

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL



**Inducción hormonal de la espermiación y criopreservación de esperma
en anguila europea (*Anguilla anguilla*)**

**Hormonal induction of spermiation and cryopreservation of European eel
(*Anguilla anguilla*) sperm**

TESIS PRESENTADA POR:

Víctor Daniel Ladislao Garzón Cortés

Bajo la dirección de:

Dr. Juan F. Asturiano Nemesio

Dra. Luz Pérez Igualada

Valencia, 2007.

**Inducción hormonal de la espermiación y criopreservación de esperma
en anguila europea (*Anguilla anguilla*)**

**Hormonal induction of spermiation and cryopreservation of European eel
(*Anguilla anguilla*) sperm**

**Esta tesis se presenta como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor
por la Universidad Politécnica de Valencia**

Por:

VÍCTOR DANIEL LADISLAO GARZÓN CORTÉS

Directores de tesis:

Dr. JUAN F. ASTURIANO NEMESIO

Profesor Contratado Doctor
Grupo de Acuicultura y Biodiversidad
Departamento de Ciencia Animal
Universidad Politécnica de Valencia

Dra. LUZ PÉREZ IGUALADA

Profesora Titular de Universidad
Grupo de Acuicultura y Biodiversidad
Departamento de Ciencia Animal
Universidad Politécnica de Valencia

Valencia, 2007

	Pág.
ÍNDICE	1
RESUMEN	5
SUMMARY	7
RESUM	9
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Las anguilas, generalidades	11
1.1.1. La anguicultura	12
1.1.2. Comercio de la anguila	14
1.2. Necesidad de la reproducción en cautividad	14
1.3. El eje cerebro-hipófisis-gónada	15
1.4. Maduración gonadal en anguila	18
1.5. Producción del esperma de anguila	19
1.6. Diluyentes en peces, generalidades	20
1.6.1 Diluyentes utilizados en anguila	21
1.7. Agentes crioprotectores	22
1.8. Criopreservación en peces	25
1.9. Criopreservación de gametos en anguilas	26
1.10. Nuevas técnicas para la evaluación de la calidad espermática	27
1.11. Análisis morfométricos asistidos por ordenador (ASMA)	30
1.12. Sistema de análisis de esperma asistido por ordenador CASA	31
1.13. Tinciones vitales. Generalidades	32
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Estabulación de las anguilas	37
3.1.1. Tratamientos hormonales	39
3.2. Extracción de esperma	39
3.3. Estimación de la movilidad de los espermatozoides post-activación	40
3.4. Configuración de los <i>pools</i> para los experimentos	41
3.5. Métodos de criopreservación y descongelación	41
3.6. Análisis de tinciones vitales (Hoechst)	42
3.7. Análisis de la morfometría espermática	43
3.8. Medición de la movilidad espermática por CASA	44
3.9. Reactivos utilizados en los artículos adjuntos a esta memoria	44
3.9.1. Medio de activación	44
3.9.2. Diluyentes	45

	Índice
3.9.3. Medios de congelación	45
3.9.4. Crioprotectores utilizados	45
3.10. Análisis estadístico	46
IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	47
4.1. Experimento I	47
4.1.1. Resultados	48
4.2. Experimento II	49
4.2.1. Resultados	50
4.3. Experimento III	51
4.3.1. Resultados	52
V. Experimento I, artículo 1. Effect of different methods for induction of spermiation on semen quality	53
VI. Experimento II, artículo 2. Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm	61
VII. Experimento III, artículo 3. Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and FBS on the cryopreservation of European eel sperm	73
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	81
IX. CONCLUSIONES GENERALES	91
X. BIBLIOGRAFÍA	93
XI. AGRADECIMIENTOS	105
XII. DISEMINACIÓN DE RESULTADOS Y OTRAS PUBLICACIONES	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº Figura		Pág.
1	Producción mundial de anguilas 1950-2004 acuicultura y pesca (FAO, 2006)	13
2	Imagen de espermatozoides de anguila europea obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Fuente: Marco-Jiménez <i>et al.</i> (2006b)	29
3	Acuarios de anguilas, Laboratorio de Acuicultura Universidad Politécnica de Valencia.	37
4	Materiales para la colocación de los microchips	38
5	Colocación de microchips en una anguila	38
6	Masaje abdominal y extracción de semen	39
7	Bomba de absorción de semen	40
8	Llenado de pajuelas con esperma	42
9	Sellado de pajuelas con las muestras y primera fase de congelación	42
10	Microscopio Nikon Eclipse E-400 con videocámara Sony CCD-IRIS	43

ÍNDICE DE TABLAS

Nº Tabla		Pág.
1	Distribución de la producción de anguilas para Europa, China y Japón y su relación con España, años 2000-2004 (datos FAO, 2006)	13
2	Importación de anguilas por Japón en 1998 (www.ibpcosaka.org.jp)	14
3	Valores morfométricos de espermatozoides de anguila europea (<i>A. anguilla</i>) y anguila japonesa (<i>A. japonica</i>)	30
4	Parámetros morfológicos de espermatozoides de anguila europea, analizados por el sistema computarizado de análisis morfológico (ASMA) y microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis por imagen	31
5	Medio de activación agua de mar artificial concentración (en mM)	44
6	Composición química de los diluyentes K15 y K30	45
7	Composición química de los diferentes medios de congelación	45

RESUMEN

La producción de anguilas se basa en la captura de angulas, pero la captura de éstas no se ha podido incrementar al mismo ritmo que su demanda para el engorde en piscifactorías. La caída de las capturas de angulas llevó a la búsqueda por todo el mundo de nuevos suministros, planteándose la reproducción en cautividad como una de las alternativas de mayor importancia.

Debido a que las anguilas no maduran sexualmente en cautividad se han desarrollado métodos de inducción hormonal que logran la producción de volúmenes importantes de esperma de buena calidad (Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2004; Müller *et al.* 2004). Este hecho ha motivado el interés por desarrollar técnicas para la recolección y manejo apropiado del esperma de esta especie. En este sentido se decidió realizar una serie de experimentos con la finalidad de desarrollar técnicas de congelación y estudios sobre la calidad del esperma de anguila europea.

El primero de ellos trató de optimizar los tratamientos de inducción hormonal en machos de anguila europea (procedentes de piscifactoría) para obtención de esperma. Fueron probados cinco tratamientos hormonales (A-E) con gonadotropina coriónica humana (hCG) para inducir la maduración gonadal y la espermiación en machos de anguilas procedentes de piscifactoría. Se vio que una dosis semanal de 1.5 UI hCG/g pez, es la que permite obtener un mayor porcentaje de machos espermiantes, un periodo de espermiación más largo y un mayor volumen de esperma.

A continuación se estudiaron protocolos de criopreservación utilizando como base medios diluyentes descritos para anguila japonesa (K15, K30, TNK) y dos descritos anteriormente para anguila europea (P1 y P2). A los espermatozoides congelados en estos medios se les realizaron análisis de movilidad (pre y postcongelación): la velocidad angular (VAP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad de línea directa (VSL) y frecuencia de batido del flagelo (BCF). Estos parámetros se analizaron con un programa informático para análisis de esperma (CASA). Los espermatozoides congelados en los medios de congelación TNK y P1, conteniendo dimetilsulfóxido (DMSO) y lecitina, mostraron los mayores resultados de supervivencia post-congelación.

Una vez definido el diluyente de mejores características se procedió a probar una batería de crioprotectores (DMSO, acetamida, etilenglicol, propanol, glicerol y metanol) con la finalidad de definir el mejor para anguila europea. Al mismo tiempo se estudió el efecto de la adición de suero fetal bovino (FBS) a los medios de congelación, y del factor de dilución esperma:medio de congelación. El efecto de estos factores se evaluó mediante la comparación pre y post-congelación del porcentaje de células móviles, porcentaje de células vivas y de su morfometría. Cada mezcla contenía 75 µl de crioprotector, 425 µl medio P1 y 250 µl de esperma en una relación de 1:2 (v/v).

El mejor resultado global se logró con DMSO mezclado en P1 modificado, conteniendo FBS como diluyente, dando como resultado un incremento significativo del porcentaje de movilidad espermática post-congelación.

SUMMARY

The production of eels is based on the capture of elvers, but the captures have not been increased so fast as the demand from the fish farms. The fall of the capture of elvers led to the search all over the world of new sources of supply, making of the reproduction in captivity one of the most important alternatives.

Due to the fact that the eels do not mature sexually in captivity there have been developed methods for the hormonal induction that achieve the production of important volumes of sperm of good quality (Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2004; Müller *et al.* 2004). This fact has motivated the interest to develop techniques for the compilation and appropriate managing of the sperm of this species. In this regard we decided to carry out a series of experiments with the purpose of developing freezing technologies and studies on the quality of the European eel sperm.

First experiment tried to optimize the treatments of hormonal induction of European eel males to obtain sperm. Five hormonal treatments with human chorionic gonadotropin (hCG) were assayed to induce the gonad maturation and the spermiation in eel males proceeding from fish farm. Treatment A, consisting in weekly doses of 1.5 IU hCG/g fish induced the highest percentage of spermiating males, a longer period of spermiation and a higher volume of sperm.

Secondly, cryopreservation protocols were studied using as a base extenders described for Japanese eel (K15, K30, TNK) and two more previously described for European eel (P1 and P2). Different motility analyses were carried out (pre and postcryopreservation) in the sperm samples frozen with these media: straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), angular velocity (VAP), and spermatozoa beating cross frequency (BCF). The evaluation of these parameters was performed by computer-assisted sperm evaluation analysis (CASA). Sperm frozen in the freezing media TNK and P1, containing dimethylsulphoxide (DMSO) and lecithin, showed the best results on post-cryopreservation survival.

Once defined the extender with the best characteristics, several cryoprotectants were assayed (DMSO, acetamide, ethilenglycol, propanol, glycerol and methanol) with the purpose of defining the best for the European eel sperm. At the same time we evaluated the effect of the addition of foetal bovine serum (FBS) to the freezing media, as well as the sperm:freezing media dilution factor. The effect of these factors was

evaluated by means of the comparison pre and post-cryopreservation of the percentage of mobile cells, the percentage of alive cells and its morphometry. Every mixture was formed by 75 µl of cryoprotectant, 425 µl extender P1 and 250 µl of sperm for a total volume of 750µl in relation 1:2 (v/v).

The best global result was obtained with DMSO mixed in P1 modified as extender, containing FBS, resulting in a significant increase of the sperm mobility percentage post-freezing.

RESUM

La producció d'anguiles es basa en la captura d'anguiles, però la captura d'aquestes no s'ha pogut incrementar al mateix ritme que la seva demanda per a l'engreixi en piscifactories. La caiguda de les captures d'anguiles va dur a la recerca per tot el món de nous subministraments, plantejant-se la reproducció en cautivitat com una de les alternatives de major importància. Degut al fet que les anguiles no maduren sexualment en cautivitat s'han desenvolupat mètodes d'inducció hormonal per a aconseguir-ho. En el cas dels mascles, s'assolisen volums importants d'esperma, següent a més de bona qualitat (Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2004; Müller *et al.* 2004). Aquest fet, ha motivat l'interès per desenvolupar tècniques per a la recol·lecció i maneig apropiat de l'esperma en aquesta espècie. Volguent aprofundir més, es va decidir realitzar una sèrie d'experiments amb la finalitat de desenvolupar tècniques de congelació i estudis sobre la qualitat de l'esperma en anguila europea.

El la primera prova es tractà d'optimitzar els tractaments d'inducció hormonal en mascles d'anguila europea (obtinguts en piscifactoria) per a l'obtenció d'esperma. Van ser provats sis tractaments (A-F) empleant l'hormona gonadotropina coriònica humana (hCG) per a induir la maduració gonadal i l'espermació en mascles. El resultats mostraren que el tractament A, amb una dosi setmanal de 1.5 UI hCG/g peix, és el que permet obtenir un major percentatge de mascles espermiants, a més d'un període de espermiació més llarg i un major volum espermàtic.

