad.

Después de la incubación con SNARF-5F AM, se añadieron 4 μl de cada muestra de semen diluido a un tubo que contenía 400 μl de medio P1 para medir el pH en la fase quiescente, antes de la activación del esperma. Más tarde, se añadieron 400 μl de medio de activación hiperosmótico al mismo tubo de citometría, y la fluorescencia emitida por el indicador SNARF-5F AM en los espermatozoides se registró unos 30 segundos después de la activación de la motilidad. Este es el tiempo que transcurre entre el mezclado del esperma con el medio activador y la obtención de la medida de fluorescencia final. La dilución final del esperma de anguila para las mediciones en el citómetro de flujo fue 1/2500 (v/v), con alrededor de 400 células/ μl .

El pH intracelular relativo se determinó usando un método de ratios (Balkay *et al.*, 1992). Para tal fin, se excitó al fluorocromo SNARF-5F AM con el láser azul a una única longitud de onda (480 nm) y se registró la emisión de fluorescencia a dos longitudes de onda con los filtros FL2 (filtro 575/25BP) y FL4 (filtro 680/30BP). Los desplazamientos espectrales dependientes del pH exhibidos por el fluorocromo SNARF-5F AM permiten la calibración y determinación de la respuesta de pH en términos del ratio de las intensidades de fluorescencia medidas a dos longitudes de onda diferentes (572 y a 680 nm, con los filtros FL2 y FL4, respectivamente).

Los datos de fluorescencia del SNARF-5F AM se mostraron en modo logarítmico. Para cada muestra se recolectaron cinco mil eventos, con un flujo de 500 células/s. Los datos de citometría de flujo se procesaron usando el software CXP (Bekman Coulter). Para el cálculo del pH intracelular absoluto, se empleó el mismo método que Vélchez *et al.* (2017), repitiendo la calibración del pH vs. fluorescencia del SNARF-5F AM en la misma fecha o fechas cercanas a las mediciones.

3.7. Pruebas realizadas

3.7.1. Efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática

Se estudió el efecto del pH del medio diluyente P1 sobre la motilidad de 14 muestras de esperma. Para tal fin, se realizó, en primer lugar, una evaluación de la motilidad espermática, tal y como se describe en la sección 3.4, haciéndose una selección de las mejores muestras. A continuación, a partir de las muestras frescas seleccionadas, se hicieron diluciones 1/25 (v/v) empleándose como medio diluyente P1 a diferentes pH: pH 6.5, pH 7.0, pH 7.4, pH 7.8, pH 8.0 y a pH 8.5. Finalmente, se midió la motilidad de todas las muestras mediante el sistema CASA, por triplicado y activando las muestras con ASW. Con el fin de evaluar también el efecto que tiene sobre la motilidad espermática el tiempo de incubación de las muestras a cada pH, las medidas de motilidad se realizaron tanto a 0 como a 24 horas. El pH de los diferentes medios diluyentes se ajustó empleando soluciones de NaOH (0.1 M) y HCl (0.1 M).

3.7.2. Efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular

Seis muestras de esperma de buena calidad (motilidad inicial > 40 %) se diluyeron 1/25 (v/v) en P1 ajustado a diferentes pH: pH 6.5, pH 6.8, pH 7.0, pH 7.2, pH 7.4, pH 7.6, pH 7.8, pH 8.0, pH 8.2 y pH 8.5. El pH_i se determinó como se ha descrito en el apartado 3.6. Los cálculos del pH intracelular absoluto se realizaron empleando la calibración del pH realizada el mismo día o el día más cercano a las medidas.

3.7.3. Efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática

Se investigaron las consecuencias de la modificación del pH del medio activador (ASW) sobre la motilidad espermática de 10 muestras individuales de semen. Para ello, el esperma fresco de los animales fue diluido en P1 (1/25, v/v) y sometido a una evaluación inicial de la motilidad. Seguidamente, se procedió a medir la motilidad de las muestras que mostraron una mejor motilidad, empleando como medio activador agua de mar a diferentes pH: ASW a pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 7.8 y pH 8.2. Cada muestra fue analizada por triplicado mediante el sistema CASA.

3.7.4. Efecto del pH del medio diluyente en la variación del pH intracelular post-activación

A partir de algunas de las muestras mencionadas en el apartado 3.7.2, se estudió la variación del pH_i que pudo tener lugar tras la activación con agua de mar estándar (pH 8.2) o con agua de mar a bajo pH (6.5), estando las muestras previamente diluidas en P1 ajustado a diferentes pH: pH 6.5, pH 6.8, pH 7.0, pH 7.2, pH 7.4, pH 7.6, pH 7.8, pH 8.0, pH 8.2. Para ello, tras la determinación de la fluorescencia en las muestras quiescentes diluidas en P1, se añadió agua de mar al mismo tubo de citometría usado en la primera medida (dilución 1/2; 400 µl ASW + 400 µl de semen diluido 1/25 en P1 al pH correspondiente), y se registró de nuevo la fluorescencia del SNARF-5F AM. El agua de mar usada en citometría no contenía en ningún caso BSA añadido, a diferencia del usado en la medición de motilidad. Los cálculos de pH_i absoluto se realizaron como en el apartado 3.7.2. La activación con ASW a pH 8.2 se estudió en 5 muestras en 4 sesiones, y la activación con ASW a pH 6.5 en 4 muestras en 3 sesiones.

3.8 Pruebas piloto complementarias

3.8.1. Interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática

Se estudió el efecto de la interacción del pH con la concentración de potasio de dos medios diluyentes, uno con alto contenido en K⁺ (P1 100-K, 100 mM KCl) y otro con bajo contenido (P1, 30 mM KCl), sobre la motilidad de 3 muestras de esperma. Para tal fin, en primer lugar, se llevó a cabo una primera evaluación de la motilidad espermática, tal y como se describe en la sección 3.4, haciéndose una selección de las mejores muestras. En esta ocasión, a partir del esperma fresco, se hicieron diluciones 1/25 (v/v) empleándose dos medios diluyentes, con un total de 20 condiciones experimentales (**Tabla 3**): por una parte, P1 a 10 pHs diferentes: pH 6.5, pH 6.8, pH 7.0, pH 7.2, pH 7.4, pH 7.6, pH 7.8, pH 8.0, pH 8.2 y a pH 8.5; y por otra, P1 100-K a los mismos 10 pHs.

Tabla 3. Combinación de medios empleados para las medidas de motilidad.

	Diluyente				Activador
P1	pH 6.5	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2	ASW pH 8.2
	pH 7.4	pH 7.6	pH 7.8	pH 8.0	
		pH 8.2	pH 8.5		
P1 100-K	pH 6.5	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2	
	pH 7.4	pH 7.6	pH 7.8	pH 8.0	
		pH 8.2	pH 8.5		

Todos los medios se ensayaron sobre las mismas muestras individuales. Se midió la motilidad de todas las muestras seleccionadas mediante el sistema CASA, por triplicado y activando las muestras con ASW a pH 8.2 (al 2 % en BSA). El pH de los diferentes medios diluyentes se ajustó empleando soluciones de NaOH (0.1 M) y HCl (0.1 M).

3.8.2. Efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pHi con nigericin

Para determinar si existe un pHi más adecuado para la motilidad del esperma de la anguila, se utilizó un ionóforo que permeabiliza la membrana del espermatozoide frente al ion H^+ . El nigericin iguala la concentración de H^+ en el interior y el exterior de la célula, siempre que exista la misma concentración de K^+ dentro y fuera de la célula, ya que es un intercambiador de iones K^+/H^+ (Thomas *et al.*, 1979). La $[K^+]_i$ es de 80-120 mM en el esperma de anguila (L. Pérez, datos no publicados). Por ello, empleando un medio diluyente 100 mM en KCl y añadiendo nigericin al mismo, se iguala la $[H^+]_i = [H^+]_e$.

Para realizar esta prueba se diluyeron las muestras de esperma fresco en P1 estándar (1/25, v/v), haciendo una primera evaluación de la motilidad y diluyendo otras alícuotas de las tres mejores muestras en el medio P1 100-K a 10 pH diferentes (mismos que en prueba 3.8.1). A continuación, se prepararon los tubos de incubación con nigericin, que previamente había sido diluido en agua destilada (1/25, v/v). Dichos tubos se prepararon incubando 100 μ L de las muestras diluidas con 1 μ L de nigericin (concentración final 4 μ M). La incubación se realizó a 4°C durante 60 minutos. Tras este tiempo, se midió por triplicado la motilidad de cada muestra mediante el sistema CASA.

3.9. Análisis estadístico

El software CXP (Bekman Coulter) se usó para analizar los datos obtenidos por citometría de flujo, con el que se obtuvo la intensidad de fluorescencia media (MFI, unidades arbitrarias) de cada muestra a dos longitudes de onda (572 y a 680 nm, con los filtros FL2 y FL4, respectivamente). La media y el error estándar se calcularon para todos los parámetros cinéticos de la motilidad espermática. Los test de Shapiro-Wilk y Kolgomorov-Smirnov, así como los coeficientes de asimetría y de curtosis se emplearon para comprobar la normalidad de la distribución de los datos. El test de Mauchly y la corrección de Greenhouse-Geisser se usaron para asegurar la esfericidad de los datos. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas (MR) simples y multifactoriales para estudiar las diferencias entre los factores experimentales y sus interacciones en datos con distribución normal. Para poblaciones con distribuciones no normales se aplicó el test de Friedman. Se detectaron diferencias significativas usando la prueba de rangos múltiple de Student-Newman-Keuls ($P < 0.05$). Todos los procedimientos estadísticos se ejecutaron usando los softwares para Windows Statgraphics Centurion XVII.II (Statpoint Technologies Inc., The Plains, Virginia) y SPSS Statistics versión 24.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática

Se llevó a cabo un ensayo para determinar los efectos del pH del medio diluyente (P1) sobre los distintos parámetros cinéticos del espermatozoide, a 0 y a 24 horas. Los análisis unifactoriales efectuados para cada tiempo mostraron, en ambos casos, un efecto significativo del pH sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) y con velocidad media (ME). Para los índices de rectitud y de oscilación, así como para la amplitud del movimiento lateral de la cabeza (STR, WOB y ALH, respectivamente), no hubo diferencias entre los distintos pH a ningún tiempo. Para el resto de parámetros solo se encontraron diferencias significativas a 24 horas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efecto del pH del medio diluyente sobre los diferentes parámetros de motilidad espermática, a 0 y 24 horas. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 14). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH (P < 0.05) para un mismo tiempo.

	Tiempo (h)	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.4	pH 7.8	pH 8.0	pH 8.5	P-valor
MOT %	0	36.35 \pm 4.61 a	36.27 \pm 4.62 a	38.64 \pm 5.59 ab	38.18 \pm 5.44 ab	43.84 \pm 4.98 b	43.87 \pm 5.11 b	0.0081
	24	21.90 \pm 3.98 a	30.40 \pm 4.56 b	31.33 \pm 4.64 b	31.14 \pm 4.49 b	37.38 \pm 4.66 c	34.54 \pm 4.38 bc	0.0000
MP %	0	21.16 \pm 3.28	22.22 \pm 3.75	23.03 \pm 4.02	23.88 \pm 4.43	23.62 \pm 3.97	25.12 \pm 3.70	0.5000
	24	14.02 \pm 3.02 a	19.45 \pm 3.34 b	19.06 \pm 3.42 b	20.39 \pm 3.47 bc	24.32 \pm 3.79 c	20.70 \pm 3.03 bc	0.0003
FA %	0	26.23 \pm 4.10	26.54 \pm 4.21	28.88 \pm 5.02	29.08 \pm 4.99	31.0 \pm 4.45	32.72 \pm 4.43	0.0897
	24	15.89 \pm 3.37 a	22.45 \pm 3.83 b	22.62 \pm 4.09 b	23.43 \pm 4.01 b	28.76 \pm 4.32 c	25.44 \pm 3.67 bc	0.0002
ME %	0	5.91 \pm 0.93 a	5.64 \pm 0.89 a	6.24 \pm 1.06 ab	5.52 \pm 1.04 a	7.97 \pm 1.27 b	7.50 \pm 1.14 ab	0.0117
	24	3.82 \pm 0.62 a	5.32 \pm 0.82 ab	5.67 \pm 0.89 b	4.99 \pm 0.71 ab	5.33 \pm 0.73 ab	5.79 \pm 0.87 b	0.0314
SL %	0	4.21 \pm 0.44	4.09 \pm 0.56	3.52 \pm 0.39	3.59 \pm 0.48	4.80 \pm 0.65	3.64 \pm 0.35	0.0655
	24	2.18 \pm 0.35 a	2.63 \pm 0.31 ab	3.04 \pm 0.42 ab	2.73 \pm 0.33 ab	3.29 \pm 0.41 b	3.31 \pm 0.36 b	0.0244
MP FA %	0	26.23 \pm 4.10	26.54 \pm 4.21	28.88 \pm 5.02	29.08 \pm 4.99	31.08 \pm 4.45	32.72 \pm 4.43	0.0897
	24	15.89 \pm 3.37 a	22.45 \pm 3.83 b	22.62 \pm 4.09 b	23.43 \pm 4.01 b	28.76 \pm 4.32 c	25.44 \pm 3.67 bc	0.0002
VCL $\mu\text{m/s}$	0	130.75 \pm 5.73	132.90 \pm 5.46	132.45 \pm 5.84	131.69 \pm 7.53	131.94 \pm 6.18	137.07 \pm 4.50	0.7834
	24	112.05 \pm 9.61 a	124.46 \pm 7.50 b	126.59 \pm 5.80 b	131.42 \pm 6.29 b	133.67 \pm 6.37 b	130.87 \pm 5.18 b	0.0108
VSL $\mu\text{m/s}$	0	75.31 \pm 4.16	78.07 \pm 4.78	76.65 \pm 4.94	77.03 \pm 6.44	75.52 \pm 5.69	79.82 \pm 4.63	0.8307
	24	64.21 \pm 6.72 a	73.57 \pm 5.83 b	74.51 \pm 5.01 b	77.96 \pm 5.43 b	80.06 \pm 5.82 b	77.04 \pm 4.90 b	0.0002
VAP $\mu\text{m/s}$	0	91.95 \pm 4.59	94.05 \pm 4.79	93.54 \pm 5.22	93.81 \pm 6.37	93.25 \pm 5.72	97.96 \pm 4.54	0.6507
	24	78.33 \pm 7.14 a	88.62 \pm 6.32 b	90.03 \pm 5.15 b	93.75 \pm 5.65 b	96.06 \pm 6.05 b	93.47 \pm 5.95 b	0.0021
LIN %	0	57.31 \pm 1.01	58.18 \pm 1.40	57.34 \pm 1.44	57.51 \pm 1.67	56.45 \pm 1.80	57.80 \pm 1.69	0.7550
	24	54.13 \pm 2.62 a	57.96 \pm 1.61 b	57.99 \pm 1.47 b	58.37 \pm 1.44 b	58.86 \pm 1.68 b	58.11 \pm 1.59 b	0.0338
STR %	0	81.62 \pm 0.75	82.45 \pm 1.03	81.49 \pm 0.86	80.96 \pm 1.43	80.19 \pm 1.24	81.03 \pm 1.29	0.4391
	24	77.01 \pm 3.96	82.06 \pm 1.31	81.96 \pm 1.31	82.38 \pm 1.07	82.52 \pm 1.34	81.77 \pm 1.26	0.2260
WOB %	0	70.16 \pm 0.79	70.45 \pm 0.87	70.24 \pm 1.07	70.93 \pm 1.16	70.18 \pm 1.25	71.15 \pm 1.13	0.6086
	24	71.35 \pm 2.53	70.45 \pm 1.03	70.63 \pm 0.91	70.72 \pm 0.99	71.17 \pm 1.17	70.92 \pm 1.06	0.7947
ALH μm	0	2.45 \pm 0.07	2.49 \pm 0.06	2.41 \pm 0.09	2.40 \pm 0.10	2.48 \pm 0.06	2.46 \pm 0.06	0.4918
	24	2.28 \pm 0.23	2.45 \pm 0.08	2.46 \pm 0.05	2.48 \pm 0.05	2.40 \pm 0.07	2.43 \pm 0.05	0.4628
BFC Hz	0	31.48 \pm 0.73	31.33 \pm 0.64	31.12 \pm 0.67	30.39 \pm 1.23	31.52 \pm 0.63	31.33 \pm 0.54	0.5961
	24	25.70 \pm 2.58 a	29.48 \pm 1.20 b	30.16 \pm 0.95 b	31.01 \pm 0.73 b	31.23 \pm 0.84 b	31.55 \pm 0.68 b	0.0000

Por su parte, los análisis multifactoriales indicaron un efecto significativo del factor “Tiempo” ($P < 0.05$) en la mayor parte de las variables cinéticas (excepto WOB y ALH), pero no revelaron significancia estadística para la interacción entre el pH y el tiempo (excepto en ME, SL y VSL). Esto pone de manifiesto que, si bien la calidad de la motilidad espermática disminuye tras 24 h a 4 °C, esta disminución es, en general, independiente del pH en el que estaban diluidas las muestras.

En la **Figura 8** se representa el porcentaje de espermatozoides móviles (el resto de los parámetros se muestran en el **Anexo I**) en función del pH y del tiempo de incubación. Como se puede observar, tanto a 0 como a 24 horas, la motilidad aumenta ligeramente a medida que se alcaliniza el medio diluyente, alcanzando sus valores máximos a pHs 8.0-8.5.

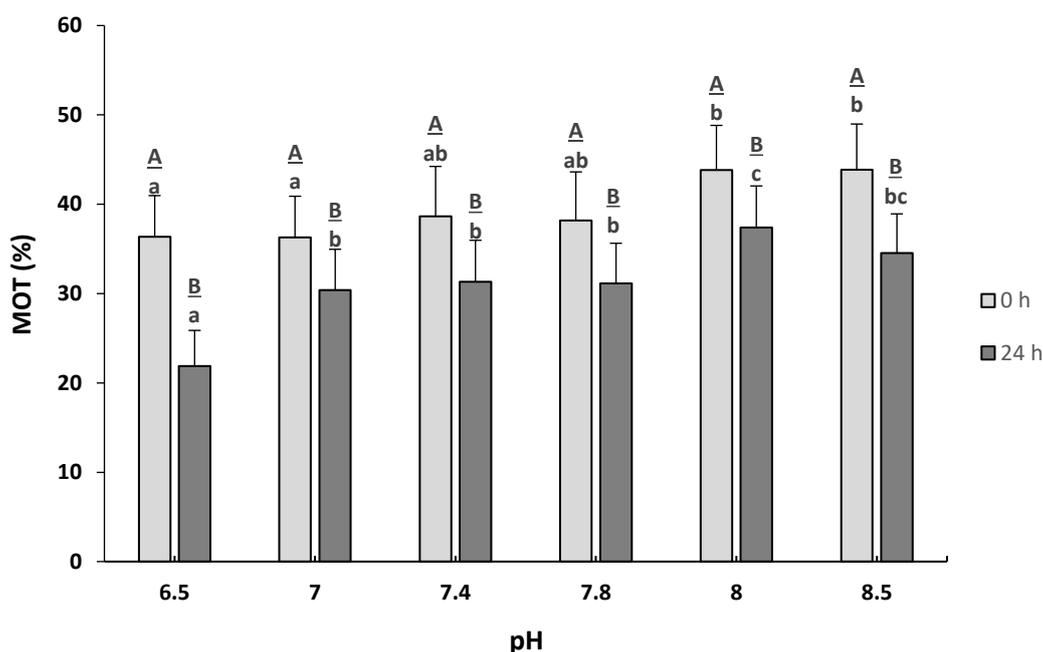


Figura 8. Efecto del pH del medio P1 y del tiempo sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 14$). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$) para un tiempo concreto. Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre los dos tiempos estudiados a un nivel de pH concreto.

4.2. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular

Las regresiones entre el pH intracelular y el pH del medio diluyente realizadas para las diferentes muestras individuales mostraron que el pH_i variaba de forma lineal positiva con el pH_e en todos los casos (valores R^2 comprendidos entre 0.94 y 0.99; resultados no mostrados).

Cuando se realizó la regresión usando los datos de todas las muestras (**Figura 9**), se obtuvo una ecuación de regresión entre el pH intracelular y el pH extracelular con fórmula: $pH_i = pH_e - 0.68$. Es decir, que el pH intracelular se mantiene 0.7 unidades por debajo del pH del medio diluyente, al menos en el rango de pHs externos de 6.5-8.5.

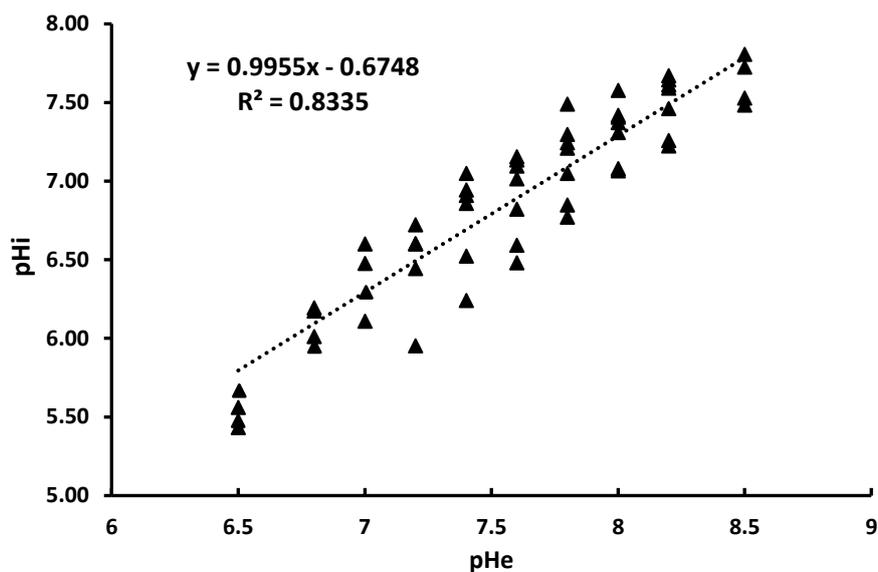


Figura 9. Regresión entre el pH_i y el pH_e del diluyente (n = 6).

4.3. Estudio del efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática

Se evaluó el efecto del pH del medio activador (ASW) sobre los diferentes parámetros cinéticos de la motilidad espermática (Tabla 5). Hubo un efecto significativo del pH del ASW en todos ellos, excepto en el porcentaje de espermatozoides lentos (SL).

Tabla 5. Efecto del pH del medio activador sobre los diferentes parámetros de motilidad espermática. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 10). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH (P < 0.05).

	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5	pH 7.8	pH 8.2	P-valor
MOT %	5.77 \pm 1.87 a	19.04 \pm 3.61 b	43.15 \pm 3.92 c	56.17 \pm 3.26 d	59.99 \pm 2.78 d	0.0000
MP %	1.81 \pm 1.11 a	9.79 \pm 2.84 b	30.63 \pm 3.51 c	43.76 \pm 2.91 d	41.90 \pm 2.60 d	0.0000
FA %	3.34 \pm 1.01 a	14.75 \pm 2.96 b	36.74 \pm 3.48 c	49.15 \pm 3.22 d	50.36 \pm 2.63 d	0.0000
ME %	0.79 \pm 0.34 a	2.60 \pm 0.51 b	4.38 \pm 0.75 c	4.98 \pm 0.54 c	6.48 \pm 0.71 d	0.0000
SL %	1.64 \pm 1.17	1.68 \pm 0.61	2.03 \pm 0.42	2.03 \pm 0.24	3.16 \pm 0.32	0.4006
MP FA %	3.34 \pm 1.01 a	14.75 \pm 2.96 b	36.74 \pm 3.48 c	49.15 \pm 3.22 d	50.36 \pm 2.63 d	0.0000
VCL μ m/s	106.22 \pm 11.65 a	133.49 \pm 5.65 b	154.75 \pm 3.71 c	160.34 \pm 2.93 c	150.93 \pm 3.96 c	0.0012
VSL μ m/s	23.53 \pm 7.42 a	52.84 \pm 10.78 b	91.88 \pm 5.55 c	101.87 \pm 3.06 c	91.44 \pm 3.85 c	0.0000
VAP μ m/s	53.14 \pm 6.64 a	74.04 \pm 9.15 b	108.11 \pm 4.94 c	118.55 \pm 2.99 c	109.55 \pm 4.01 c	0.0000
LIN %	22.78 \pm 6.68 a	37.89 \pm 6.76 b	59.08 \pm 2.68 c	63.49 \pm 1.28 c	60.37 \pm 1.16 c	0.0000
STR %	38.78 \pm 8.31 a	64.4 \pm 7.28 b	84.47 \pm 1.74 c	85.87 \pm 0.93 c	83.35 \pm 0.93 c	0.0000
WOB %	51.09 \pm 4.51 a	54.24 \pm 4.98 a	69.64 \pm 2.02 b	73.88 \pm 0.88 b	72.41 \pm 0.88 b	0.0000
ALH μ m	0.67 \pm 0.24 a	1.67 \pm 0.30 b	2.41 \pm 0.03 c	2.55 \pm 0.04 c	2.61 \pm 0.06 c	0.0000
BFC Hz	9.78 \pm 3.99 a	24.64 \pm 4.44 b	34.21 \pm 0.52 c	33.03 \pm 0.30 bc	31.3 \pm 0.63 bc	0.0019

En la Figura 10 se muestra el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT), cuyo valor sufre un incremento de hasta 10 veces a medida que se alcaliniza el agua de mar (P < 0.01), alcanzando su óptimo en un rango de pH de entre 7.8 y 8.2. El resto de parámetros se muestran en el Anexo II.