A continuació es van estudiar protocols de criopreservació utilitzant com a base els diluents descrits per a anguila japonesa (K15, K30, TNK) i dues descrits anteriorment per a anguila europea (P1 i P2). Als espermatozoids congelats en aquests medis se'ls van realitzar un estudi, mitjançant un programa informàtic d'anàlisi d'imatges (CASA), i d'aquesta manera aconseguir caracteritzar el seu moviment espermàtic (tant pre com postcongelació) basant-se en: la velocitat angular (VAP), velocitat curvilínia (VCL), velocitat de línia (VSL) i freqüència de batut del flagel (BCF). Atenent a la supervivència postcongelació, els espermatozoids crioconservats amb els diluents TNK i P1, contenint en el mig de congelació DMSO i lecitina, van mostrar el major percentatge de cèl·lules vives.

Una vegada decidit que el diluent P1 presenta les millors condicions per a portar a cap la criopreservació, es va procedir a provar una bateria de crioprotectors (dimetilsulfòxid, acetamida, etilenglicol, propanol, glicerol i metanol) amb la finalitat de

definir quin era el millor per a l'anguila europea. Al mateix temps es va estudiar l'efecte de l'adició de sèrum fetal boví (SFB) i del factor de dilució espermàtic als medis de congelació. Amb les diferents variants, es van avaluar diferents paràmetres espermàtics: com el percentatge de cèl·lules mòbils, i cèl·lules vives, a més de la morfometria del cap del espermatozoid, tant pre com postcongelació. El millor resultat es va assolir amb DMSO, com a crioprotector, i un factor de dilució espermàtic en el medi de congelació de 1:2 (v/v).

Finalment amb les millors condicions establides en els experiments anteriors: adició de SFB, un factor de dilució 1:2 i DMSO com el millor crioprotector, es va intentar millorar la congelació modificant la composició del diluent, i en concret augmentant la concentració del bicarbonat. Assolint-se d'aquesta manera una milloria significativa em la motilitat postcongelació.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Las anguilas, generalidades

La anguila europea pertenece al orden de los anguiliformes, familia *Anguillidae* y género *Anguilla*. Es una especie catádroma que realiza grandes migraciones reproductivas entre el río y el mar. Este pez posee una forma serpentiforme y un cuerpo muy viscoso. Las aletas pectorales son pequeñas y de contorno circular, y no posee aletas pélvicas. La mandíbula inferior es prominente, y posee ojos pequeños que aumentan de tamaño a medida que alcanzan la madurez sexual, que se produce entre los 6-12 años en los machos y entre los 8-13 años en las hembras. Su alimentación en los ríos es carnívora (<http://www.mapya.es/jacumar/2004>).

En el mundo existen 19 especies de anguilas. Se diferencian en caracteres morfométricos, así como en características genéticas. De ellas, cuatro especies son las más consumidas y producidas en acuicultura (Pérez *et al.* 2004):

- Anguila europea (*Anguilla anguilla*). Distribuida por el Mediterráneo y Atlántico, desde Marruecos hasta la península Escandinava
- Anguila japonesa (*Anguilla japonica*). Presente en aguas de Japón, China, Taiwán, Corea y Malasia
- Anguila americana (*Anguilla rostrata*). Propia de la costa atlántica de Norteamérica
- Anguila australiana (*Anguilla australis*). Presente en las aguas de Australia y Nueva Zelanda

Además de estas 4, al menos 8 especies más han sido utilizadas en la acuicultura en Japón, como *Anguilla marmorata* (procedente de Japón), *A. dieffenbachi* (de Australia y Nueva Zelanda), *A. celebensis*, *A. bicolor bicolor* y *A. bicolor pacífica* (procedentes de Filipinas e Indonesia), entre otras (Gousset, 1992).

La migración y reproducción natural de las anguilas de agua dulce fue un misterio hasta el siglo XX cuando se descubrió su área de desove en el Mar de los Sargazos, entre las Bermudas y Puerto Rico. Cuando la anguila europea y la americana, muy similares entre sí, alcanzan la madurez en lagos y corrientes de agua dulce, siguen el curso de los ríos y arroyos hasta llegar al océano, donde nadan hasta llegar al Mar de los Sargazos. Allí se supone que desovan en aguas profundas, entre 200 y 500 m de

profundidad. Las larvas, llamadas leptocéfalos son arrastradas por la corriente del Golfo y tardan aproximadamente un año en llegar a Europa. Cuando consiguen alcanzar la costa, se han convertido ya en angulas y se concentran en la desembocadura de los ríos. Las angulas nadan río arriba y se alimentan de animales de los fondos de los ríos y los lagos hasta que se convierten en adultos.

Una serie de cambios drásticos ocurren durante el periodo adulto. Las anguilas atraviesan un número de cambios morfológicos y fisiológicos que las prepararán para su migración oceánica. Uno de los signos de madurez sexual que acompañan a la migración marina es el cambio de color; su color dorsal cambia desde verdoso a negro, y el color ventral desde amarillo a plateado.

Los cambios son tanto internos como externos y son los indicadores de la madurez de los animales y del inicio de su migración reproductiva. Durante la migración las anguilas dejan de alimentarse (Fricke y Kaese 1995; Tesch 2003), su tracto digestivo se retrae, la estructura y metabolismo del hígado cambian (Hara *et al.* 1980), así como la composición de los músculos, observándose un incremento en la tonificación de las fibras para el lento viaje y un aumento de la proporción de músculo rojo, lo que indica un incremento en la capacidad aeróbica y en la resistencia, que le permitirá culminar su viaje de reproducción al mar de los Sargazos (Ellerby *et al.* 2001; Vettier *et al.* 2005). Se ha comprobado que la migración supone un gran desgaste debido a las elevadas presiones hidrostáticas a las que se ven sometidas durante la misma, en la que recorren cerca de 6000 Km (Vettier *et al.* 2005; Amerand *et al.* 2006).

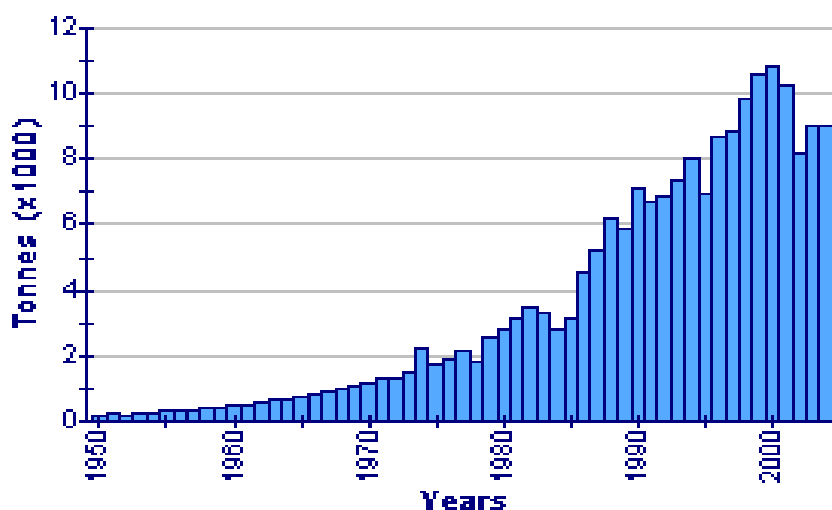
1.1.1. La anguicultura

La piscicultura de anguilas se practica principalmente en Asia y en Europa. Actualmente el principal productor mundial es China, con una producción total de 178.176 T en 2004 (FAO, 2006). En la tabla 1 se muestran los datos correspondientes a la producción de anguilas en Europa, China y Japón, así como en España en el periodo de 2000 a 2004 (FAO, 2006). En 2002, los tres primeros países europeos en producción de anguilas cultivadas eran Países Bajos, Italia y Dinamarca (FAO, 2004). A partir de esta fecha, se han integrado nuevos países como Grecia, Suecia, Suiza, Polonia, Reino Unido, Francia y Alemania con producciones que están entre 100 y 500 T/año, así como otros países con menores producciones, como Argelia, Hungría, Macedonia y Marruecos.

Tabla 1. Distribución de la producción de anguilas para Europa, China y Japón y su relación con España, años 2000-2004 **en toneladas** (datos FAO, 2006).

Área	Especie de anguila	2000	2001	2002	2003	2004
China	Japonesa	160 740	15 5781	163 847	161 299	178 176
Japón	Japonesa	24 118	23 123	21112	21 742	21 776
Europa	Europea	10 389	9 929	7901	8 659	8 659
España	Europea	411	339	554	292	363
Total		195 244	188 833	192 860	191 700	208 611

Este aumento de países productores no es síntoma de aumento en la cantidad comercializada de anguila europea (Figura 1), ya que la producción global, ha tenido un descenso significativo en casi todos los países. Esto es debido, principalmente a la disminución de las poblaciones salvajes de las cuales se abastecen las piscifactorías en la actualidad.

**Figura 1.** Producción mundial de anguilas 1950-2004 acuicultura y pesca (<http://www.fao.org/fi>)

La producción de anguila en España en el año 2000 fue de 109 T/año en piscifactorías mientras que las capturas alcanzaron 302 T (FAO, 2006). A pesar de que la producción es rentable, en España no se ha producido el rápido desarrollo de la producción de anguila que se ha observado en otros países europeos. En países como el Reino Unido, se producen un total de 504 T (FAO, 2006).

1.1.2. Comercio de la anguila

Las anguilas normalmente son vendidas en dos gamas de tamaño de 120-180 g, que es el tamaño normal holandés, o de 300-600 g (el tamaño grande) en Alemania. Las formas de consumo son diversas, pero el producto más valorado en todo el mundo es la especialidad japonesa *kabayaki*, donde se consumen anguilas alrededor de 150-200 g. Más del 90 por ciento de todas las anguilas producidas en Japón, (alrededor de 21.112 T año) se destinan a esta forma de consumo (FAO, 2004). El mercado japonés consume más de 110.000 toneladas de anguilas en un año. Los mercados de *kabayaki* compran anguilas de Australia y de otras partes de Asia y Europa con el fin de cubrir su elevada demanda (www.dpi.qld.gov.au/fishweb/; Usui, 1991).

1.2. Necesidad de la producción en cautividad

La producción de anguilas se basa en la captura de angulas, pero la captura de angulas no se ha podido incrementar al mismo ritmo que su demanda para el engorde en piscifactorías. La caída de las capturas de angulas en Japón, llevó a la búsqueda por todo el mundo de suministros, y a las importaciones crecientes de angulas japonesas desde China, Corea y Taiwán, de angulas americanas y de angulas europeas (Tabla 2). Además de este incremento en la demanda (sobre todo de anguila europea), otros factores han incidido en el descenso de las poblaciones europeas (Feunteun, 2002) como el deterioro de su hábitat natural y la importación de parásitos alóctonos desde especies asiáticas (Koops y Hartmann, 1989; Kennedy y Fitch, 1990).

Tabla 2. Importación de anguilas por Japón en 1998 en toneladas (www.ibpcosaka.org.jp).

Origen	Anguila viva(T)	Anguila procesada(T)
Taiwán	14 069	5 566
China	7 978	76 746
Hong Kong	4 542	
Malasia	861	1 645
Otros	176	764

Los datos obtenidos por otras fuentes indican que entre el 50 y 60% de la angula capturada en Europa se destina a la acuicultura asiática (Nielsen, 1998; ICES, 2001). El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación Español (2004) señala que la exportación masiva de angula europea a los países asiáticos se realiza con métodos inadecuados, que suponen pérdidas en el transporte de hasta el 50% de los ejemplares. Además, las capturas de angulas son cada vez más escasas y, por tanto, más caras y de igual manera informa de la caída en la producción de anguila en piscifactoría. En Japón, el coste de las angulas ha alcanzado algunos años hasta el 50% de los costes de producción total (Lee *et al.* 2003).

Por otro lado, existe un gran interés en esta especie desde un punto de vista ambiental, recientemente el ICES (2006) ha publicado un detallado informe que alerta sobre el estado de las poblaciones naturales hablando de mínimos históricos en sus poblaciones. Queda de manifiesto el descenso de ejemplares e incluso la probabilidad de desaparición de poblaciones enteras de anguila europea, por lo cual el conocimiento de los mecanismos que regulan la función reproductora de esta especie es un requisito indispensable para el desarrollo de la cría y reproducción de la anguila en cautividad. Una vez adquiridos los conocimientos necesarios sobre el proceso reproductor y su regulación, es posible controlar en cierta medida las distintas etapas de la reproducción.

1.3. El eje cerebro-hipófisis-gónada

El punto de partida en la inducción de la maduración de las gónadas y posterior desove, se ha estudiado partiendo del comportamiento de los esteroides sexuales durante la gametogénesis, maduración gonadal y su relación con las variables medioambientales, principalmente en peces de agua dulce, particularmente en salmónidos y ciprínidos (Blythe *et al.* 1994; Rana, 1995; Susquet *et al.* 2000; Medina *et al.* 2005).

Desde el punto de vista neuronal se ha podido ver que el sistema nervioso central desempeña un papel relevante en el control de la reproducción en dos aspectos fundamentales: en primer lugar es el encargado de integrar las señales externas (luz, temperatura, salinidad, nutrientes, factores sociales, etc.) e internas (hormonales) y, en segundo lugar, debe transmitir las señales a los efectores endocrinos, a través de una acción moduladora sobre la actividad de la hipófisis. Existen numerosos estudios

sobre los mecanismos centrales de control de la reproducción de peces teleósteos, tanto en sus aspectos fisiológicos como anatómicos (Peter *et al.* 1991; Kah *et al.* 1993; Trudeau, 1997). Los estímulos sociales (presencia de otros individuos, densidad de población, proporción de sexos, etc.) y ambientales (temperatura, fotoperiodo, salinidad, nutrientes, etc.) son captados por sistemas sensoriales específicos y transmitidos al sistema nervioso central (SNC). Este sistema responde por medio de circuitos neuronales precisos, mediante la liberación de determinadas neurohormonas que regulan la actividad de la hipófisis. Estas neurohormonas llegan a la hipófisis a través de una inervación más o menos directa de las células del lóbulo anterior adenohipofisario. La hipófisis, en respuesta a estos factores neuroendocrinos, sintetiza y secreta gonadotrofinas, que regulan a su vez diferentes aspectos del desarrollo, el crecimiento y la esteroidogénesis gonadal, así como otros procesos implicados en la reproducción.

La hipófisis desempeña un papel crucial en el control del proceso reproductivo, ya que sintetiza y secreta las gonadotrofinas, unas hormonas de naturaleza glicoproteica que dirigen el desarrollo gametogénico y la secreción de esteroides en las gónadas. En tetrápodos, las gonadotrofinas están representadas por dos moléculas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH), a las que hay que añadir en mamíferos una tercera gonadotrofina de origen placentario o gonadotrofina coriónica (GC).

Se ha demostrado la existencia de estas dos gonadotrofinas, FSH y LH, previamente llamadas GTH I y II en numerosos grupos de peces teleósteos. Así, a partir de 1986, se han identificado dos gonadotrofinas diferentes en anguiliformes (*Anguilla japonica*), salmoniformes (*Oncorhynchus keta*, *O. rhodurus* y *O. kisutch*, *O. mikiss*, *O. tshawytscha*), cipríniformes y ciprinodóntiformes (*Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idell*, *Fundulus heteroclitus*), gasterosteoiformes (*Gasterosteus aculeatus*), perciformes (*Micropogonias undulatus*, *Katsuwonus pelamis*, *Thunnus obesus*, *Sparus aurata*, *Seriola dumerilii*, *Dicentrarchus labrax*) o pleuronectiformes (*Paralichthys olivaceus*, *Hippoglossus hippoglossus*) (Suzuki *et al.* 1988, Yu y Shen, 1989; Swanson, 1991; Lin *et al.*, 1991; Koide *et al.*, 1993; Copeland y Thomas, 1993; Okada, 1994; García-Hernández *et al.*, 1994; Elizur *et al.*, 1996; Kajimura *et al.*, 2001; Mateos *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003; Weltzien *et al.*, 2003; Hellqvist *et al.*, 2004).

En los salmónidos se sabe que la FSH, antes llamada GTH I, regula la vitelogénesis y la espermatogénesis, mientras que la LH (antes GTH II) regula la maduración final de los oocitos y la espermiación (Swanson, 1991).

Estas dos hormonas son heterodímeros; están constituidas por dos subunidades, alfa y beta. La subunidad alfa (GP_{alfa}) es común a las dos, mientras que difieren en la subunidad beta, lo que les confiere propiedades biológicas específicas (Pierce y Parsons, 1981).

Se sabe que la gametogénesis en el ovario y el testículo de los teleósteos dependen de la acción de las gonadotropinas. Esta acción está mediada por la unión de las mismas a receptores situados en la membrana de ciertas células de las gónadas e implica la activación de la ruta de síntesis y secreción de diferentes esteroides sexuales. Así, tanto los ovarios como los testículos de teleósteos son capaces de producir varios tipos de esteroides (estrógenos o esteroides C18, andrógenos o esteroides C19 y progestinas o esteroides C21) según el momento del ciclo y en respuesta a cada tipo de gonadotropina. Los esteroides son capaces de actuar sobre el hígado, sobre la propia gónada, sobre la hipófisis y el cerebro en un circuito de retroalimentación (Nagahama, 1994).

Las gonadoliberinas (GnRHs) constituyen una familia de moléculas peptídicas cerebrales cuya naturaleza y diversidad está bastante estudiada en peces teleósteos, ya que representan el principal factor liberador de las gonadotropinas hipofisarias (Breton *et al.* 1972; King y Millard, 1982; Sherwood *et al.* 1993; Lethimonier *et al.* 2004). Las GnRHs, producidas en neuronas presentes en diferentes áreas del cerebro, acceden a la hipófisis de los teleósteos a través de las citadas conexiones neuronales directas. Su interacción con receptores específicos, situados en la membrana de las células gonadotropas y acoplados a diversos sistemas de segundos mensajeros, estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Hazum y Conn, 1988; Chang *et al.*, 2000).

No obstante, la actividad hipofisaria no sólo está regulada por las GnRHs, sino que existen otros factores cerebrales que estimulan o inhiben esta actividad (Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993; Trudeau, 1997; Yaron *et al.*, 2003). Se ha descrito la existencia de un factor inhibidor de la liberación de gonadotropinas, que se ha identificado como la dopamina, y de otras moléculas que intervienen en esta regulación, como ciertos neuropéptidos (péptidos opioides, neuropéptido Y, galanina, colecistoquinina, polipéptido activador de la adenil ciclasa de pituitaria o PACAP), monoaminas (noradrenalina, serotonina) y aminoácidos neurotransmisores (ácido γ -aminobutírico o GABA, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina).

1.4. Maduración gonadal en anguilas

Las anguilas no maduran sexualmente en cautividad. En las hembras de anguila japonesa se ha conseguido en repetidas ocasiones inducir la maduración completa y puesta de los oocitos con diversos protocolos de tratamiento hormonal como inyecciones de extracto de hipófisis de salmón y una dosis final de 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) (Ohta *et al.* 1996; Kagawa *et al.* 1997,1998) o implantes hormonales (17- α -metil-testosterona, androstenediona, estradiol) (Lin *et al.* 1991).

En el caso de las hembras de anguila americana (*A. rostrata*) se han empleado con éxito tratamientos basados en la administración de extractos de hipófisis de salmón, y también de carpa, combinados con gonadotropina coriónica humana (hCG), sirviendo la dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) como esteroide inductor de la maduración o MIS (Sorensen y Winn, 1984). Sin embargo, tras la fecundación los huevos detienen su desarrollo en la fase de gástrula.

Los primeros estudios para obtener gametos sexuales maduros de anguila europea se realizaron en Francia en 1937. En 1964 el grupo de Fontaine obtuvo por primera vez productos sexuales maduros a partir de hembras tratadas con extracto de pituitaria de carpa, aunque no se realizaron ensayos de fecundación artificial. Desde entonces, cabe destacar algunos estudios como el de Boetiüs y Boetiüs (1980), que obtuvieron óvulos maduros con un tratamiento a base de inyecciones bisemanales de hipófisis de carpa y hCG. Estos autores lograron inducir la puesta en 5 de 21 hembras con no muy buenos resultados en cuanto al desarrollo embrionario, al lograr un desarrollo máximo de estadio gástrula después de 20 h. Más recientemente en el estudio de Asturiano *et al.* (2002a) se aplicó un tratamiento consistente en inyecciones semanales de extracto de hipófisis de salmón y hCG en hembras salvajes de anguila europea, utilizando por primera vez en la especie el 17,20 β P como MIS para inducir la puesta de forma controlada.

Pedersen (2003 y 2004), Müller *et al.* (2004) y Palstra (2006), han utilizado tratamientos hormonales similares logrando puestas abundantes, pero con un regular nivel de desarrollo tras la fertilización, siendo el trabajo de Pedersen (2004) el que más lejos ha llegado en anguila europea, al obtener algunas larvas vivas durante dos días.

La inducción de la maduración y producción de esperma en machos de anguila se ha realizado en numerosas ocasiones utilizando inyecciones de hCG con diversas dosis e

intervalos de tratamiento, en anguila japonesa. Ohta y Tanaka (1997) mostraron que se obtenían mejores resultados utilizando inyecciones semanales con menores dosis (1 UI/g peso pez ó 250-300 UI/pez); en este caso los peces comenzaban a producir esperma a partir de la quinta o sexta semana de tratamiento.

En los machos de anguila europea la espermiación también se obtiene empleando inyecciones de hCG. Aunque se han ensayado diversas dosis e intervalos de tratamiento (Boetiüs y Boetiüs, 1967), un tratamiento sencillo que se ha aplicado con éxito en diversas ocasiones es el uso de inyecciones semanales de 1,5 UI/g pez, el cual permite, después de 5-6 semanas obtener esperma de las anguilas por masaje abdominal (Amin, 1997; Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2004a y 2004b).

Se han desarrollado métodos de inducción hormonal que logran la producción de volúmenes importantes de esperma de buena calidad (Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2004a; Asturiano *et al.* 2004b; Müller *et al.* 2004). Este hecho ha motivado el interés por desarrollar técnicas para la conservación y manejo apropiado del esperma de esta especie.

1.5. Producción del esperma de anguila

La producción de semen de la anguila japonesa se ha intentado durante muchos años, y, aunque se ha logrado obtener semen, la calidad y cantidad de éste es muy variable (Ohta *et al.* 1996; Tanaka *et al.* 2002a). De igual modo sucede con la anguila europea, especie en la que estos procesos resultan igualmente complejos por lo cual no se han desarrollado protocolos óptimos (Asturiano *et al.* 2003; Müller *et al.* 2004).

Estudios realizados en anguila japonesa, utilizando inyecciones de hCG, con diversas dosis e intervalos de tratamiento mostraron que se obtenían mejores resultados utilizando inyecciones semanales a bajas dosis (1 UI/g pez ó 250-300UI/pez); en este caso los peces comenzaban a producir esperma a partir de la quinta-sexta semana de tratamiento (Ohta y Tanaka, 1997), aunque se han logrado espermiaciones con una sola inyección a dosis elevadas (Miura *et al.* 1991; Ohta y Tanaka, 1997).

En machos de anguila europea, la espermiación también se obtiene empleando inyecciones de hCG. Aunque se han ensayado diversas dosis e intervalos de tratamiento (Boetiüs, 1967; Dollerup y Graver, 1985), un tratamiento que se ha

utilizado con éxito es inyectar 1.5 UI hCG/g pez semanalmente. Tras 5-6 semanas se puede obtener espermatozoides por masaje abdominal (Amin, 1997; Pérez *et al.* 2000).

En el presente trabajo, para la obtención del semen de anguila europea se siguen las técnicas propuestas por Ohta *et al.* (1996), y la técnica descrita por Pérez *et al.* (2000).

Una vez obtenido el semen, se almacena en contenedores que faciliten su manejo y transporte y que garanticen la conservación, con suficiente oxigenación, hasta su uso en el laboratorio. El semen debe ser utilizado tan pronto como sea posible para evitar contaminaciones o pérdidas de calidad (Rana, 1995).

El resultado de la criopreservación depende de la calidad del semen extraído (estructura y crio-resistencia de los espermatozoides), así como de la composición físico-química del plasma seminal ya que el plasma presenta una alta variabilidad entre especies e individuos (Rana, 1995; Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2001 y 2004a).