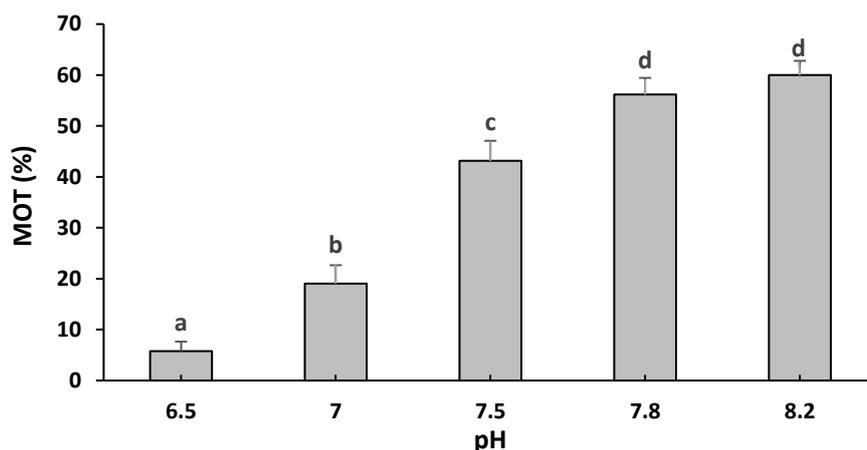


Figura 10. Efecto del pH del agua de mar sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$).

4.4. Estudio del efecto del pH del medio diluyente en la variación del pHi post-activación

4.4.1. Variación del pHi post-activación con agua de mar a pH 8.2

En la **Figura 11** se muestra la variación en el pH intracelular del espermatozoides tras su activación con agua de mar a pH 8.2, en muestras diluidas previamente a diferentes pHs, desde 6.5 a 8.5. Las variaciones de pHi tras la activación espermática dependieron del pH extracelular inicial al que las muestras estaban sometidas; así, a un pHe inicial de 6.5, el pHi aumentó entre 0.3 y 0.6 unidades al activar con ASW a pH 8.2; el pHi aumentó en unas 0.2 unidades cuando el espermatozoides estaba diluido inicialmente a pH 7.5, y en cambio disminuyó en unas 0.2 unidades cuando el espermatozoides estaba diluido a pH 8.5.

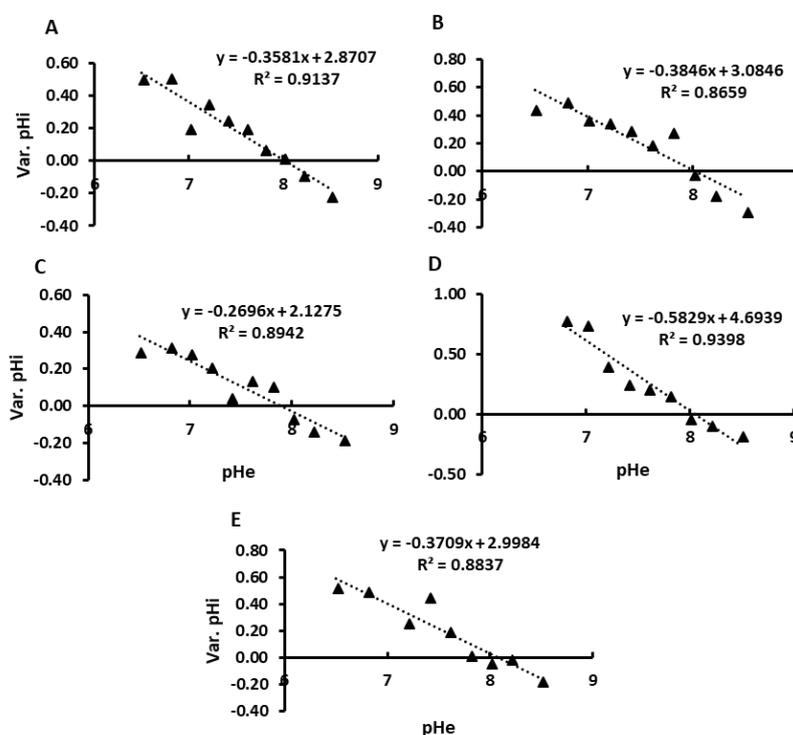


Figura 11. Cambio en el pHi tras la activación con agua de mar a pH 8.2, en muestras diluidas en P1 a diferentes pHe ($n = 5$). Valores positivos indican un aumento del pHi post-activación; valores negativos indican una reducción de pHi post-activación.

En todas las muestras se observó que el pH_i no varió prácticamente tras la activación cuando las muestras estaban diluidas a un pHe de 8.0, mientras que disminuyó alrededor de una décima cuando las muestras estaban diluidas a un pHe de 8.2.

Es decir, que la activación con ASW a pH 8.2 induce una alcalinización, una acidificación o ningún efecto sobre el pH intracelular, en función del pHe inicial al que estuvieran diluidas las muestras.

4.4.2. Variación del pH_i post-activación con agua de mar a pH 6.5

En la **Figura 12** se muestra la variación en el pH intracelular del esperma tras la activación con agua de mar a pH 6.5, en muestras diluidas previamente a diferentes pHs, desde 6.5 a 8.5. En las dos primeras muestras, la activación supuso una reducción del pH_i en las alícuotas diluidas a todos los pHs (**Figuras 12 A, 12 B**), siendo esta mayor a medida que se alcalinizaba el pH del medio diluyente. De acuerdo con las regresiones obtenidas, la variación de pH_i sería 0 cuando el pHe fuera cercano a 5.5.

En la muestra 3 (**Figura 12 C**), el pH_i también se acidificó en las muestras diluidas a todos los pHs, aunque la variación tendía a 0 cuando el pHe del diluyente era de 6.5.

En la cuarta muestra (**Figura 12 D**), cuando el pHe fue menor de 7.2, el pH_i aumentó al activar con ASW a pH 6.5, pero disminuyó en las muestras diluidas a pHs entre 7.4 y 8.5.

Por tanto, si bien la variación experimentada por el pH_i al activar con ASW a pH 6.5 dependió de la diferencia entre el pH del diluyente y el pH del medio activador, el denominador común en la gran mayoría de las condiciones testadas fue una acidificación del medio interno de los espermatozoides.

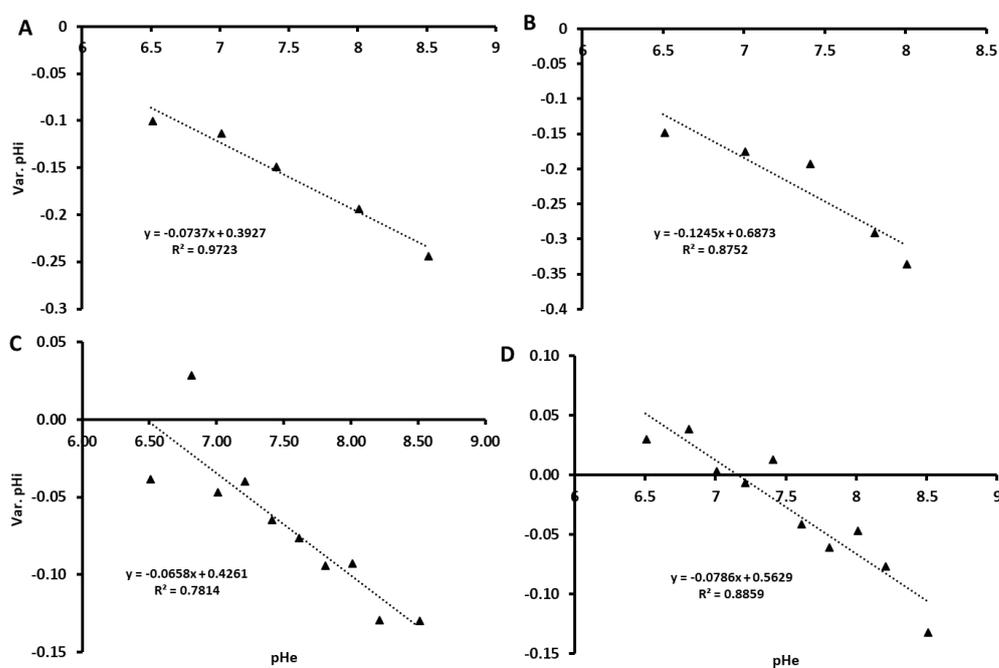


Figura 12. Variación del pH intracelular tras la activación con agua de mar a pH 6.5, en muestras diluidas en P1 a diferentes pHe (n = 4). Valores positivos indican un aumento del pH_i post-activación; valores negativos indican una reducción de pH_i post-activación.

4.5. Estudio de la interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática

Se realizó un ensayo piloto para determinar si la interacción entre el pH y el contenido en potasio del medio diluyente ejercía algún efecto sobre la motilidad espermática. Como en la prueba 4.1, se confirmó un aumento del porcentaje de espermatozoides móviles con la alcalinización del pH en los dos medios diluyentes empleados, alcanzando su óptimo en el rango de pH 8-8.2 (**Tabla 6**). No obstante, no se obtuvieron diferencias significativas en la motilidad para el factor “Medio diluyente” (a ningún pH), ni significancia para la interacción de este con el pH extracelular ($P > 0.05$).

Tabla 6. Efecto del pH y del potasio del medio diluyente sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$) para un medio concreto.

P1	pH 6.5	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.4
	30.04 \pm 10.97 a	41.27 \pm 13.65 ab	45.21 \pm 13.96 ab	44.25 \pm 13.98 ab	50.48 \pm 14.35 b
P1	pH 7.6	pH 7.8	pH 8.0	pH 8.2	pH 8.5
	49.75 \pm 15.84 b	51.1 \pm 15.01 b	53.68 \pm 15.33 b	56.67 \pm 14.59 b	54.91 \pm 15.53 b
P1	pH 6.5	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.4
	31.91 \pm 9.88 a	38.25 \pm 11.93 ab	40.98 \pm 13.13 ab	40.98 \pm 14.06 ab	49.38 \pm 17.36 b
100-K	pH 7.6	pH 7.8	pH 8.0	pH 8.2	pH 8.5
	54.1 \pm 14.81 b	54.44 \pm 13.35 b	56.5 \pm 12.41 b	50.75 \pm 8.93 b	42.31 \pm 7.01 ab

En la **Figura 13** se observa que todas las muestras analizadas tienen un perfil de motilidad (en porcentaje) similar para ambos medios, siguiendo la tendencia ya comentada. En el resto de parámetros cinéticos se obtuvieron comportamientos similares (resultados no mostrados).

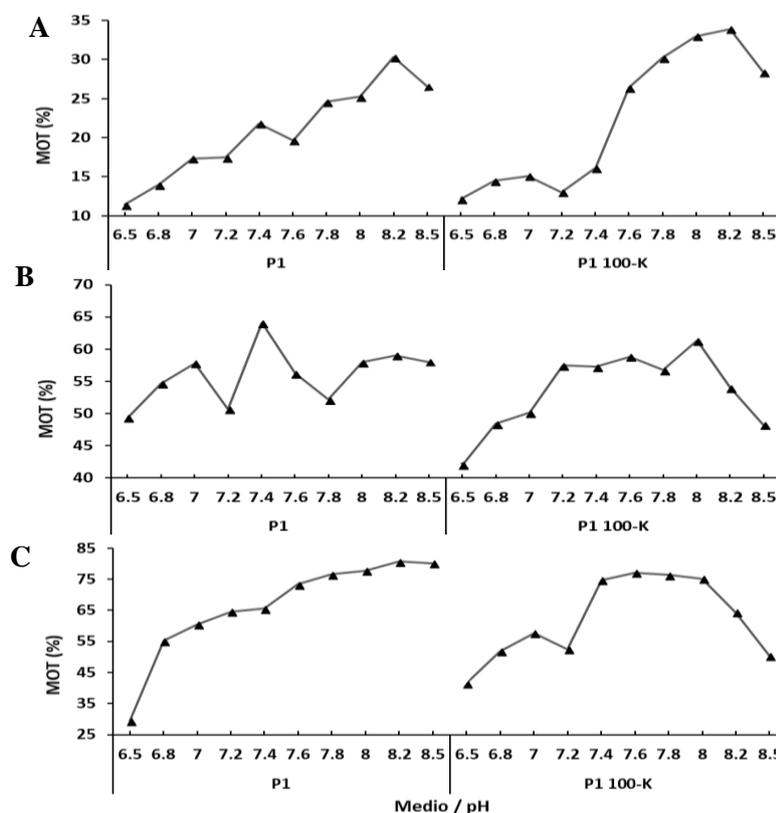


Figura 13. Efecto del pH y del potasio del medio P1 sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) en tres muestras diferentes (A, B y C).