1.6. Diluyentes en peces, generalidades

Los diluyentes utilizados en peces han sido formulados simulando la composición y osmolaridad del plasma seminal de cada especie, con el propósito de no activar su movilidad, ya que soluciones no isosmóticas conducen a cambios iónicos produciendo la activación espermática (Medina *et al.* 2005).

El uso de diluyentes, supone la estandarización de las condiciones físico-químicas del medio durante el almacenaje. Los diluyentes además pueden constituir la base de los medios para la crioconservación del espermatozoides (Billard 1978; Ohta e Izawa 1996; Tanaka *et al.* 2002a; Müller *et al.* 2004).

Muchos diluyentes utilizados en peces marinos son soluciones salinas (1-10%) o de azúcar (5-10%) (Susquet, 2000). Estas soluciones son a menudo suplementadas con albúmina sérica, leche en polvo, suero fetal bovino o yema de huevo de gallina. Ésta última posee acción termo protectora, la cual es ejercida por la fracción lipídica compuesta por lecitina y cefalina, y una acción conservadora, dada por la fracción lipoproteica. Los azúcares como la glucosa y la fructosa suministran energía a los

espermatozoides para los procesos vitales y aportan suministros de electrolitos para el mantenimiento de la presión osmótica (Medina *et al.* 2005).

Un ejemplo de diluyente utilizado en algunas especies de peces es el diluyente Mounib (Mounib, 1978), adecuado para los espermatozoides de bacalao, lubina y rodaballo. La presencia de pequeñas cantidades de glutatión previene los efectos de deterioro por radicales libres (Maracine y Segner 1998) y evita la peroxidación de lípidos protegiendo las membranas espermáticas (Ogier de Baulny, 1997). El diluyente Mounib fue también utilizado con éxito en el semen de peces de agua dulce (Mounib, 1978; Legendre y Billar, 1980) citado por Susquet (2000).

1.6.1. Diluyentes utilizados en anguila

Algunos trabajos han mostrado que la dilución del esperma puede aumentar las tasas de fecundación (Billard, 1983) y que el uso de diluyentes, en anguila como en otros peces, puede prolongar la vida del esperma refrigerado e incluso incrementar la movilidad de los espermatozoides tras un período de incubación. Asimismo, también existen diluyentes que pueden inhibir la movilidad espermática antes de la congelación (Ohta e Izawa, 1996; Gwo *et al.* 1999; Tanaka *et al.* 2002a), previniendo así el agotamiento de las reservas de energía.

Por otra parte, el esperma de anguila presenta una elevada densidad, siendo habituales concentraciones de $3\text{-}6 \times 10^9$ espermatozoides/ml (Pérez *et al.* 2000), lo que dificulta su análisis, haciéndose necesario el utilizar un diluyente para poder facilitar su estudio. Cabe mencionar que el tiempo de movimiento espermático es muy limitado, de tan sólo algunos segundos. Todo ello hace difícil su manipulación y la valoración de su calidad. Estos mismos problemas se han solventado en otras especies de peces diluyendo el esperma antes de emplearlo durante la fertilización. Para ello se usa habitualmente un protocolo de dilución en dos fases, utilizando primero un diluyente, con unas características físico-químicas similares al plasma seminal, que no active el movimiento espermático como dilución intermedia, seguida de una disolución activadora para alcanzar la dilución final (Asturiano *et al.* 2002a), en la que puede evaluarse la motilidad.

Ohta e Izawa (1995 y 1996) desarrollaron varios medios de conservación de esperma de anguila japonesa (*A. japonica*), tomando como base la composición química del

plasma seminal de esta especie, variando los niveles de los iones K^+ , HCO_3^- , al tiempo que ajustaban la cantidad de Na^+ para mantener la osmolaridad constante y un pH de 8.2. La osmolaridad del plasma seminal de la anguila japonesa es de 337.7 mOsm/kg (Ohta e Izawa, 1996). Así, los espermatozoides permanecen inmóviles. Cambios en la osmolaridad producen movimiento espermático en anguila japonesa, hecho similar sucede en otras especies de teleosteos marinos de interés comercial como la dorada (*Sparus aurata*) (Chambeyron y Zohar, 1990) o la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Sansone *et al.* 2001).

En anguila japonesa se ha probado la eficiencia de estos diluyentes. Así, Ohta *et al.* (1996) obtuvieron una tasa de fecundación del 89.6% de los huevos utilizando un esperma con un 33.5% de espermatozoides móviles y que había sido diluido 100 veces. Ohta e Izawa (1995 y 1996), alcanzaron tiempos de conservación bajo refrigeración superiores a 3 semanas, manteniendo buenos índices de movilidad.

Ohta e Izawa (1995) y Ohta *et al.* (2001) describen experimentos de criopreservación en anguila japonesa, probando diluyentes como el K15 y el K30 (con distintas concentraciones de potasio), logrando mantener la capacidad fertilizante del esperma después de congelación durante 222 días.

Estudios recientes realizados en anguila europea por Asturiano *et al.* (2003 y 2004) mostraron que la composición del plasma seminal de la anguila europea y el de japonesa (Ohta e Izawa, 1996; Tanaka *et al.* 2002a) presentan algunas diferencias, por lo que el medio descrito en anguila japonesa no puede usarse como base para el desarrollo de diluyentes en la especie europea.

1.7. Agentes crioprotectores

La mayoría de los crioprotectores son sustancias orgánicas con una fuerte afinidad por el agua que minimizan los daños celulares durante la congelación. En general, debido a sus propiedades coligativas, modifican las características físico-químicas de las soluciones, llegando incluso a reducir la velocidad de crecimiento de los cristales y modificar su forma. Aunque el mecanismo por el que cada uno de ellos realiza su acción crioprotectora, aún está por determinar, se ha observado que algunos crioprotectores provocan alteraciones del citoesqueleto celular sobre todo a nivel del sistema microtubular (Vicente, 2001).

Los crioprotectores se pueden clasificar según la permeabilidad de la membrana a la sustancia:

- Las sustancias que poseen bajos pesos moleculares y que por lo tanto, penetran al citoplasma celular, tales como glicerol, metanol, etilenglicol, 1,2-propanodiol, acetamida y el dimetilsulfóxido (DMSO).
- Las sustancias que no penetran la membrana celular debido a su alto peso molecular como el polivinilalcohol (PVA), hialuronato de sodio y la albúmina.

Los crioprotectores no permeables son usados para eliminar osmóticamente el agua intracelular, remplazándola por los crioprotectores permeables durante el enfriamiento y adicionalmente, para prevenir el choque osmótico por medio del control de la rehidratación intracelular durante la descongelación (Medina *et al.* 2005).

El DMSO es el crioprotector más utilizado en los procesos de congelación-descongelación del esperma de salmón (Thorgaard, 1983), dorada (Cabrita *et al.* 2005), pez cebra (Yang *et al.* 2007). El glicerol se utiliza en ciertas especies de salmónidos (Stein y Bayle, 1978), la DMA (dimetilacetamida) se utiliza en esperma de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Nagoya *et al.* 1996); mientras que combinaciones de DMSO con glicerol dieron buenos resultados en trucha arcoiris (Lahnsteiner *et al.* 1996).

En estudios sobre la crioconservación del esperma del salmón masou (*Oncorhynchus masou formosanus*), en peligro de extinción, Gwo *et al.* (1999) utilizaron como crioprotectores DMSO, DMA y metanol, cada uno de ellos en diferentes concentraciones, añadidos a un medio 300 mM de glucosa durante la congelación del esperma. Observaron que los espermatozoides congelados con DMSO como crioprotector mostraban una mayor motilidad y fertilidad tras la descongelación con DMA o metanol.

Aunque en peces el DMSO es el crioprotector de esperma más utilizado (Chambeyron y Zohar, 1990), la adición de DMSO vuelve al medio hipertónico (Tanaka *et al.* 2002a), por lo que la permeabilidad del propio diluyente se convierte en factor clave para que no se generen desequilibrios osmóticos.

El metanol es otro crioprotector utilizado con teleósteos como *Hucho hucho*, *Ictalurus furcatus*, *Clarias gariepinus* y *Tanakia limbata*, pero los resultados obtenidos son menos homogéneos que los observados con DMSO en otras especies, con rangos de fertilidad entre 0 y 90% (Medina *et al.* 2005).

La presencia de suero o BSA (albúmina sérica de vacuno) es habitual en los medios de criopreservación. La presencia de una proteína parece conferir una protección de tipo mecánico, disminuyendo los riesgos de daño celular en las diferentes fases del proceso en las que puede producirse un fenómeno de cristalización, recristalización o fusión del hielo (Vicente, 2001).

La cristalización ocurre intracelularmente cuando el agua en fase líquida pasa a sólida. La aparición espontánea del primer núcleo de hielo o nucleación, ocurre cuando la solución llega a temperaturas entre -5 y -15 °C. Este núcleo, de forma hexagonal, adhiere moléculas de agua por medio de interacciones electrostáticas promoviendo la formación de núcleos de mayor tamaño y a medida que se liberan cristales de hielo se libera energía calorífica (calor latente) (Viveiros, 2001), lo que produce un pico transitorio de ascenso en la temperatura que puede ser letal para la célula.

Normalmente, altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos, pero estos pueden unirse y crecer durante la descongelación, fenómeno denominado recristalización (Holt, 2000). Este proceso es promovido por una inapropiada velocidad de descongelación, la cual debe corresponder con la velocidad de congelamiento empleada (Mizukami *et al.* 1999); sin embargo, los procesos de recristalización pueden suceder aún durante la congelación, favorecidos por las regiones no congeladas que permiten interactuar a los cristales de hielo ya formados.

La eficacia de los crioprotectores depende de la toxicidad de sus componentes, de su concentración, del periodo de equilibrado y de los diluyentes utilizados (Medina *et al.* 2005). No obstante, determinar cuál es el crioprotector idóneo es vital para evitar grandes pérdidas de calidad seminal, ya que además, el propio crioprotector puede alterar la morfología y por tanto, la funcionalidad del esperma.

También se usan otros protectores como suplementos en el proceso de criopreservación, como leche en polvo, albúmina sérica, diferentes proteínas y yema de huevo (Rana, 1995). La yema de huevo ha sido probada como aditivo de los diluyentes para congelación en muchos estudios de criopreservación. En peces marinos, se utiliza la solución de Erdahl y Graham con yema de huevo dando buenos resultados en esperma de lucio (*Esox lucius L.*) con una tasa de fertilización aumentada (Babiak *et al.* 1995). En cobia o pez palo (*Rachicentron canadum*) se utilizó DMSO al 10% con 3 mM de glucosa y 10% yema de huevo dando

aproximadamente el 100% de movilidad del esperma después de estar congelada a -80 °C durante un año (Caylor *et al.* 1994).

A pesar que muchos estudios han mostrado un efecto positivo al usar yema de huevo como diluyente, puede no ser aplicable a otras especies. Piironen (1993) encontró que la adición de yema de huevo como diluyente para la criopreservación de esperma incrementa los tiempos de fertilización en trucha común (*Salmo trutta m. lacustris L.*), Pero estos buenos resultados no se repiten en el salvelino (*Salvelinus alpinus L.*). En el aspío (*Aspius aspius*) la presencia de yema de huevo en los diluyentes disminuye significativamente el éxito de la criopreservación (Babiak *et al.* 1998). La acción protectora de la yema de huevo es aparentemente especie-específica y puede depender de los componentes del diluyente y del procedimiento de criopreservación (Chao y Liao, 2001).

1.8. Criopreservación en peces

La criopreservación de espermatozoides es una técnica que permite un mayor aprovechamiento de dichos gametos al poder utilizarlos en la inseminación artificial en cualquier período del año, y sobre todo en aquellas especies que presentan desfases en la maduración gonadal entre machos y hembras. También posibilita la creación de bancos de gametos haciendo posible el establecimiento de programas de selección genética. Desde el punto de vista de la acuicultura, la disponibilidad de gametos congelados posibilita la disminución de los costos de producción, al disminuir los costos de mantenimiento de reproductores y su transporte de un centro de cultivo a otro; resulta más económico el transporte de un bidón de nitrógeno líquido con los gametos que un grupo de reproductores, evitándose a la vez, el estrés derivado del transporte. Las primeras investigaciones se iniciaron en semen de bóvidos y posteriormente han abarcado diversas especies de mamíferos tales como ratones, conejos y especialmente humanos (Chereguini *et al.* 1992). En especies de vida acuática, son los peces los que han sido ampliamente estudiados, más aún, los primeros éxitos de fecundación de huevos con espermatozoides criopreservados se realizaron en especies de agua dulce, especialmente en salmónidos, tilapia y carpa (Chereguini *et al.* 1992; Rana, 1995; Lahnsteiner *et al.* 1996). Estos estudios se han extendido a la criopreservación de esperma de numerosas especies diferentes de peces de agua dulce y marina. Hasta el momento espermatozoides de más 50 especies de peces de agua dulce y marina han sido congelados y muchos de estos

estudios han sido descritos en varias publicaciones para la preservación de los espermatozoides de peces. La mayoría de publicaciones y protocolos, tienen relación con tres grupos de importancia en acuicultura: salmónidos, tilapia y carpa (Rana, 1995).

Las investigaciones más recientes se ha centrado en tres aspectos: la estandarización de los protocolos de congelación que permitan alcanzar tasas de fertilización cercanas a las obtenidas con semen fresco, la evaluación de sustancias crioprotectoras que disminuyan los efectos tóxicos y de criodañó sobre la célula espermática y finalmente, la extrapolación de resultados entre las diferentes especies ícticas para encontrar puntos de similitud (Medina *et al.* 2005).

Los procedimientos convencionales de criopreservación presentan un conjunto más bien complejo de variables que actúan recíprocamente y que deben ser optimizadas todas al mismo tiempo. Por lo general esto se hace por prueba y error y tiene que ser repetido para cada especie porque diversas variables son parámetros característicos intrínsecos de cada especie.

Para la congelación del semen de peces, generalmente se aplican dos etapas: en la primera se enfrían las pajuelas con vapor de nitrógeno líquido y luego se introducen en nitrógeno líquido. La velocidad de congelación varía según las especies de peces, pudiendo usarse tasas de congelación desde los 5 °C/min hasta los 99 °C/min (Susquet *et al.* 2000). Con la finalidad de evitar la recristalización, es necesario llevar a cabo una descongelación rápida, a velocidades que pueden oscilar entre los 10-40 °C/min dependiendo también de las especies (Susquet *et al.* 2000; Medina *et al.* 2005).

1.9. Criopreservación en anguilas

Dado el interés económico en la producción de las diferentes especies de anguila, se ha iniciado la búsqueda de un protocolo para la congelación del espermatozoide de anguila, pero aún no hay ningún protocolo óptimo desarrollado.

Recientes trabajos sobre la utilización del DMSO confirman su eficacia como crioprotector, aunque aparecen algunas incertidumbres de efectos prácticos. La utilización de diversas concentraciones de NaHCO₃ en los medios de dilución y la adición de DMSO 10% (v/v) en la congelación de semen de anguila japonesa confirmó la eficacia del DMSO como crioprotector, pero se observó activación de los

espermatozoides con la adición de dicho crioprotector. Aunque la influencia del DMSO en la iniciación de la motilidad espermática no estaba muy clara, la adición del mismo producía una actividad que podía ser inhibida parcialmente dependiendo del pH y de la concentración de NaHCO_3 (Tanaka *et al.* 2001).

En los últimos tiempos se han desarrollado también diversos estudios para conseguir la inducción de la maduración sexual de la anguila europea (Pérez *et al.* 2000; Asturiano *et al.* 2002a; Müller *et al.* 2004). Los volúmenes de semen de buena calidad obtenidos en consecuencia, han permitido iniciar el desarrollo de protocolos de criopreservación para dicho semen. Entre los trabajos desarrollados en anguila europea se encuentran resultados significativos en cuanto a los medios de congelación y los crioprotectores más eficientes. Destacan tanto el uso del DMSO (Asturiano *et al.* 2003; Müller *et al.* 2004) y del metanol (Szabó *et al.* 2005).

Asturiano *et al.* 2003 obtuvieron buenos resultados en anguila europea sumando los efectos crioprotectores del DMSO y la L- α -fosfatidilcolina en diluciones 1:5 y 1:100 con distintas soluciones. Müller *et al.* (2004) llegaron a conclusiones similares con sus experimentos en anguila europea. El medio de congelación utilizado fue el de Kurokura modificado (Magyary *et al.* 1996), obteniendo una motilidad en espermatozoides descongelados de $36 \pm 11\%$. Sin embargo, el crioprotector que se añadió fue el metanol.

El desarrollo de la crioconservación de esperma permitiría disponer de gametos de ambos sexos de forma sincrónica, además de reducir el riesgo de transmisión de infecciones, de permitir la selección de los reproductores implicados en los cruzamientos, de dar la posibilidad de contar con gametos viables fuera del periodo natural de reproducción, y de permitir crear bancos de esperma para la difusión y conservación de líneas seleccionadas (Kime *et al.* 2001; Asturiano *et al.* 2003; Müller *et al.* 2004; Rurangwa *et al.* 2004).

1.10. Nuevas técnicas para la evaluación de la calidad espermática

La calidad espermática es una medida de la habilidad de los espermatozoides para fertilizar los huevos, pero este parámetro no es independiente, puesto que en el éxito de la fecundación también influye la calidad de los huevos (Rurangwa *et al.* 2004). Por el momento, ningún parámetro físico cuantificable está directamente correlacionado con la capacidad de fertilización de los espermatozoides, de modo que estos

parámetros sólo proporcionan medidas orientativas de la capacidad espermática (Rurangwa *et al.* 2004).

La estimación de la calidad del esperma de peces ha sido definida tradicionalmente usando técnicas manuales, subjetivas, de evaluación de la motilidad y de la densidad del esperma, pero éstas consumen tiempo y los resultados son muy variables (Baker y Clarke, 1987; Van Look y Kime, 2004) y de difícil estandarización (Davis *et al.* 1995). En los últimos años se han desarrollado métodos alternativos para la evaluación de la calidad espermática con los que se estiman características como la morfometría de la cabeza de los espermatozoides, la integridad de la membrana y las funciones mitocondriales (Asturiano *et al.* 2005; Marco-Jiménez *et al.* 2006a y b). Estas nuevas técnicas pueden usarse para evaluar la calidad en fresco o para distinguir cambios producidos en su morfología debidos a la congelación, descongelación y dilución (Billard, 1983; Tanaka *et al.* 1995; Gage *et al.* 1998; Billard *et al.* 2000; Vladic *et al.* 2002).

En estudios ultraestructurales realizados con microscopía electrónica en espermatozoides de peces del orden Anguilliformes, se han definido las siguientes ultraestructuras: una cabeza en forma de media luna, una radícula (pieza media) conectada a la región del cuello, un flagelo con un patrón 9+0, y pseudoflagelos extendiéndose desde el centriolo proximal (Billard y Ginsburg, 1973; Gibbons *et al.* 1983; Gwo y Arnold, 1992; Okamura y Motonobu, 1999; Marco-Jiménez *et al.* 2006a).

La cabeza de los espermatozoides en la especie europea y japonesa es asimétrica en el eje horizontal, siendo suavemente curvada y alargada con una terminación superior en forma de gancho, dando un aspecto de media luna (Figura 2). Aparentemente, una única mitocondria esférica se sitúa en la parte superior o anterior del núcleo. Nueve estrías se extienden desde la parte basal del flagelo recorriendo el lado derecho de la superficie de la cabeza que están siempre orientadas hacia la parte mitocondrial y su final se localiza en la mitocondria. Estas características se observan también en otras especies del género, considerándose por tanto comunes al mismo (Okamura *et al.* 2000).

Por el contrario, algunos aspectos estructurales de la cabeza de los espermatozoides son menos claros, como la localización exacta de la mitocondria o si contiene más de una. Los estudios de Tanaka *et al.* (2002a); Billard y Ginsburg (1973); Çolak y

Yamamoto (1974); Gibbons *et al.* (1983); Miura *et al.* (1991); Gwo y Arnold (1992) han mostrado resultados no concluyentes incrementando la controversia.

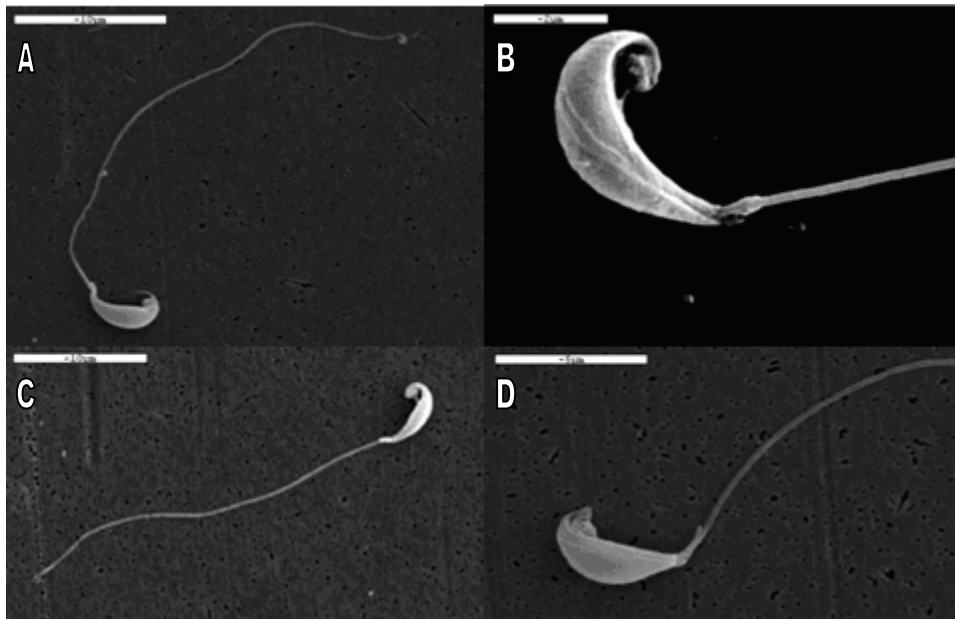


Figura 2. Imagen de espermatozoides de anguila europea obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Barra de escala:10 (A,C), 5 (D) y 2 μm (B) Fuente: Marco-Jiménez *et al.* (2006a).

En la Tabla 3 se muestran los valores morfométricos obtenidos por Okamura *et al.* (2000) tanto en anguila europea como en anguila japonesa por diversos sistemas de microscopía. Estos valores fueron obtenidos mediante las técnicas de: tinción de fluorescencia, microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía óptica (LM).

Tabla 3. Valores morfométricos de espermatozoides de anguila europea (*A. anguilla*) y anguila japonesa (*A. japonica*). Fuente: Okamura *et al.* (2000).

Especies	Long. cabeza (μm)	Ancho cabeza (μm)	Long. flagelo (μm)	Long. parte media (μm)	Diámetro Mitocondrial (μm)	Método	Fuente
<i>Anguillidae</i>							
<i>Anguilla anguilla</i>	8-11		24-36			TEM	Ginsburg & Billard, 1972
<i>A. anguilla</i>	6-9		35			TEM & SEM	Gibbons <i>et al.</i> 1983
<i>A. anguilla</i> *	5,4±0,4	1±0,2	25 ±5,5	1,2±0,2	0,8±0,3	SEM	Okamura <i>et al.</i> 2000
<i>A. japonica</i>	6,3	1	30,5			TEM & LM	Çolak & Yamamoto. 1974
<i>A. japonica</i>					1,0	TEM	Gwo <i>et al.</i> 1992
<i>A. japonica</i> *	4,5±0,5	1,2±0,1	29±6,9	1,3±0,1	1,1±0,3	SEM	Okamura <i>et al.</i> 2000

*El valor corresponde a la desviación media y típica de 20 a 30 espermatozoides.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

SEM: Microscopía electrónica de barrido

LM: Microscopía óptica

1.11. Análisis morfológicos asistidos por ordenador (ASMA)

Actualmente se sabe que la fertilidad en mamíferos está ligada a la morfometría de los espermatozoides, y la presencia de espermatozoides anómalos se ha asociado con una baja fertilidad *in vitro* (Claassens *et al.* 1996).