4.6. Estudio del efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pHi con nigericin

Con el objetivo de analizar la influencia del pH en la motilidad espermática de un modo íntegro, se llevó a cabo un segundo ensayo piloto para determinar si existe un pH intracelular óptimo para la activación de la motilidad. El pHi se fijó con la adición de nigericin, ionóforo que iguala el nivel de pH interno con el externo.

Se confirmó la existencia de diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles con la variación del pHi, siguiendo este una tendencia al alza desde pHs ácidos hasta alcanzar su óptimo en el rango de pH 7.6-7.8 (Tabla 7). A pHs intracelulares más elevados, se observó una drástica reducción de la motilidad. En el resto de parámetros cinéticos se obtuvieron tendencias similares (resultados no mostrados). Si bien el peso estadístico de los estudios preliminares es reducido, estos resultados incentivarían a hacer un ensayo a mayor escala.

Tabla 7. Efecto del pH intracelular en el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT). Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 3). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH (P < 0.05).

	pH 6.5	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2	pH 7.4
P1	0.79 \pm 0.42 a	0.58 \pm 0.30 a	0.17 \pm 0.09 a	3.37 \pm 1.60 ab	17.83 \pm 2.53 b
100-K	pH 7.6	pH 7.8	pH 8.0	pH 8.2	pH 8.5
	34.66 \pm 4.22 c	37.64 \pm 9.39 c	8.62 \pm 3.51 ab	5.35 \pm 1.53 ab	4.04 \pm 1.19 ab

En la Figura 14 se observan los distintos perfiles de motilidad (en porcentaje) que siguen las muestras analizadas, donde se aprecia con claridad el comportamiento descrito en este apartado, habiendo una alta reproducibilidad entre ellas.

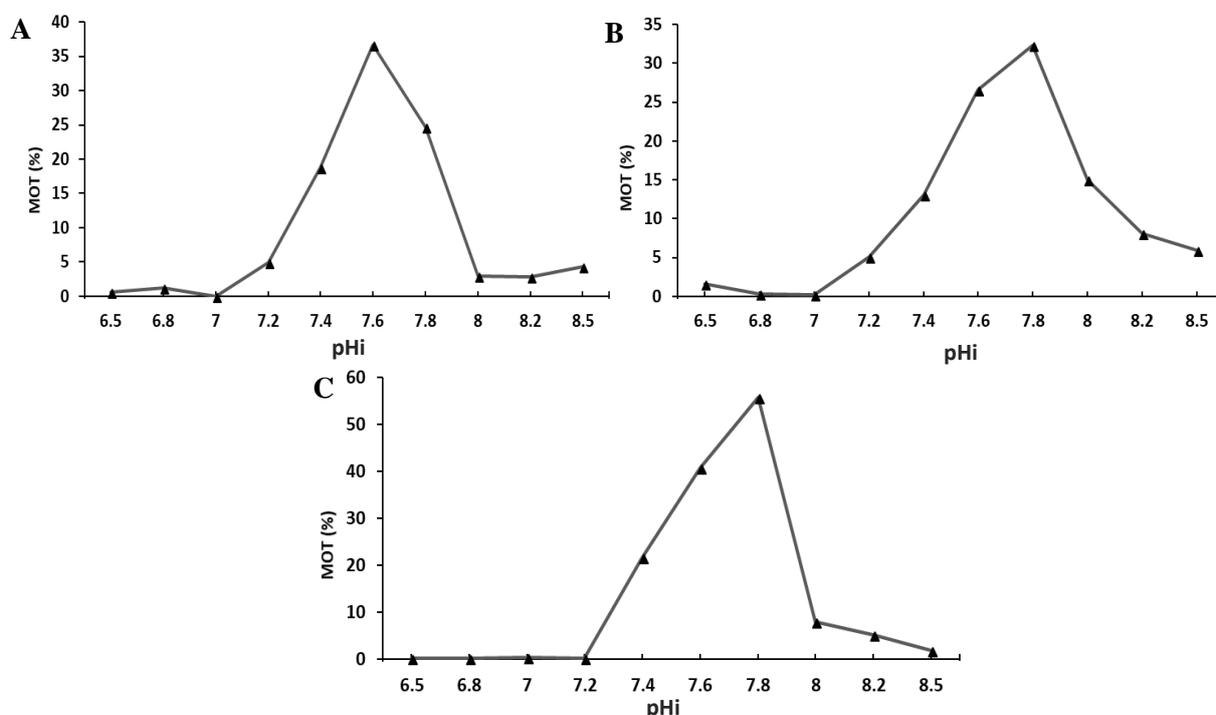


Figura 14. Efecto del pH intracelular (igualado al pH del medio diluyente con nigericin) sobre el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT) en tres muestras diferentes (A, B y C).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática

En peces, la última fase de maduración de los espermatozoides, esto es, el proceso mediante el cual adquieren la capacidad de moverse y, por tanto, de fecundar, tiene lugar en el espermiducto (Miura *et al.*, 1992). Tan es así, que en salmónidos y anguila japonesa, el esperma no es capaz de adquirir motilidad si es extraído del testículo sin atravesar el espermiducto, a menos que se incube en un medio alcalino (Morisawa & Morisawa, 1988). Además, en anguila japonesa se ha observado que, en el testículo, el esperma presenta un pH de 7.5 y una elevada concentración de K^+ , mientras que, en el espermiducto, sufre un incremento de pH hasta 8.0 y una disminución en la concentración de K^+ (Ohta *et al.*, 1997). Esto sugiere que el pH está involucrado en la maduración y conservación de los espermatozoides en el espermiducto.

En el presente estudio, la incubación del esperma de anguila europea en el medio diluyente P1 a diferentes pH (6.5-8.5), produjo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles y otros parámetros cinéticos, tanto a 0 h como a 24 h. En este lapso de tiempo las muestras se deterioraron de manera independiente al pH en el que estaban diluidas. Los resultados mostraron un incremento en la motilidad espermática a medida que se alcalinizaba el medio diluyente, alcanzando valores máximos a pHs 8.0-8.5. Por tanto, los medios diluyentes para el esperma de la anguila europea deberían tener un pH de 8-8.5 para la óptima conservación de las muestras.

Esta tendencia se corresponde con lo observado por Peñaranda *et al.* (2009) en trabajos con anguila europea, en los que concluyeron que diluyentes con un pH ácido (pH 6.5) inducían una inhibición de la motilidad que no se observaba cuando los espermatozoides se mantenían en un medio a pH fisiológico (pH 8.5). Sin embargo, los presentes resultados contrastan con lo descrito en otro ensayo con esta especie, donde no se observaron diferencias significativas en la motilidad de muestras sometidas a medios diluyentes en un rango de pH de 7.0 a 8.5 (Garzón *et al.*, 2008). En el estudio de Garzón *et al.* (2008), las muestras presentaban escasa motilidad tras la dilución inmediata, en torno a 30-35 %, y la motilidad era nula tras 5 minutos de dilución en medio P1 a diferentes pHs. Esto sugiere que las muestras se conservaron de forma defectuosa en dicho ensayo, tal vez por el mantenimiento a temperatura ambiente, ya que, en diversos ensayos posteriores, incluido el presente estudio, se ha observado que la motilidad desciende tan sólo entre 7-15 % incluso tras 24 h de mantenimiento en diluyente a 4°C.

En anguila japonesa (Miura *et al.*, 1995) y en otras familias de teleósteos como los salmónidos (Billard, 1981) y los ciprínidos (Lahnsteiner *et al.*, 1996), se han confirmado mejores parámetros de motilidad en espermatozoides diluidos en medios con un pH ligeramente alcalino (pH 7.8-8.5). Estas evidencias dan veracidad a la hipótesis que, en peces, un pH del plasma seminal alcalino (alrededor de 8.0) es necesario para que los espermatozoides adquieran una funcionalidad óptima. Queda por confirmar si en la anguila europea, al igual que en la japonesa, el pH del semen testicular es inferior al del semen eyaculado (pH=8.0) o al del plasma seminal (pH=8.5), lo que confirmaría la hipótesis de la maduración inducida por alcalinización en el espermiducto, indicada por Miura & Miura (2001).

5.2. Efecto del pH del medio diluyente en el pH intracelular

Los resultados de este estudio mostraron que, en estado quiescente, el pH_i de diferentes muestras de esperma de anguila europea diluidas en medio P1 en el rango de pH 6.5-8.5, se mantenía, en todos los casos, alrededor de 0.7 puntos por debajo del pH externo. Por lo tanto, en estado quiescente existe un gradiente de H^+ , con niveles más altos de $[H^+]_i$ que en el medio circundante. Esto sugiere que los espermatozoides necesitan un pH intracelular inferior al pH_e para mantener su capacidad de activación y funcionalidad. En concreto, si se establece una relación con los datos de motilidad obtenidos en este estudio, que alcanzaron valores máximos cuando el pH del medio diluyente era de 8.0-8.5, el pH_i óptimo estaría en torno a 7.5.

El pH intracelular observado en el presente estudio fue ligeramente superior al observado por Vélchez *et al.* (2017) en esta misma especie, ya que, en las mismas condiciones (pH_e 8.5) era de 7.2, es decir, 1.3 unidades menor que el del plasma seminal. En el estudio citado únicamente se evaluó el pH_i de una muestra de esperma, por lo que los resultados del presente estudio resultan más concluyentes. Existen pocos estudios similares en otras especies. Billard (1986) y Gatti *et al.* (1990) observaron en salmónidos que el pH_i se encontraba cerca de 1 unidad por debajo del pH del plasma seminal.

En este trabajo se demuestra que el pH del medio diluyente determina el pH intracelular en el esperma de la anguila europea. A su vez, esto podría afectar al potencial de membrana de los espermatozoides y, por ende, a su motilidad. Gatti *et al.* (1990) demostraron en la trucha arcoíris que el potencial de membrana es sensible al pH_e , habiendo una mayor hiperpolarización de la membrana con un aumento en el pH del medio de incubación. La baja motilidad observada a bajos pH podría deberse también al efecto del pH_i en el axonema, ya que la actividad ATP-asa de las dineínas, responsables del movimiento, se ve especialmente afectada a pHs inferiores a 7.4 en salmónidos (Woolsey & Ingermann, 2003).

Desde un punto de vista de futuras investigaciones, la relación directa entre el pH del medio diluyente y el pH_i resulta muy útil, ya que permitirá variar de forma precisa el pH intracelular tan sólo ajustando el pH extracelular del medio P1 a un valor de 0.7 unidades por encima del valor de pH_i deseado, y sin necesidad de emplear diluyentes no fisiológicos, como por ejemplo, medios con ionóforos o sales de sodio del ácido acético o de amonio.

5.3. Efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática

El pH medio del agua de mar, donde el esperma de los peces marinos con fecundación externa es liberado, es actualmente de 8.1, aunque era de 8.2 antes de la Revolución Industrial (Bates *et al.*, 2012). Si bien la osmolalidad del agua de mar es el principal responsable del inicio de la motilidad espermática en peces marinos (Morisawa, 2008), numerosos estudios realizados con el fin de establecer el pH del medio activador capaz de inducir una mayor motilidad en el esperma de diversas especies acuáticas, han revelado que este factor también juega un papel clave (revisado por Alavi & Cosson, 2005).

En el presente trabajo, la activación de la motilidad del esperma de anguila europea con agua de mar a diferentes pH (6.5-8.2) mostró grandes diferencias en la mayoría de parámetros cinéticos, registrándose máximos en el porcentaje de espermatozoides móviles a pH 8.2, y máximas velocidades (VCL, VSL,

VAP) en ASW a pH 7.8. Por su parte, un pH ácido (pH 6.5) del medio activador demostró reducir la motilidad espermática en un 90% con respecto a las muestras activadas con ASW a pH 8.2.

Las observaciones del presente estudio coinciden con las realizadas por Tanaka *et al.* (2004) en una especie cercana, la anguila japonesa. En este estudio, la motilidad del esperma disminuyó en más de un 50% con la acidificación del medio activador (rango de pH 6.2-9.2), siendo óptima a pH 8.2. El hecho de que en ambas especies de anguila el pH óptimo sea 8.2, es coherente, por ser este un pH cercano al registrado en sus respectivas zonas de desove (Millero & Sohn, 1992; Van Ginneken & Maes, 2005). En otros teleósteos, como el pez globo y el pez cebra (Takai & Morisawa, 1995), así como en salmónidos (Kutluyer, 2018) y esturiones (Gallis *et al.*, 1991), se han observado resultados similares, con un descenso de la motilidad a pHs del medio activador bajos.