Para adquirir datos objetivos acerca de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides se desarrollaron los análisis morfológicos asistidos por ordenador (Davis y Gravance, 1993). El perímetro y el área de la cabeza de los espermatozoides de anguila han sido medidos por primera vez en el estudio de Marco-Jiménez *et al.* (2006a). En este trabajo, se estudiaron 100 espermatozoides de anguila europea por

la técnica de SEM y 14.898 usando la técnica informática ASMA. En este estudio se encontraron diferencias entre la longitud, el ancho, el perímetro y el área de la cabeza de los espermatozoides analizados por ASMA y SEM (Tabla 4, $P < 0.05$). Las medidas más altas reportadas al utilizar ASMA podrían ser explicadas, al menos en parte, porque las muestras para SEM son fijadas y deshidratadas utilizando una serie de gradientes de etanol y alcanzando finalmente el punto de secado crítico con CO_2 líquido, y quizás este proceso de preparación provoque una reducción del tamaño de la cabeza de los espermatozoides.

El método de análisis ASMA también se emplea en el campo de la criopreservación, evaluando los efectos causados por los crioprotectores durante los procesos de congelación-descongelación (Billard, 1983; Billard *et al.* 2000), además de estudiar los cambios morfológicos de los espermatozoides durante la maduración celular (Davis y Gravance, 1993; Marco-Jiménez *et al.*, 2006a).

Tabla 4. Parámetros morfológicos de espermatozoides de anguila europea, analizados por el sistema computarizado de análisis morfológico (ASMA) y microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis por imagen (Marco-Jiménez *et al.* 2006a).

	Longitud cabeza (μm)	Ancho cabeza (μm)	Perímetro (μm)	Área (μm^2)
ASMA	4.29 \pm 0.03 ^b	1.15 \pm 0.01 ^a	14.68 \pm 0.13 ^a	5.36 \pm 0.06 ^a
SEM	5.09 \pm 0.04 ^a	1.12 \pm 0.01 ^b	13.72 \pm 0.19 ^b	5.05 \pm 0.01 ^b
P-valor	0.000	0.031	0.002	0.000

Las letras (a y b) indican diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos por ASMA o SEM.

1.12. Sistemas de análisis de esperma asistidos por ordenador (CASA)

Los sistemas CASA son una herramienta potente para determinar la calidad reproductiva del esperma debido a su objetividad (se basa en medidas totalmente cuantitativas), exactitud (se trata de un sistema totalmente automatizado), repetibilidad (en poco tiempo se pueden analizar múltiples muestras) y aleatoriedad en el muestreo, lo que demuestra su objetividad (Klinefelter *et al.*, 1991; Slott *et al.*, 1991 y 1993).

Según Rurangwa *et al.* (2004), los sistemas CASA pueden jugar un papel muy importante en acuicultura, ya que son capaces, de forma rápida y objetiva, de

cuantificar los efectos de las condiciones de obtención y manejo del esperma, tanto en lo referente a la morfometría como a la motilidad, y por tanto determinar la fertilidad en piscifactorías.

La posibilidad de determinar la fertilidad a partir de estos sistemas, mediante la calidad espermática, presenta una gran ventaja, ya que mientras que la disponibilidad de esperma abarca un período largo de tiempo (por lo general), la de los huevos madurados para fecundar se ve restringida a intervalos mucho más reducidos. El sistema CASA optimiza la selección y el almacenamiento del esperma a emplear en la fecundación (Kime, 2001).

Tanto la morfología como la motilidad espermática son importantes factores que influyen en la fertilidad, y por tanto en la fecundación final. Si el esperma resulta dañado o presenta deficiencias morfológicas, puede conllevar a fertilizaciones muy bajas o nulas (Van Look y Kime, 2004).

1.13. Tinciones vitales. Generalidades

Para determinar la relación de células vivas y muertas en la conservación del semen se puede emplear colorantes llamados colorantes vitales, que no causan daño al organismo o célula durante un tiempo corto de exposición, pero a largo plazo son tóxicos y mortales. Estas técnicas se basan en la capacidad de los espermatozoides para evitar la incorporación de determinados colorantes a su interior, debido al efecto barrera que realiza su membrana citoplasmática.

Los protocolos han sido desarrollados usando tinciones fluorescentes para proporcionar una rápida evaluación de la funcionalidad de las mitocondrias y la integridad de membrana celular de esperma de peces.

Sustancias como el yoduro de propidio (PI) (Garner 1986 y 1994), SYBR14 (Segovia *et al.* 2000) y el (bis) bencilimidazol Hoechst 33258 (Leeuw y Dreschler, 1991), son marcadores fluorescentes comúnmente utilizados para determinar la calidad de la membrana celular. Se utilizan para determinar los espermatozoides viables tras el proceso de congelación-descongelación. En el caso del Hoechst 33258, los espermatozoides se clasifican como *muertos* cuando la tinción penetra en la

membrana y el núcleo presenta fluorescencia y vivos cuando no aparece dicha fluorescencia.

II. OBJETIVOS

Dentro del estudio de la reproducción y producción de anguila, se plantea como alternativa a la cada vez mayor presión pesquera de angulas, la obtención de un método de reproducción en cautividad, lo que hace necesario el estandarizar técnicas reproductivas que permitan abastecer un mercado creciente.

Por esta razón es importante el diseño de métodos de colección y criopreservación del esperma de anguila de buena calidad con fines reproductivos en piscifactorías.

Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos:

1. Analizar el efecto de diferentes métodos hormonales para inducir la espermiación en anguila europea y mejorar la calidad del semen obtenido.
2. Determinar cuáles son las características físico-químicas del plasma seminal y con base en estos datos, desarrollar un medio y una técnica para la criopreservación del esperma de anguila europea.
3. Evaluar la influencia de factores como el pH y la concentración de bicarbonato en la activación o inhibición de los espermatozoides de anguila europea.
4. Probar diferentes crioprotectores con la finalidad de determinar cuál es el que mejor protege a los espermatozoides y garantiza una mejor calidad espermática post-congelación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Estabulación de las anguilas

Para la realización de los experimentos se utilizaron acuarios de 96 litros (Figura 3). En cada uno de los acuarios se mantuvieron un número máximo de 10 machos de anguila (peso medio: $137.6 \pm 21.4\text{g}$), dependiendo del experimento. Todos los animales procedían de la piscifactoría Valenciana de Acuicultura S.A. (Puzol, Valencia). El sistema de filtrado consistió en filtros de carbón activo instalados en cada acuario. Todos los acuarios tenían tapas de metacrilato para evitar la huida de las anguilas.



Figura 3. Acuarios de anguilas (Laboratorio de acuicultura, Universidad Politécnica de Valencia).

Las labores de mantenimiento de los tanques se efectuaron semanalmente y consistieron en cambios de agua (prácticamente la totalidad del volumen del tanque, exceptuando 5 litros aproximadamente). La limpieza de las paredes de los acuarios mediante una esponja, el sifonado, la comprobación del estado de los materiales filtrantes y la medición de los parámetros físico-químicos del agua se realizaban asimismo semanalmente.

Los acuarios se mantuvieron en un rango de temperatura de $19\text{-}24^{\circ}\text{C}$ con la ayuda de resistencias con termostatos que garantizaban el control de la temperatura. Cada acuario estaba provisto de un termómetro de mercurio que indicaba la temperatura (Figura 3). Semanalmente se verificaba la temperatura con un termómetro digital. La salinidad final del agua de mar era $37.0 \pm 0.3 \text{ g/l}$. Las anguilas se adaptaron progresivamente a esta concentración, durante un periodo de 10 días

aproximadamente. Para garantizar esta concentración se comprobaba en cada cambio de agua y se ajustaba a los valores establecidos.

Los niveles de nitritos durante el experimento se mantuvieron en concentraciones bajas (menores de 0.5 ppm).

Previa introducción de las anguilas en los acuarios se procedió al marcado de cada individuo con microchips (EiD Ibérica) mediante inyección intramuscular con ayuda de una jeringa de calibre 14 (Figuras 4 y 5). Esto permitía la identificación de cada individuo y así como un seguimiento individual de los mismos.



Figura 4. Materiales para la colocación de los microchips: lector de chips, jeringa, aguja y microchip.



Figura 5. Colocación de microchip a una anguila.

3.1.1. Tratamientos hormonales

Durante los 10 primeros días del experimento correspondiente no se realizó ningún tratamiento para permitir la aclimatación de las anguilas al agua de los acuarios (37.0 ± 0.3 g/l; 20-22 °C), con el fin de reducir el estrés lo máximo posible y garantizar la supervivencia de los individuos. A partir entonces comenzó el tratamiento hormonal semanal prolongándose hasta la decimotercera semana en promedio. Dicho tratamiento consistió en la inyección de 1.5 UI/g pez de gonadotropina coriónica humana (hCG), según describieron Pérez *et al.* (2000), a excepción de los distintos tratamientos alternativos evaluados en el primer artículo adjunto a esta memoria. Antes de la inyección hormonal cada ejemplar se anestesió por inmersión durante unos minutos en una disolución de benzocaína (60 mg/l). El tiempo del baño dependía de cada ejemplar procediendo a la extracción cuando se apreciaban síntomas de adormecimiento. Una vez anestesiado, se pesaba al ejemplar y se le inyectaba intraperitonealmente la dosis correspondiente (diluida en suero fisiológico). A partir de la quinta semana se podía extraer espermatozoides de los machos.

3.2. Extracción de espermatozoides

A partir de la quinta o sexta semana de tratamiento se comenzó a extraer el semen de los machos, hasta la decimotercera semana (en promedio), mediante masaje abdominal (Figura 6), y siempre 24 h después de la inyección hormonal, ya que se ha comprobado que es el momento de mayor calidad del espermatozoides (Pérez *et al.* 2000).

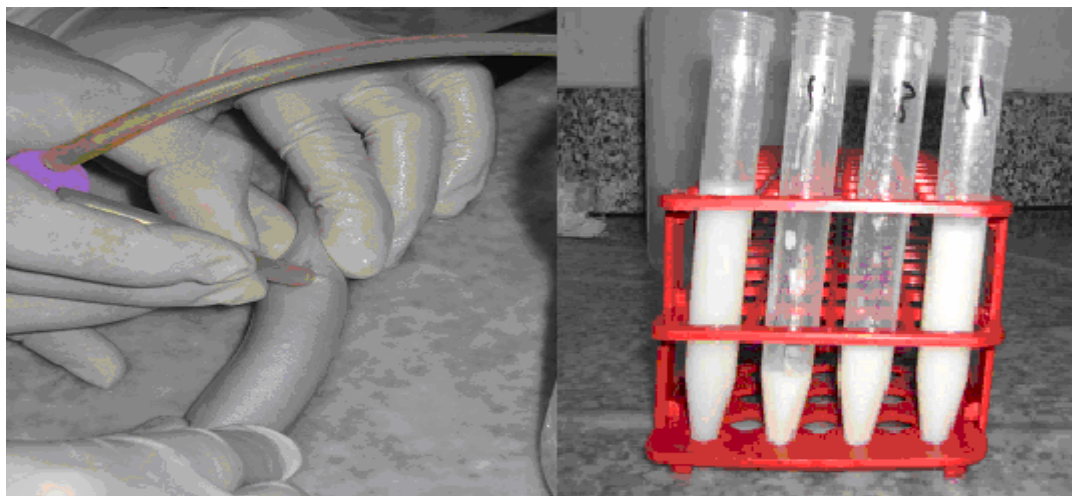


Figura 6. Masaje abdominal y extracción de semen.

Para iniciar la extracción se limpiaba el abdomen con agua destilada y se secaba para evitar contaminaciones de la muestra (debidas a la presencia de heces o agua salada) y se procedía al masaje abdominal cráneo-caudal. Para recoger todo el esperma se usaba una pequeña bomba de vacío acoplada a un tubo de silicona (Figura 7), el cual disponía de un tubo graduado Falcon para la recolección del esperma. Este proceso se llevó a cabo con cada ejemplar en cada muestreo.

Las muestras se conservaban destapadas y refrigeradas. La motilidad en fresco se evaluó inmediatamente.

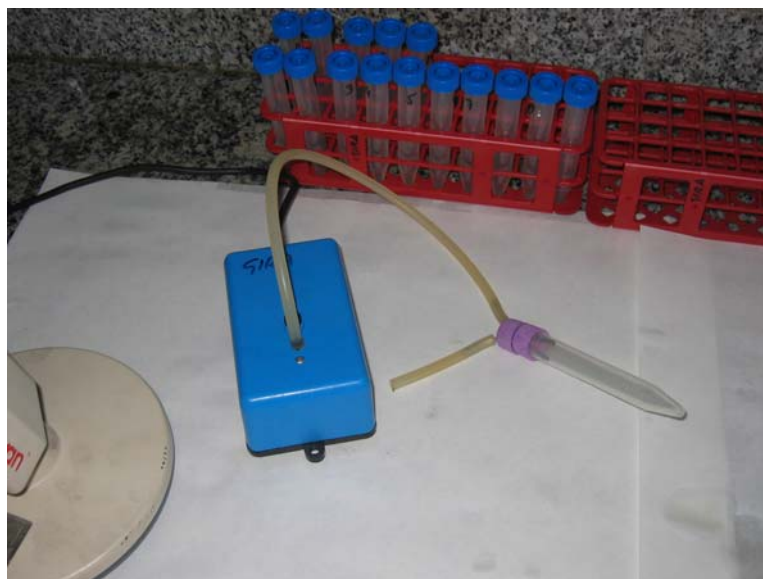


Figura 7. Bomba de absorción de semen.

3.3. Estimación de la movilidad de los espermatozoides post-activación

Cada muestra de semen era evaluada determinando el porcentaje de espermatozoides activados tras su activación con agua de mar artificial. El análisis de las muestras se realizó mediante un microscopio Nikon Eclipse E400 al que se adapta una cámara Sony CCD-IRIS que permitía mostrar las imágenes de los espermatozoides activados en el monitor de un ordenador.

La técnica de activación seguida fue la siguiente: se diluyeron 2 μ l de semen en 2 ml de agua de mar artificial (dilución 1:1001), cuya composición era (en mM): 354.7 NaCl, 52.4 MgCl₂, 9.9 CaCl₂, 28.2 Na₂SO₄, 9.4 KCl y pH 8, y con una osmolaridad de 1000 mOsm/kg, mantenida a 4 °C (Asturiano *et al.* 2004b). Se agitaron brevemente en un vórtex e inmediatamente después, se depositó una alícuota de 2 μ l de espermatozoides activados en un portaobjetos de teflón con micropocillos de 0.5 cm

de diámetro. Los portaobjetos habían sido mantenidos previamente durante 30 min en una disolución con un 10% de albúmina bovina, posteriormente enjuagados con agua destilada y secados en campana (Kime *et al.* 2001). Las muestras se observaron al microscopio con un aumento de 20x, en un tiempo menor a 15 segundos, y se clasificaron en categorías de movilidad según una escala arbitraria en la que 0 representa espermatozoides inmóviles, I: < 25%, II: 25-50%, III: 50-75%, IV: 90-100% del total de espermatozoides móviles (Chambeyron y Zohar, 1990).

Este mismo análisis se llevó a cabo por triplicado, con cada una de las muestras originales y de los *pools* finales, antes y después del proceso de criopreservación, para comprobar la motilidad de los espermatozoides post-descongelación en todos los experimentos.

3.4. Configuración de los *pools* para los experimentos

De cada macho se extrajo la totalidad del semen, lo que es considerado aquí como una muestra. Dependiendo de la movilidad y cantidad de esperma se seleccionaron las mejores muestras para formar los *pools* para criopreservar. Aquellas muestras que presentaron una motilidad superior o igual al 50% fueron seleccionadas. Los *pools* estaban formados por la mezcla de 3 muestras cada uno, reduciendo así la variabilidad debida al factor macho. Una vez formados los *pools*, se procedió a evaluar de nuevo movilidad tras la activación con agua de mar.

3.5. Métodos de criopreservación y descongelación

Partiendo de las muestras (*pools*) el método general de criopreservación se realizó de acuerdo a los siguientes pasos: en primer lugar, se mezcló el diluyente con el crioprotector. Luego, se añadió el volumen de semen (*pool*) correspondiente. Las muestras se introdujeron en pajuelas rotuladas de 0.25 ml (IMV[®] Technologies, Láigle, Cedex, France), selladas con plastilina. Se colocaron sobre una rejilla en una caja de poliexpan a 5 cm del nitrógeno líquido durante 10 min. Así eran precongeladas con el vapor de nitrógeno (-120 °C), (Figuras 8 y 9). Posteriormente se introducían en el nitrógeno líquido para completar la congelación de las muestras a -196 °C.

Para llevar a cabo la descongelación de las muestras, se tomaron las pajuelas del banco con nitrógeno líquido y se introdujeron en un baño de agua a 20 °C durante 1 min.

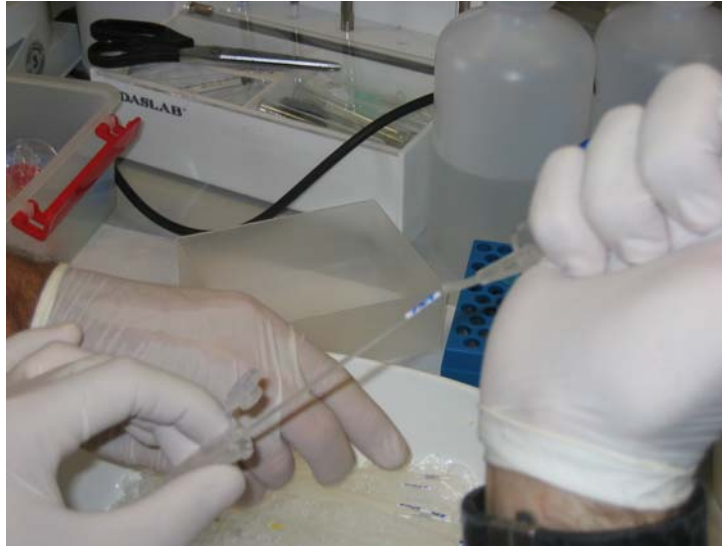


Figura 8. Llenado de las pajuelas con esperma diluido.



Figura 9. Sellado de pajuelas con la muestra y primera fase de congelación.

3.6. Análisis de tinciones vitales (Hoechst)

Para determinar la supervivencia de los espermatozoides tras el proceso de criopreservación se llevó a cabo una tinción con el colorante fluorescente Hoechst 33258. La mezcla consistía en 1 μ L de Hoechst 33258 (solución 1 mg/ml) con 2 μ L de

semen de anguila y 997 μl de una solución salina tampón fosfato (PBS). Tras 5 min de incubación en oscuridad y a temperatura ambiente, se evaluó cada muestra con un microscopio epifluorescente Nikon Eclipse (E-400), usando filtración UV-2A (EX: 330-380 nm, DM: 400, BA: 420).

Los espermatozoides se clasificaron como *muertos* cuando el núcleo presentaba fluorescencia y *vivos* cuando no apareció fluorescencia. Se analizaron como mínimo 100 espermatozoides por muestra.

3.7. Análisis de la morfometría espermática

Las muestras escogidas para este análisis fueron diluidas 1:50 con un 2.5% de glutaraldehído en una solución tampón fosfato salina fijadora (Pursel y Johnson, 1974) y mantenidas a 4 °C hasta su análisis.

La observación de las muestras se realizó usando un objetivo de contraste de fases de 1000x (Nikon Plan Flour) en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se transfirieron con una videocámara Sony CCD-IRIS (Figura 10). Para el análisis de los espermatozoides en el ordenador se utilizó el software ASMA (Sperm Class Analyzer[®], Morfo Version 1.1, Imagesp, Barcelona, España). Se analizó una media de 100 espermatozoides, midiendo el perímetro (μm) y el área de la cabeza (μm^2).

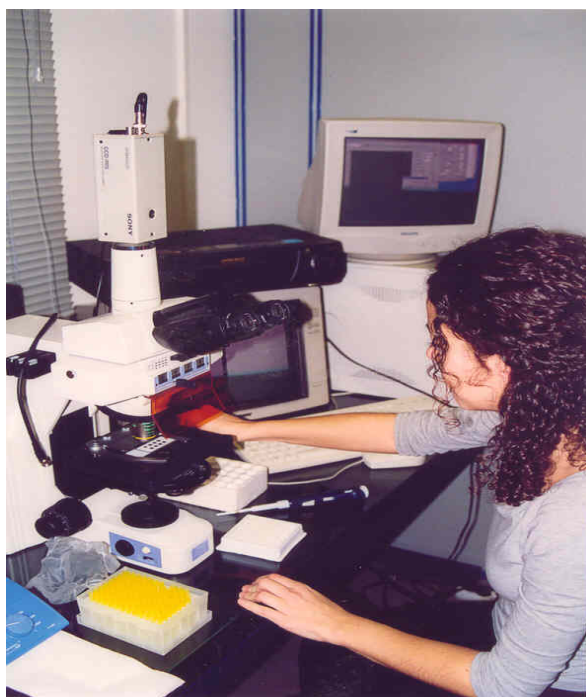


Figura 10. Microscopio Nikon Eclipse E400 con videocámara Sony CCD-IRIS.

3.8. Medición de la movilidad espermática por CASA

La evaluación de la calidad espermática se realizó por triplicado en cada muestra. Se mezclaban 2 μ L de esperma fresco con 2 ml de agua de mar artificial (M 1000, dilución 1:1001). Se agitaba en vórtex inmediatamente y 2 μ L de la muestra resultante se colocaban en portaobjetos de teflón.

En el caso de las muestras diluidas en extender, o descongeladas, la motilidad se evaluó por dilución 1:10 en agua de mar artificial (M 1000).

La observación de las muestras se realizó usando un objetivo de contraste de fases de 20x (Nikon Plan Flour) en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se transfirieron con una videocámara Sony CCD-IRIS (Figura 10). Las imágenes fueron grabadas para su posterior análisis con el sistema de análisis de espermatozoides software CASA (Sperm Class Analyzer[®], Morfo Version 1.1, Imagesp, Barcelona, España). Los parámetros medidos fueron los siguientes: velocidad angular (VAP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad de línea directa (VSL) y frecuencia de batido del flagelo (BCF).

3.9. Reactivos utilizados en los artículos adjuntos a esta memoria

3.9.1. Medio de Activación

Tabla 5. Agua de mar artificial M1000, concentración (en mM)

Reactivos	M1000
NaCl	354.7
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	52.4
Na ₂ SO ₄	28.2
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	9.9
KCl	9.4

3.9.2. Diluyentes

Tabla 6. Composición química de los diluyentes K15 y K 30 (en mM) pH 8.1 descritos por Ohta e Izawa 1995 y Ohta *et al.* 2001.

Medio	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	NaHCO ₃	TAPS
K15	120.6	15	1.3	1.6	20	20
K30	105.6	30	1.3	1.6	20	20

3.9.3. Medios de congelación

Tabla 7. Composición química de los diferentes medios de congelación.

(mM)	TNK (Tanaka <i>et al.</i> 2002a)	P1 (Asturiano <i>et al.</i> 2003)	P1modif (Asturiano <i>et al.</i> 2004)	K30 (Ohta <i>et al.</i> 2001)
NaCl	137	125	70	134.5
NaHCO ₃	76.2	20	75	20
KCl	--	30	30	30
MgCl ₂	--	25	25	16
CaCl ₂	--	1	1	1.3
TAPS	20	--	--	--
pH	8.2	8.5	8.5	8.1

3.9.4. Crioprotectores utilizados

Metanol

DMSO

Etilenglicol

Glicerol

Propanol

Acetamida

3.10. Análisis estadístico

Se utilizó un análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para comparar los parámetros entre los diferentes muestreos o la composición iónica de las muestras de esperma entre las distintas clases de calidad y condiciones de congelación. El procedimiento de diferencia menos significativa (LSD) fue usada para comparaciones entre las diferentes muestras con un nivel de significancia de 0.05

Como *test* de comparación múltiple de las medias se usó el *test* de Student-Newman-Keuls, con un nivel de significación del 95% ($p < 0.05$).