A partir de estudios realizados en trucha común, Dziewulska & Domagała (2013) sugirieron que un bajo pH del medio activador afecta a la motilidad espermática, por interferir en los eventos de despolarización de la membrana plasmática e intercambio iónico necesarios para el correcto funcionamiento flagelar. Además, una disminución del pH del agua de mar puede limitar la actividad metabólica de los gametos (Sun *et al.*, 2015) y reducir el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides (Schlegel *et al.*, 2015), dificultando la motilidad del flagelo.

La acidificación del mar debido al cambio climático puede suponer un descenso del pH desde los niveles actuales (pH 8.1) hasta valores de 7.7-7.8 a finales del siglo XXI (Fabry *et al.*, 2008). Esto podría afectar a la motilidad del esperma de las especies marinas. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias significativas en la motilidad entre los pH 8.2 y 7.8, por lo que el efecto de dicha acidificación sobre el esperma de la anguila europea puede ser algo más limitado que en el de otras especies.

5.4. Efecto del pH del medio diluyente en la variación del pHi post-activación

El presente estudio ha demostrado por primera vez que, en agua de mar (pH ASW 8.2), la variación del pH intracelular post-activación depende del pH del medio diluyente en el que se incuban las muestras de esperma. Así, se observó una alcalinización del pHi cuando el pH del diluyente era menor que 8.0, y una acidificación cuando el pH del diluyente era mayor a 8.0. Es decir, que el pHi aumentaba si el semen estaba diluido a pHs entre 6.5 y 8.0, pero disminuía si el semen estaba diluido a un pH mayor que 8.0. Dicho de otro modo, si se diluía el semen a un $pH_e < pH_{ASW}$, el pHi aumentaba tras la activación, pero si se diluía el semen a un $pH_e > pH_{ASW}$, el pHi descendía. Estas observaciones no se han realizado en ninguna otra especie marina, de vertebrado o invertebrado, hasta donde se tiene noticia. En cambio, se ha considerado que la alcalinización del pH intracelular es un proceso necesario para la activación del movimiento del esperma, tanto en peces como en mamíferos o invertebrados marinos.

En el pez globo, Oda & Morisawa (1993) observaron que la alcalinización interna, incluso sin choque osmótico, era suficiente para activar el movimiento de los espermatozoides, ya que al aplicar NH_4Cl (que alcaliniza el medio intracelular) en condiciones isoosmóticas, se indujo la activación del movimiento. En mamíferos, invertebrados, ciprínidos y salmónidos, también se ha observado que el pHi

aumenta en 0.2-0.4 unidades con el inicio de la motilidad espermática (Wong *et al.*, 1981; Lee *et al.*, 1983; Boitano & Omoto, 1991; Krasznai *et al.*, 1995). Sin embargo, en la anguila europea no se observó este fenómeno y, al aplicar NH_4Cl , no sólo no se indujo el movimiento, sino que se produjo una inhibición del mismo en medio hiperosmótico (Vílchez *et al.*, 2017).

La acidificación del pH intracelular en el espermatozoide de la anguila europea ya fue descrita en estudios previos del grupo (Gallego *et al.*, 2014; Vílchez *et al.*, 2017), donde se observó una disminución de alrededor de 0.1 unidades de pH_i con la activación espermática, en condiciones estándar (plasma seminal y agua de mar a pH 8.5 y 8.2, respectivamente). Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, bajo las mismas condiciones experimentales.

El comportamiento diferencial observado hace difícil establecer el papel de la variación del pH_i en la activación de la motilidad espermática en anguila europea, y sugiere que los cambios observados se deben más a la diferencia de pH entre el medio diluyente y el medio activador que al proceso de activación de la motilidad. El hecho de que la disminución artificial del pH intracelular con acetato sódico ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) no conlleve la activación de la motilidad espermática en condiciones normales (Vílchez *et al.*, 2017), da soporte a la hipótesis planteada, pudiendo ser los cambios en el pH_i observados, resultado de los mecanismos amortiguadores de los que dispone la célula para reducir el impacto que los diferentes pHs extracelulares pueden tener sobre ella (Hamamah & Gatti, 1998).

Por su parte, en condiciones de muy reducida motilidad (pH ASW 6.5), la acidificación que sufrió el pH_i en la mayoría de las muestras diluidas en el rango de pH 6.5-8.5, pudo deberse a la despolarización que un pH del medio activador tan bajo provocó sobre la membrana plasmática. Esta es permeable a los protones y su potencial pudo verse afectado, resultando insuficiente la actividad de los diferentes mecanismos de regulación del pH_i de los espermatozoides (Hamamah & Gatti, 1998).

5.5. Efecto de la interacción del potasio y pH del medio diluyente en la motilidad espermática

La composición iónica del plasma seminal tiene una importante influencia en la motilidad del espermatozoide de los peces con fecundación externa. Estudios realizados sobre el ion potasio revelaron, por ejemplo, que una alta concentración en K^+ incrementa la motilidad espermática en carpa (Billard & Cosson, 1992), pero la inhibe en salmónidos (Morisawa & Suzuki, 1980).

Por otra parte, varios trabajos realizados con teleósteos marinos han indicado que, en el pez globo (Takai & Morisawa, 1995; Gallego *et al.*, 2013) o la anguila europea (Gallego *et al.*, 2014), los niveles intracelulares de potasio se incrementaban tras un choque hiperosmótico, sugiriendo un importante papel de este ion en el inicio de la motilidad espermática. Asimismo, tanto en la anguila europea como en la anguila japonesa, se probó que la eliminación del potasio del plasma seminal reducía la motilidad espermática en un 94%, posiblemente por cambios en el volumen celular, potencial de membrana o pH_i , y que esta era parcialmente recuperada tras una re-incubación con plasma seminal enriquecido en potasio (Ohta *et al.*, 2001; Vílchez *et al.*, 2017).

Estas evidencias, sumadas a las aportaciones de Ohta *et al.* (2001), en las que se describía un incremento de la motilidad del espermatozoide de la anguila japonesa a medida que se aumentaba la concentración de potasio del plasma seminal (0-30 mM), llevaron a plantear en este trabajo una prueba piloto para estudiar el efecto de altas concentraciones de K^+ (100 mM) en el plasma seminal de la anguila europea, así como su interacción con el pH del mismo. Los resultados de este ensayo no mostraron, a ningún pH testado en el rango 6.5-8.5, diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles entre las muestras incubadas en medio P1 convencional (30 mM KCl) y en medio P1 100-K (100 mM KCl). No hubo, por tanto, efecto alguno de la interacción entre los niveles de potasio y el pH del medio diluyente sobre la motilidad espermática ($P > 0.05$), que sí se vio incrementada con la alcalinización de ambos medios, alcanzando su óptimo en el rango de pH 8.0-8.2.

Si bien no se han realizado ensayos a gran escala para estudiar las condiciones experimentales aquí propuestas, los resultados obtenidos, aunque con reducido peso estadístico, apuntan a que el potasio del plasma seminal no es un ion limitante para la motilidad espermática en anguila europea (al menos a concentraciones fisiológicas de 30 mM) y que altas concentraciones del mismo (hasta 100 mM), tampoco parecen repercutir sobre los principales factores involucrados en dicha motilidad, como podría ser el potencial transmembrana.

5.6. Efecto del pH intracelular en la motilidad espermática: fijación del pHi con nigericin

El pHi de una célula es equivalente al pH externo en presencia del ionóforo K^+/H^+ nigericin, siempre y cuando la concentración extracelular de potasio sea igual a la intracelular (Thomas *et al.*, 1979). En este estudio se realizó una prueba piloto basada en este principio, para determinar el efecto del pHi en la motilidad del espermatozoide, en el rango de pH 6.5-8.5. Para ello, se elevó la concentración de KCl del medio diluyente a 100 mM (en este trabajo se ha comprobado que dicha concentración no tiene efectos sobre la motilidad espermática), igualándola con la $[K^+]$ intracelular (L. Pérez, datos no publicados).

Los resultados obtenidos mostraron que el pHi es un factor crítico para el inicio de la motilidad espermática, inhibiéndola prácticamente por completo cuando su valor es igual o inferior a 7.2 y mayor que 8.0. Por su parte, el rango de pH 7.6-7.8 mostró ser óptimo para la motilidad de los espermatozoides, hecho que coincide y refuerza los resultados de las pruebas 4.1 y 4.2 del presente trabajo, en las que el mayor porcentaje de espermatozoides móviles se dio en el rango de pHe 8.0-8.5, registrándose pHis intracelulares de aproximadamente 7.3-7.8.

Las observaciones aquí realizadas coinciden parcialmente con lo descrito por Takai & Morisawa (1995) en pez globo, cuyos espermatozoides permanecían inmóviles cuando el pHi era menor que 7.4 tras la adición de nigericin, y mostraban óptimos de motilidad a un pH cercano a 8.0 cuando se les retiraba la membrana. Los mecanismos por los cuales un pH intracelular alejado del rango 7.5-8.0 impide el inicio de la motilidad del espermatozoide no están claros, pero probablemente incluyan la sensibilidad al pH del potencial de membrana (Gatti *et al.*, 1990) y de la actividad ATP-asa de las dineínas del axonema, así como del metabolismo del ATP por parte de la creatina quinasa (Woolsey & Ingermann, 2003).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

1. El pH óptimo del medio diluyente para el inicio y la preservación de la motilidad del esperma de la anguila europea está entre 8.0 y 8.5.
2. Existe una relación directa entre el pH intracelular y el pH del plasma seminal artificial, manteniéndose el primero alrededor de 0.7 unidades por debajo del segundo.
3. Un pH del medio activador ácido inhibe la motilidad de los espermatozoides de la anguila europea, que alcanza valores máximos cuando estos son activados con agua de mar a pH 7.8-8.2.
4. Con la activación del movimiento del esperma de la anguila europea, el pH intracelular sufre una alcalinización, una acidificación, o no varía, en función de pH del medio diluyente y del pH del medio activador.
5. El porcentaje de espermatozoides móviles de la anguila europea es máximo cuando el pH intracelular de los mismos se encuentra entre 7.6 y 7.8, siendo drásticamente reducido por pHs alejados de este rango.
6. En las condiciones experimentales testadas, la interacción entre el pH y la concentración de potasio del medio diluyente no tiene efecto alguno sobre la motilidad espermática, como tampoco lo tiene la $[K^+]$ por sí sola.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- ABASCAL, F. J.; COSSON, J.; FAUVEL, C. (2007). Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology*, 70(2): 509-522.
- AFZELIUS, B. (1959). Electron microscopy of the sperm tail; results obtained with a new fixative. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 5(2): 269-278.
- ALAVI, S. M. H., & COSSON, J. (2005). Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. *Cell Biology International*, 29(2): 101-110.
- ALAVI, S. M. H., & COSSON, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International*, 30(1): 1-14.
- ARAI, T.; OTAKE, T.; TSUKAMOTO, K. (2000). Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology*, 137(1): 39-45.
- 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(3-4): 283-293.
- BACCETTI, B.; BURRINI, A. G.; DALLAI, R.; PALLINI, V. (1979). The dynein electrophoretic bands in axonemes naturally lacking the inner or the outer arm. *The Journal of Cell Biology*, 80(2): 334-340.
- BALKAY, L.; MÁRIÁN, T.; EMRI, M.; TRÓN, L. (1992). A novel method for measuring intracellular pH: effect of neutron irradiation on pHi of transformed cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 16(3-4): 367-375.
- BATES, N. R.; BEST, M. H. P.; NEELY, K.; GARLEY, R.; DICKSON, A. G.; JOHNSON, R. J. (2012). Detecting anthropogenic carbon dioxide uptake and ocean acidification in the North Atlantic Ocean. *Biogeosciences*, 9(7): 2509-2522.
- BILLARD, R. (1981). Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 23(1): 287-293.
- BILLARD, R. (1983). Effects of coelomic and seminal fluids and various saline diluents on the fertilizing ability of spermatozoa in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 68(1): 77-84.
- BILLARD, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species (1). *Reproduction Nutrition Développement*, 26(4): 877-920.
- BILLARD, R. & COSSON, M. P. (1992). Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *Journal of Experimental Zoology*, 261(2): 122-131.

- BILLARD, R. & MENEZO, Y. (1984). The amino acid composition of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) seminal fluid and blood plasma: A comparison with carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 41(3): 255-258.
- BILLARD, R.; BRETON, B.; JALABERT, B.; ESCAFFRE, A. M.; SOLARI, A. (1971). La production spermatogénétique chez la truite. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 11(2): 199-212.
- BILLARD, R.; COSSON, J.; CRIM, L. W. (1993). Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6(1): 67-75.
- BILLARD, R.; S. GINSBURG, A.; ESCAFFRE, A. M.; HUNEAU, D. (1973). La spermiogenèse et le spermatozoïde d'*Anguilla anguilla* L. Etude ultrastructurale. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 13(4): 523-534.
- BOITANO, S. & OMOTO, C. K. (1991). Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH. *Journal of Cell Science*, 98 (3): 343-349.
- BRACHO, G. E.; FRITCH, J. J.; TASH, J. S. (1998). Identification of Flagellar Proteins That Initiate the Activation of Sperm Motility in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(1): 231-237.
- CASTONGUAY, M.; V. HODSON, P.; MORIARTY, C.; DRINKWATER, K.; JESSOP, B. (1994). Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? *Fisheries Oceanography*, 3: 197-203.
- CIERESZKO, A.; DIETRICH, M. A.; NYNCA, J. (2012). The identification of seminal proteins in fish: from a traditional approach to proteomics. *Journal of Applied Ichthyology*, 28(6): 865-872.
- CLEMENS, H. P.; CIERESZKO, L. S.; SHOEMAKER, J. D.; GRANT, F. B. (1964). Partial characterization of the gonadal hydration principle in the pituitaries of carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology*, 4(5): 503-507.
- COSSON, J. (2010). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portending their precocious decadence. *Journal of Fish Biology*, 76(1): 240-279.
- COSSON, J.; BILLARD, R.; CIBERT, C.; DREANNO, C.; LINHART, O.; SUQUET, M. (1997). Movements of fish sperm flagella studied by high speed videomicroscopy coupled to computer assisted image analysis. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 44: 103-113.
- COSSON, J.; GROISON, A. L.; SUQUET, M.; FAUVEL, C.; DREANNO, C.; BILLARD, R. (2008). Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction*, 136(3): 277-294.
- COSSON, M. P.; CARRÉ, D.; COSSON, J. (1984). Sperm chemotaxis in siphonophores. II. Calcium-dependent asymmetrical movement of spermatozoa induced by the attractant. *Journal of Cell Science*, 68: 163-181.

- DAN, J. C. (1950). Fertilization in the medusan, *Spirocodon saltatrix*. *The Biological Bulletin*, 99(3): 412-415.
- DAWE, H. R.; FARR, H.; GULL, K. (2007). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of Cell Science*, 120(1): 7-15.
- DEELDER, C. L. (1984). *Synopsis of biological data on the eel, Anguilla, anguilla (Linnaeus, 1758)*. Ed. FAO. Rome. 73 pp.
- DEKKER, W. (2003). Status of the European Eel Stock and Fisheries, en *Eel Biology*. Ed. Springer. Tokyo: 237-254.
- DEKKER, W.; OS, B. VAN; WILLIGEN, J. VAN (1998). Minimal and Maximal size of eel. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 349: 195-197.
- DESAUNAY, Y. & GUEREAULT, D. (1997). Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity. *Journal of Fish Biology*, 51: 317-339.
- DZIEWULSKA, K. & DOMAGAŁA, J. (2013). Effect of pH and cation concentrations on spermatozoan motility of sea trout (*Salmo trutta m. trutta* L.). *Theriogenology*, 79(1): 48-58.
- DZYUBA, V. & COSSON, J. (2014). Motility of fish spermatozoa: from external signaling to flagella response. *Reproductive Biology*, 14(3): 165-175.
- FABRY, V. J.; SEIBEL, B. A.; FEELY, R. A.; ORR, J. C. (2008). Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *ICES Journal of Marine Science*, 65(3): 414-432
- FISHSTATJ. FISHERIES AND AQUACULTURE SOFTWARE (2016). Universal software for fishery statistical time series. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Rome, visto el 5 de junio de 2018 <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>
- GALLEGO, V.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MAZZEO, I.; PEÑARANDA, D. S.; HERRÁEZ, M. P.; ASTURIANO, J. F.; PÉREZ, L. (2014). Intracellular changes in Ca²⁺, K⁺ and pH after sperm motility activation in the European eel (*Anguilla anguilla*): Preliminary results. *Aquaculture*, 418-419: 155-158.
- GALLEGO, V.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; YOSHIDA, M. (2013). Study of pufferfish (*Takifugu niphobles*) sperm: Development of methods for short-term storage, effects of different activation media and role of intracellular changes in Ca²⁺ and K⁺ in the initiation of sperm motility. *Aquaculture*, 414-415: 82-91.
- GALLIS, J. L.; FEDRIGO, E.; JATTEAU, P.; BONPUNT, E.; BILLARD, R. (1991). Siberian sturgeon spermatozoa: Effects of dilution, pH, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility, en *Acipenser*. Ed. Cemagref. Bordeaux: 143-151.

- GARZÓN, D. L.; PEÑARANDA, D. S.; PÉREZ, L.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; ESPERT, X.; MÜLLER, T.; JOVER, M.; ASTURIANO, J. F. (2008). Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and foetal bovine serum on the cryopreservation of European eel sperm. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43(1): 99-105.
- GATTI, J. L.; BILLARD, R.; CHRISTEN, R. (1990). Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa: role in the initiation of sperm motility. *Journal of Cellular Physiology*, 143(3): 546-554.
- GIBBONS, B. H. & GIBBONS, I. R. (1973). The effect of partial extraction of dynein arms on the movement of reactivated sea-urchin sperm. *Journal of Cell Science*, 13(2): 337-357.
- GIBBONS, B. H.; GIBBONS, I. R.; BACCETTI, B. (1983). Structure and motility of the 9 + 0 flagellum of eel spermatozoa. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 15(1): 15-20.
- GIBBONS, B.; BACCETTI, B.; GIBBONS, I. (1985). Live and Reactivated Motility in the 9 + 0 Flagellum of *Anguilla* Sperm. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 5(4): 333-350.
- GUTIÉRREZ, J. C. (2003). *Desarrollo y evaluación de modelos para la toma de decisiones. Caracterización de la producción de anguilas (*Anguilla anguilla* L.) en sistemas intensivos.* Tesis doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad de Córdoba. 392 pp.
- HAMAMAH, S. & GATTI, J. L. (1998). Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13(4): 20-30.
- HE, S.; JENKINS-KEERAN, K.; WOODS, L. C. (2004). Activation of sperm motility in striped bass via a cAMP-independent pathway. *Theriogenology*, 61(7-8): 1487-1498.
- HO, H. C. & SUAREZ, S. S. (2003). Characterization of the Intracellular Calcium Store at the Base of the Sperm Flagellum That Regulates Hyperactivated Motility. *Biology of Reproduction*, 68(5): 1590-1596.
- ICES.2017. Report of the Joint EIFAAC/ICES/GFCM Working Group on Eels (WGEEL). *ICES CM 2017/ACOM:15*. Kavala, Greece. 99 pp.
- INABA, K. (2003). Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Zoological Science*, 20(9): 1043-1056.
- INABA, K. (2011). Sperm flagella: comparative and phylogenetic perspectives of protein components. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 17(8): 524-538.
- INABA, K.; KAGAMI, O.; OGAWA, K. (1999). Tctex2-related outer arm dynein light chain is phosphorylated at activation of sperm motility. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(1): 177-183.
- INABA, K.; MORISAWA, S.; MORISAWA, M. (1998). Proteasomes regulate the motility of salmonid fish sperm through modulation of cAMP-dependent phosphorylation of an outer arm dynein light chain. *Journal of Cell Science*, 111(8): 1105-1115.

- ITOH, A.; INABA, K.; OHTAKE, H.; FUJINOKI, M.; MORISAWA, M. (2003). Characterization of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit from rainbow trout spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305(4): 855-861.
- JIMÉNEZ, P. (27 diciembre 2016). La última esperanza para salvar a la anguila europea. *El Mundo*. Internet: <http://www.elmundo.es/> (acceso 4 junio 2018).
- JUYENA, N. S. & STELLETTA, C. (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(4): 536-551.
- KAUPP, U. B.; HILDEBRAND, E.; WEYAND, I. (2006). Sperm chemotaxis in marine invertebrates-- molecules and mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, 208(3): 487-494.
- KHO, K. H.; TANIMOTO, S.; INABA, K.; OKA, Y.; MORISAWA, M. (2001). Transmembrane Cell Signaling for the Initiation of Trout Sperm Motility: Roles of Ion Channels and Membrane Hyperpolarization for Cyclic AMP Synthesis. *Zoological Science*, 18(7): 919-928.
- KNIGHTS, B. (2003). A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Science of The Total Environment*, 310(1): 237-244.
- KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; BALKAY, L.; GÁSPÁR, R.; TRÓN, L. (1995). Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture*, 129(1): 123-128.
- KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L.; MORISAWA, M. (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5): 2052-2057.
- KRASZNAI, Z.; MORISAWA, M.; KRASZNAI, Z. T.; MORISAWA, S.; INABA, K.; BAZSÁNÉ, Z. K.; BODNÁR, B.; BORSOS, A.; MÁRIÁN, T. (2003). Gadolinium, a mechano-sensitive channel blocker, inhibits osmosis-initiated motility of sea- and freshwater fish sperm, but does not affect human or ascidian sperm motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 55(4): 232-243.
- KUTLUYER, F. (2018). Role of pH on the initiation of sperm motility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Çoruh trout (*Salmo coruhensis*). *Balikesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*: 1-9.
- LAHNSTEINER, F. (2007). Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Reproduction Science*, 97(1-2): 151-164.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; WEISMANN, T.; PATZNER, R. A. (1996). Motility of spermatozoa of *Alburnus alburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism. *Fish Physiology and Biochemistry*, 15(2): 167-179.

- LECOMTE-FINIGER, R. (1994). The early life of the European eel. *Nature*, 370: 424.
- LEE, H. CHEUNG; JOHNSON, C.; EPEL, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology*, 95(1): 31-45.
- LINHART, O.; WALFORD, J.; SIVALOGANATHAN, B.; LAM, T. J. (1999). Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater- and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, 55(6): 1344-1358.
- LOIR, M.; LABBÉ, C.; MAISSE, G.; PINSON, A.; BOULARD, G.; MOUROT, B.; CHAMBEYRON, F. (1990). Proteins of seminal fluid and spermatozoa in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): Partial characterization and variations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8(6): 485-495.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F.; CABRITA, E.; SOARES, F.; ANEL, L.; DINIS, M. T. (2008). Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction*, 135(4): 449-459.
- MATTEI, C. & MATTEI, X. (1975): Spermiogenesis and spermatozoa of the Elopomorpha (Teleost fish), en: *The functional anatomy of the spermatozoon*, Ed. Elsevier. New York: 211–221.
- MILLER, R. L. (1975). Chemotaxis of the spermatozoa of *Ciona intestinalis*. *Nature*, 254(5497): 244-245.
- MILLER, R. L. (1985): Sperm chemo-orientation in metazoan, en: *Biology of fertilization*. Ed. Academic Press. New York: 257–337.
- MILLERO, F. J. A. & SOHN, M. L. A. (1992). *Chemical Oceanography*, 4^a Ed. CRC Press. Boca Ratón: 591 pp.
- MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 261(3): 359-363.
- MIURA, T.; KASUGAI, T.; NAGAHAMA, Y.; YAMAUCHI, K. (1995). Acquisition of Potential for Sperm Motility in vitro in Japanese Eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 61(3): 533-534.
- MIURA, T. & MIURA, C. (2001). Japanese Eel: A Model for Analysis of Spermatogenesis. *Zoological Science*, 18(8): 1055-1063.
- MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKAHASHI, H.; NAGAHAMA, Y. (1992). The role of hormones in the acquisition of sperm motility in salmonid fish. *The Journal of Experimental Zoology*, 261(3): 359-363.
- MOCHIDA, K.; KONDO, T.; MATSUBARA, T.; ADACHI, S.; YAMAUCHI, K. (1999). A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Development, Growth & Differentiation*, 41(5): 619-627.
- MORISAWA, M. (1985). Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zoological Science*, 2(5): 605-615.

- MORISAWA, M. (1994). Cell signaling mechanisms for sperm motility. *Zoological Science*, 11(5): 647-662.
- MORISAWA, M. (2008). Adaptation and strategy for fertilization in the sperm of teleost fish. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4): 362-370.
- MORISAWA, M. & ISHIDA, K. (1987). Short-term changes in levels of cyclic AMP, adenylate cyclase, and phosphodiesterase during the initiation of sperm motility in rainbow trout. *The Journal of Experimental Zoology*, 242(2): 199-204.
- MORISAWA, S. & MORISAWA, M. (1988). Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *The Journal of Experimental Biology*, 136: 13-22.
- MORISAWA, M. & SUZUKI, K. (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science*, 210(4474): 1145-1147.
- MORISAWA, M.; SUZUKI, K.; MORISAWA, S. (1983). Effects of potassium and osmolality on spermatozoan motility of salmonid fishes. *The Journal of Experimental Biology*, 107: 105-113.
- MORISAWA, M.; TANIMOTO, S.; OHTAKE, H. (1992). Characterization and partial purification of sperm-activating substance from eggs of the herring, *Clupea palasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 264(2): 225-230.
- MORITA, M.; TAKEMURA, A.; NAKAJIMA, A.; OKUNO, M. (2006). Microtubule sliding movement in tilapia sperm flagella axoneme is regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphorylation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(8): 459-470.
- NOMURA, M.; INABA, K.; MORISAWA, M. (2000). Cyclic AMP- and calmodulin-dependent phosphorylation of 21 and 26 kda proteins in axoneme is a prerequisite for SAAF-induced motile activation in ascidian spermatozoa. *Development, Growth & Differentiation*, 42(2): 129-138.
- NORTON, J.; ROLLINSON, D.; LEWIS, J. W. (2005). Epidemiology of *Anguillicola crassus* in the European eel (*Anguilla anguilla*) from two rivers in southern England. *Parasitology*, 130(6): 679-686.
- ODA, S. & MORISAWA, M. (1993). Rises of intracellular Ca²⁺ and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 25(2): 171-178.
- ODA, S.; IGARASHI, Y.; OHTAKE, H.; SAKAI, K.; SHIMIZU, N.; MORISAWA, M. (1995). Sperm-activating proteins from unfertilized eggs of the Pacific herring, *Clupea pallasii*. *Development, Growth & Differentiation*, 37(3): 257-261.
- OHTA, H.; IKEDA, K.; IZAWA, T. (1997). Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 277(2): 171-180.

- OHTA, H.; KAGAWA, H.; TANAKA, H.; UNUMA, T. (2001). Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture*, 198(3): 339-351.
- OHTAKE, H. (1976). Respiratory behaviour of sea-urchin spermatozoa. II. Sperm-activating substance obtained from jelly coat of sea-urchin eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 198(3): 313-322.
- OKAMURA, A.; YAMADA, A.; TANAKA, S.; HORIE, N.; UTOH, T.; MIKAWA, N.; OKA, H. (2002). Atmospheric depression as the final trigger for the seaward migration of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Marine Ecology-progress Series*, 234: 281-288.
- OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SOEJIMA, A.; MASUDA, H.; SUGITA, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 260(17): 9699-9705.
- 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.
- PEÑARANDA, D. S.; MARCO-JIMÉNEZ, F.; PÉREZ, L.; GALLEGO, V.; MAZZEO, I.; JOVER, M.; ASTURIANO, J. F. (2010a). Protein profile study in European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma and its correlation with sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology*, 26(5): 746-752.
- 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, Zuchthygiene*, 45(3): 407-415.
- PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; TOMÁS, A.; ZEGRARI, S.; BARRERA, R.; ESPINÓS, F. J.; JOVER, M. (2000). Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology*, 57(6): 1488-1504.
- PIIRONEN, J. (1985). Variation in the properties of milt from the Finnish landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture*, 48(3): 337-350.
- PILLAI, M. C.; SHIELDS, T. S.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N. (1993). Isolation and partial characterization of the sperm motility initiation factor from eggs of the pacific herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 265(3): 336-342.
- PUNNETT, T.; MILLER, R. L.; YOO, B. H. (1992). Partial purification and some chemical properties of the sperm chemoattractant from the forcipulate starfish *Pycnopodia helianthoides* (Brandt, 1835). *Journal of Experimental Zoology*, 262(1): 87-96.
- RALT, D.; GOLDENBERG, M.; FETTEROLF, P.; THOMPSON, D.; DOR, J.; MASHIACH, S.; EISENBACH, M. (1991). Sperm attraction to a follicular factor(s) correlates with human egg fertilizability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(7): 2840-2844.

- SCHLEGEL, P.; BINET, M. T.; HAVENHAND, J. N.; DOYLE, C. J.; WILLIAMSON, J. E. (2015). Ocean acidification impacts on sperm mitochondrial membrane potential bring sperm swimming behaviour near its tipping point. *The Journal of Experimental Biology*, 218(7): 1084-1090.
- SHIBA, K.; MÁRIÁN, T.; KRASZNAI, Z.; BABA, S. A.; MORISAWA, M.; YOSHIDA, M. (2006). Na⁺/Ca²⁺ exchanger modulates the flagellar wave pattern for the regulation of motility activation and chemotaxis in the ascidian spermatozoa. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(10): 623-632.
- STONE, R. (2003). Freshwater Eels Are Slip-Sliding Away. *Science*, 302(5643): 221-222.
- STOSS, J. (1983). Fish Gamete Preservation and Spermatozoan Physiology, en *Fish Physiology, Vol IX*. Ed. Academic Press. London: 305-350.
- SINHA, V.R.P. & JONES J.W. (1975). The European Freshwater Eel. Ed. Liverpool University Press. Liverpool. 146 pp.
- SUN, T.; TANG, X.; ZHOU, B.; WANG, Y. (2016). Comparative studies on the effects of seawater acidification caused by CO₂ and HCl enrichment on physiological changes in *Mytilus edulis*. *Chemosphere*, 144: 2368-2376.
- TAKAI, H. & MORISAWA, M. (1995). Change in intracellular K⁺ concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts. *Journal of Cell Science*, 108 (3): 1175-1181.
- TANAKA, S.; UTOH, T.; YAMADA, Y.; HORIE, N.; OKAMURA, A.; AKAZAWA, A.; MIKAWA, N.; OKA, H. P.; KUROKURA, H. (2004). Role of sodium bicarbonate on the initiation of sperm motility in the Japanese eel. *Fisheries Science*, 70(5): 780-787.
- TESCH, F. W. (2003). *The eel*. 5^a Ed. Wiley-Blackwell. Hoboken. 408 pp.
- THOMAS, J. A.; BUCHSBAUM, R. N.; ZIMNIAK, A.; RACKER, E. (1979). Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*, 18(11): 2210-2218.
- TODD, P. R. (1976). Ultrastructure of the spermatozoa and spermiogenesis in New Zealand freshwater eels (Anguillidae). *Cell and Tissue Research*, 171(2): 221-232.
- USUI, A. (1991). *Eel culture*. Ed. Wiley-Blackwell. Hoboken. 160 pp.
- UNIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) 1100/2007 de Consejo, de 18 de septiembre de 2007, por el que se establecen medidas para la recuperación de la población de anguila europea. Diario Oficial de la Unión Europea L 248, 22 de septiembre de 2007, pp 17-23.
- UNIÓN EUROPEA. Directiva (UE) 2010/63 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea L 276, 20 de octubre de 2010, pp 82-128.

- VAN GINNEKEN, V. J. & VAN DEN THILLART, G. E. (2000). Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature*, 403(6766): 156-157.
- 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.
- VANDORPE, D. H.; SMALL, D. L.; DABROWSKI, A. R.; MORRIS, C. E. (1994). FMRFamide and membrane stretch as activators of the *Aplysia* S-channel. *Biophysical Journal*, 66(1): 46-58.
- VÍLCHEZ, M. C.; PLA, D.; GALLEGO, V.; SANZ, L.; PÉREZ, L.; ASTURIANO, J. F.; PEÑARANDA, D. S. (2016a). Identification of the major proteins present in the seminal plasma of European eel, and how hormonal treatment affects their evolution. Correlation with sperm quality. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 201: 37-45.
- VÍLCHEZ, M. C.; MORINI, M.; PEÑARANDA, D. S.; GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F.; PÉREZ, L. (2016b). Sodium affects the sperm motility in the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 198: 51-58.
- VÍLCHEZ, M. C.; MORINI, M.; PEÑARANDA, D. S.; GALLEGO, V.; ASTURIANO, J. F.; PÉREZ, L. (2017). Role of potassium and pH on the initiation of sperm motility in the European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 203: 210-219.
- VINES, C. A.; YOSHIDA, K.; GRIFFIN, F. J.; PILLAI, M. C.; MORISAWA, M.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N. (2002). Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4): 2026-2031.
- WONG, P. Y.; LEE, W. M.; TSANG, A. Y. (1981). The effects of extracellular sodium on acid release and motility initiation in rat caudal epididymal spermatozoa in vitro. *Experimental Cell Research*, 131(1): 97-104.
- WOOLSEY, J. & INGERMANN, R. L. (2003). Acquisition of the potential for sperm motility in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) effect of pH on dynein ATPase. *Fish Physiology and Biochemistry*, 29(1): 47-56.
- YANAGIMACHI, R. (1957). Some Properties of the Sperm-activating Factor in the Micropyle Area of the Herring Egg: *Annotationes zoologicae japonenses*. 30(3): 114-119.
- YANAGIMACHI, R.; CHERR, G. N.; PILLAI, M. C.; BALDWIN, J. D. (1992). Factors Controlling Sperm Entry into the Micropyles of Salmonid and Herring Eggs. *Development, Growth & Differentiation*, 34(4): 447-461.
- YANG, X. C. & SACHS, F. (1993). Nonselective Cation Channels, en: *Mechanically sensitive, nonselective cation channels*. Ed. Birkhäuser Basel. Switzerland: 79-92.

ANEXOS

8. ANEXOS

8.1. Anexo I

Parámetros cinéticos de la motilidad espermática obtenidos en la prueba 4.1: “*Estudio del efecto del pH del medio diluyente en la motilidad espermática*” (Figuras 1 y 2).

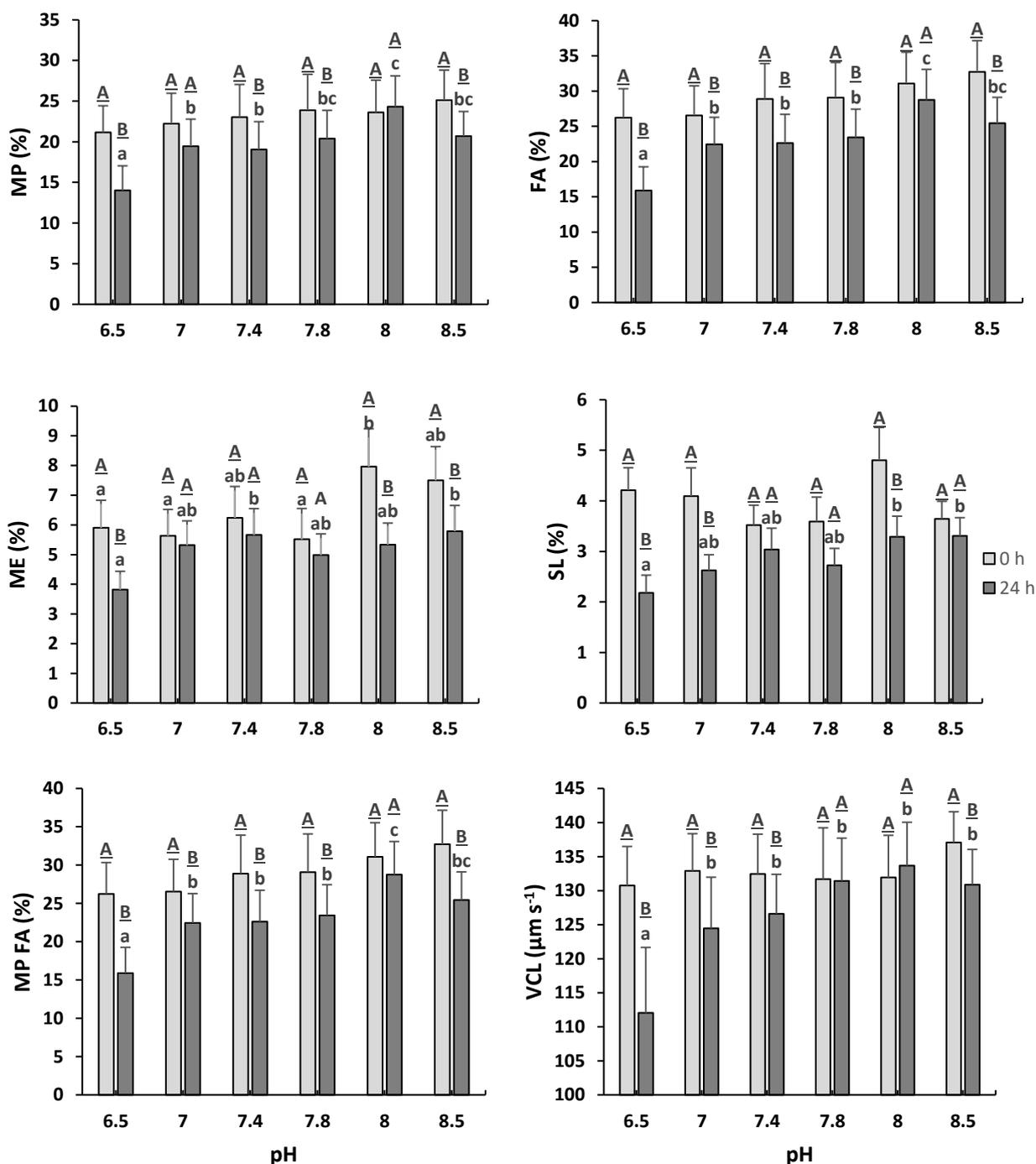


Figura 1. Efecto del pH del medio P1 y del Tiempo sobre los parámetros cinéticos de motilidad espermática MP, FA, ME, SL, MPFA y VCL. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 14). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH (P < 0.05) para un tiempo concreto. Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre los dos tiempos estudiados a un nivel de pH concreto.

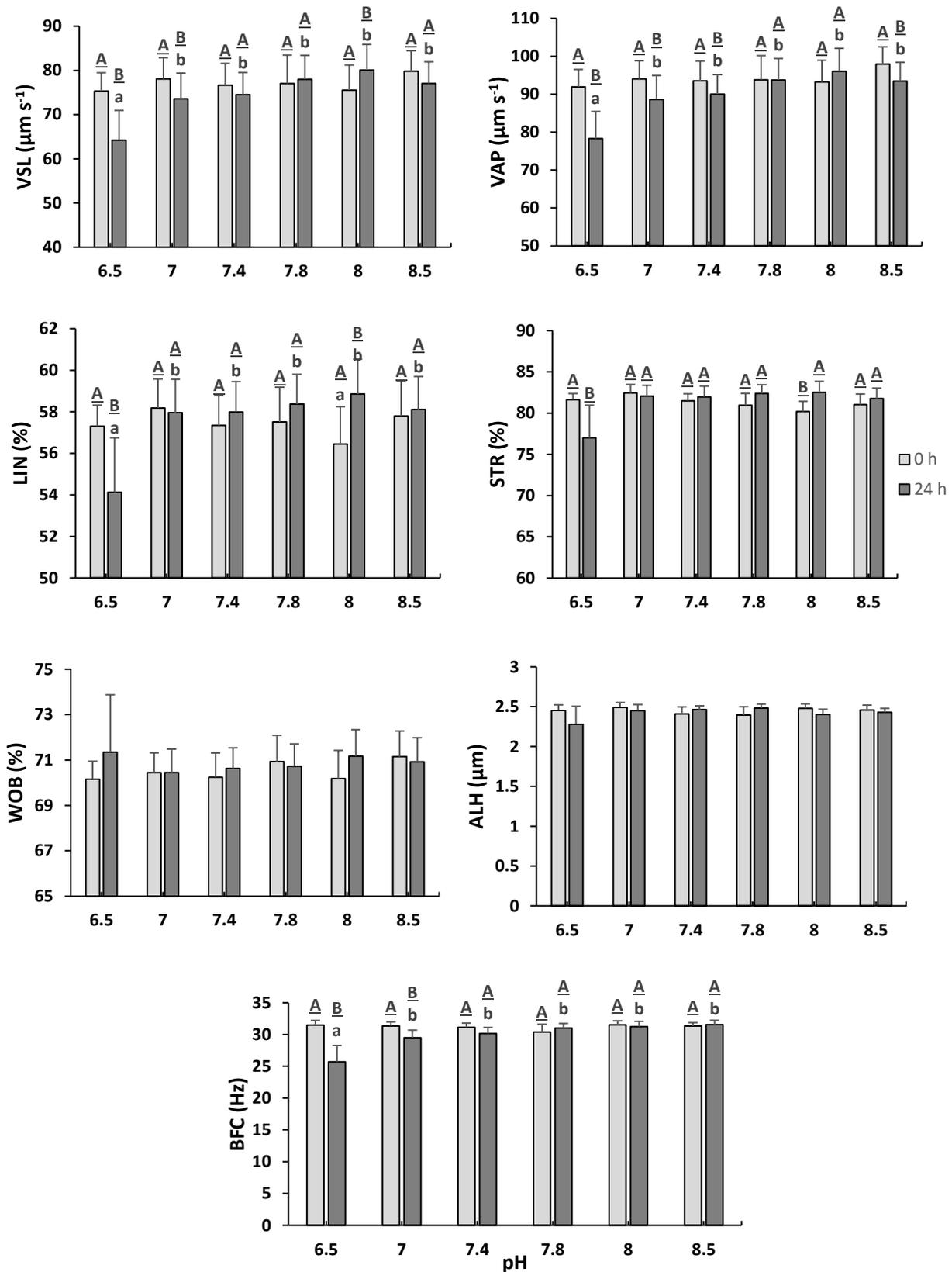


Figura 1. Efecto del pH del medio P1 y del Tiempo sobre los parámetros cinéticos de la motilidad espermática VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BFC. Los datos se expresan como media \pm SEM (n = 14). Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$) para un tiempo concreto. Letras mayúsculas distintas indican diferencias entre los dos tiempos estudiados a un nivel de pH concreto.

8.2. Anexo II

Parámetros cinéticos de la motilidad espermática obtenidos en la prueba 4.3: “Estudio del efecto del pH del medio activador en la motilidad espermática” (Figuras 3 y 4).

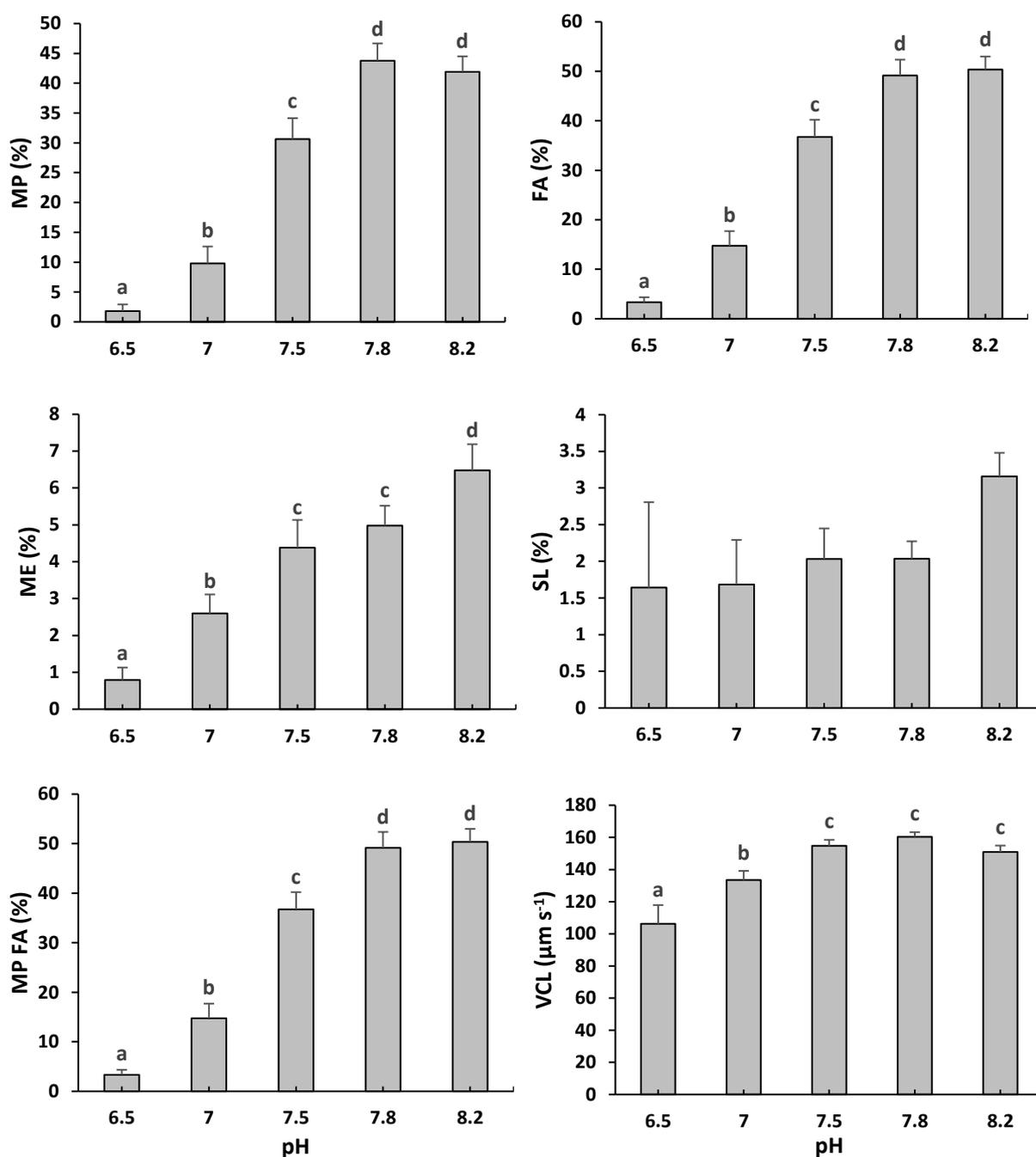


Figura 3. Parámetros cinéticos de motilidad espermática (MP, FA, ME, SL, MPFA, VCL) de las muestras activadas con agua de mar a distintos pH. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$).

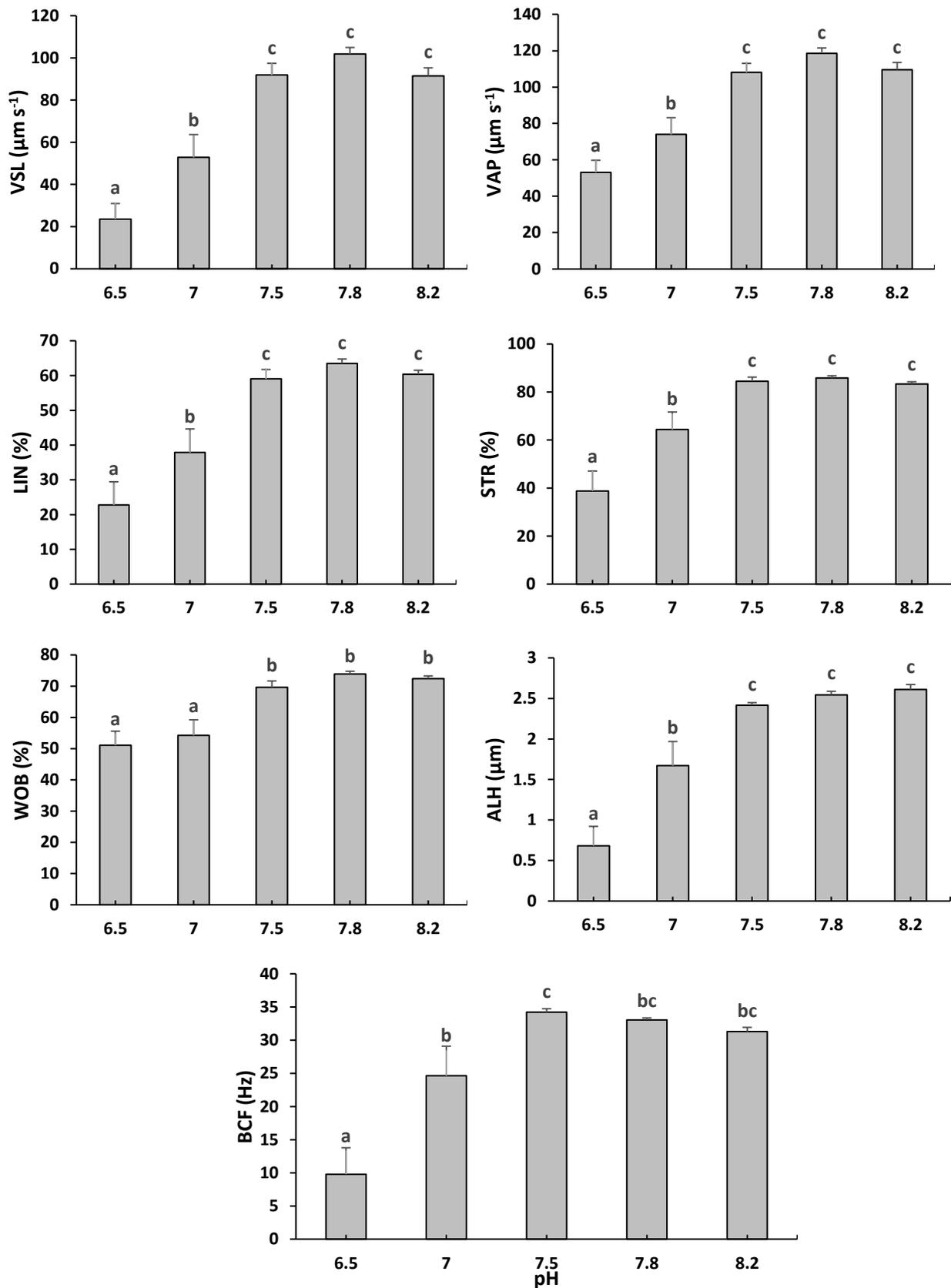


Figura 4. Parámetros cinéticos de motilidad espermática (VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF) de las muestras activadas con agua de mar a distintos pH. Los datos se expresan como media \pm SEM ($n = 10$). Letras distintas indican diferencias significativas entre los diferentes pH ($P < 0.05$).