Para cada variable se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos con los tests Kolmogorov-Smirnov y de Bartlett, respectivamente. Todos los valores se expresan como media \pm error estándar (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete de análisis Statgraphics® Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp. Rockville, MO, USA).

IV. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los procesos de criopreservación de semen de peces han sido estudiados ampliamente, especialmente en salmónidos y ciprínidos. Sin embargo, estas técnicas apenas se han utilizado en piscicultura mediterránea y en especial en anguila. Por esta razón se decidió realizar una serie de experimentos con la finalidad de aportar datos sobre:

- Tratamientos de inducción hormonal en anguila europea (procedentes de piscifactoría) para obtención de esperma.
- Protocolos de criopreservación utilizando como base los medios diluyentes ya estudiados en anguila japonesa (K15, K30, TNK) y dos descritos anteriormente para anguila europea (P1 y P2). A los espermatozoides congelados en estos medios se les realizaron análisis de movilidad y calidad.
- Una vez definido el diluyente de mejores características (inactivación y supervivencia) se procedió a probar una batería de crioprotectores (dimetilsulfóxido, acetamida, etilenglicol, propanol, glicerol y metanol) con la finalidad de definir el mejor para anguila europea. Al mismo tiempo se estudió el efecto de la adición de suero fetal bovino (FBS) a los medios de congelación, y del factor de dilución esperma:medio de congelación. El efecto de estos factores se evaluó mediante la comparación pre y post-congelación del porcentaje de células móviles, porcentaje de células vivas y de su morfometría.

4.1. Experimento I

Fueron probados cinco tratamientos hormonales con gonadotropina coriónica humana (hCG), para inducir la maduración gonadal y producción de esperma en machos de anguilas procedentes de piscifactoría. Con esto se pretendía optimizar tratamientos hormonales usados anteriormente y buscar tratamientos de inducción más cortos, con períodos más largos de producción de semen, menor manipulación de los peces y una mejor calidad del esperma. Los tratamientos fueron:

- Tratamiento A: consistió en la administración semanal de 1.5 UI hCG/g pez durante 12 semanas (descrito previamente por Pérez *et al.* 2000).
- Tratamiento B: la dosis semanal de hormona suministrada a los peces fue de 0.75 UI hCG/g pez, equivalente a la mitad de la dosis del tratamiento A durante 12 semanas.

- Tratamiento C: machos tratados semanalmente, pero sólo hasta el inicio de la espermiación, con 1.5 UI hCG/g pez.
- Tratamiento D: administración de hormona a los animales cada dos semanas con una concentración de 1.5 UI hCG/g pez durante 12 semanas
- Tratamiento E: anguilas tratadas solamente durante 3 semanas con 1.5 UI hCG/g pez.

La evaluación de la calidad del esperma fue realizada con el sistema de análisis de esperma asistido por ordenador (CASA), considerando el porcentaje total de espermatozoides móviles y el porcentaje de espermatozoides con velocidad rápida y media, así como diferentes parámetros de movilidad.

4.1.1. Resultados

Se detectó un descenso del peso de los animales en todos los grupos incluido el grupo control antes del final del tratamiento, posiblemente debido al ayuno de los animales.

La espermiación empezó en todos los grupos tratados hormonalmente a partir de la sexta semana de tratamiento. El mayor porcentaje de machos espermiantes (100%) se obtuvo con el tratamiento A y se mantuvo hasta la duodécima semana de tratamiento (Experimento I, página 1484, tabla 2). Los tratamientos B y D produjeron alrededor de un 80% de machos espermiantes durante el periodo comprendido entre las semanas 6-7^a a 12^a de tratamiento. El tratamiento C produjo un 100% de machos espermiantes a partir de la sexta semana de tratamiento, reduciéndose este porcentaje más adelante. El tratamiento E dio como máximo un 60% de machos espermiantes después de la séptima semana de tratamiento, mientras que los animales control nunca produjeron esperma. No se encontraron diferencias significativas en la velocidad lineal (VSL), velocidad curvilínea (VCL), velocidad angular (VAP), ni en la frecuencia de batido del flagelo (BCF) entre los grupos A-D.

4.2. Experimento II

La alta densidad de esperma junto con el corto tiempo de movimiento espermático, hace que la manipulación y evaluación de la calidad de esperma de anguila sea difícil. Por ello, es necesaria la utilización de medios diluyentes que mejoren las condiciones de trabajo.

En este experimento se trataron de definir las características fisicoquímicas del plasma seminal de anguila europea, (pH, osmolaridad y composición iónica) con la finalidad de definir las características de un buen diluyente. Para ello, se utilizaron machos de anguila europea a los que se les aplicó el tratamiento hormonal A (1,5 IU/g pez semanal), que originó los mejores resultados en el experimento 1, para inducir la espermiación.

Después de obtener y activar el semen de los machos, se midieron los siguientes parámetros de movilidad: la velocidad angular (VAP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad líneal (VSL) y frecuencia de batido del flagelo (BCF). Estos parámetros se analizaron con el programa informático para análisis de esperma (CASA). Simultáneamente se probaron dos medios diluyentes descritos previamente para anguila japonesa (K15 y K30) con las muestras de semen obtenidas. Estas muestras se analizaron por triplicado y se evaluaron también con CASA a las 24, 48 y 72 h después de su dilución.

La composición iónica del plasma seminal, la variación de la osmolaridad y el pH fueron relacionados con la calidad del esperma durante el tratamiento para determinar cuáles podrían ser las mejores características de un diluyente y el mejor medio de criopreservación para el esperma de anguila europea.

En base a los resultados obtenidos se diseñaron los medios de congelación P1 y P2, considerando tanto los parámetros fisicoquímicos como la composición iónica mostrada por las muestras espermáticas de mejor calidad. Se compararon con el diluyente K30 descrito previamente por (Ohta e Izawa 1995, 1996) y con el diluyente TNK (Tanaka *et al.* 2002a). La calidad espermática se determinó midiendo el porcentaje de espermatozoides móviles y los parámetros de movilidad usando el programa informático CASA. Las muestras fueron congeladas después de su dilución en proporciones de 1:5, 1:20 y 1:100 en los diferentes medios de congelación, los

cuales fueron suplementados con 10% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y 1.4 g/100ml de L- α -fosfatidilcolina.

4.2.1. Resultados

Después de 24 h, el esperma de anguila europea mantenido en los medios K15 y K30 mostró una reducción significativa del porcentaje de espermatozoides móviles y de los parámetros de movilidad (VAP, VCL, VSL, BCF), medidos tras activación con agua de mar, por lo cual se puede decir que estos medios no son apropiados para preservar el esperma de esta especie (Experimento II, página 287, figura 1).

La producción de esperma comienza en la séptima semana de tratamiento. El volumen de esperma no mostró ninguna diferencia significativa, aunque se observó una tendencia creciente a partir de la octava semana y a lo largo de las semanas 9^a, 10^a, 11^a y 12^a con una disminución a partir de la semana 13^a de tratamiento (Experimento II, página 288, figura 2a).

El plasma seminal mostró una disminución significativa de la osmolaridad entre la octava y la novena semana de tratamiento (Experimento II, página 288, figura 2b). A partir de esta semana y hasta la decimocuarta semana de tratamiento, la osmolaridad se mantuvo alrededor de 325-330 mOsm/ kg.

La composición iónica del plasma seminal (concentraciones de Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺) mostró diferencias significativas relacionadas con la calidad del esperma (Experimento II, página 289, tabla 1). La concentración de K⁺ se incrementó, mientras que las concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ mostraron una reducción progresiva al aumentar la calidad espermática. El Na⁺ mostró cierta disminución, aunque no significativa.

Los medios de congelación TNK y P1 conteniendo DMSO y lecitina, utilizados en una dilución 1:5, parecían originar los mejores resultados (35.5 \pm 14.5 y 36.6 \pm 6.7% de espermatozoides móviles después de la descongelación, respectivamente), aunque las diferencias no fueron significativas, posiblemente por la existencia de cierta variabilidad en los resultados (Experimento II, página 290, figura 4).

Al comparar los resultados de los medios con y sin lecitina se observó que la lecitina añadida al medio originaba un cierto efecto positivo, coincidiendo con lo reportado

para anguila japonesa, aunque tampoco en este caso llegaron a observarse diferencias significativas.

4.3. Experimento III

En este experimento se utilizaron los resultados de los experimentos anteriores y se continuó el trabajo para obtener un medio de criopreservación que permitiera mantener la calidad espermática post-congelación. Para ello se evaluó la influencia del pH y de la concentración de bicarbonato de los medios diluyentes (TNK y P1) en la calidad del espermatozoide, y también se estudió la influencia del DMSO como crioprotector.

Para la evaluación del efecto del pH se diluyeron las muestras de espermatozoide en relación 1:20 en P1 o TNK ajustados a diferentes pH, y se midió el porcentaje de células móviles.

El efecto del DMSO sobre la motilidad del espermatozoide se analizó tras diluir el semen en una mezcla compuesta por 10% DMSO (v/v), 56.6 % de extender (P1 o TNK) y 33% de semen, que se añadía en último lugar. Tras 5 min de incubación, se midió la movilidad en agua de mar.

Posteriormente se probaron seis crioprotectores (dimetilsulfóxido, acetamida, etilenglicol, propanol, glicerol y metanol) utilizados anteriormente en anguila u otros peces. El semen se mezcló con los otros componentes, y cada mezcla contenía 75 µl de crioprotector, 425 µl de extender P1 y 250 µl de espermatozoide. La activación se midió inmediatamente después de la adición del espermatozoide. Al mismo tiempo se prepararon muestras que fueron congeladas en nitrógeno líquido y en las que se evaluó el porcentaje de células vivas (mediante el método de tinción de Hoechst) y los parámetros de morfometría (área y perímetro de la cabeza, mediante ASMA). Estos resultados fueron comparados a su vez con las muestras de los *pools* en fresco.

Considerando los resultados obtenidos, tres crioprotectores (DMSO, MeOH y glicerol) fueron elegidos y reevaluados en dos medios (P1 y P1 modificado) y en presencia o ausencia de suero fetal bovino (FBS). El efecto de estas combinaciones de diluyentes y crioprotectores se evaluó al comparar la movilidad y el porcentaje de células vivas obtenido, frente a los valores mostrados por las muestras de los *pools* en fresco.

4.3.1. Resultados

El medio P1 a pH 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5 y el medio TNK a pH 7.8 ó 8.5 indujeron movilidad espermática, pero sin diferencias significativas entre los dos grupos (Experimento III, página 4, figura 1a).

Las muestras incubadas durante 5 min en P1 y DMSO no presentaban movilidad espermática después de ser activadas con agua de mar. Este fenómeno podría deberse a la activación de los espermatozoides en presencia del DMSO con el consiguiente consumo energético, durante el período de incubación (Experimento III, página 4, figura 1b).

En el estudio con el grupo de seis crioprotectores, el DMSO fue el crioprotector que originó mejores resultados respecto al porcentaje de células vivas y la morfometría (manteniendo el perímetro de la cabeza del espermatozoide en relación con el *pool* control). El MeOH y el glicerol fueron los otros dos crioprotectores que originaron buenos resultados especialmente en el porcentaje de células vivas post-congelación (Experimento III, página 4, figura 2).

Los crioprotectores DMSO, MeOH y glicerol fueron reevaluados nuevamente utilizando los medios diluyentes P1 y P1 modificado y en presencia o ausencia de FBS. El porcentaje de espermatozoides móviles en las muestras congeladas con DMSO fue significativamente mayor que el obtenido con glicerol o MeOH, independientemente del medio utilizado. Las muestras congeladas en medio P1 modificado con DMSO en presencia de FBS presentaron un porcentaje significativamente superior de espermatozoides móviles ($22.2 \pm 1.5 \%$) que en el resto de condiciones. Las muestras congeladas con glicerol mostraron un valor intermedio (5-9%) de células móviles, mientras que los valores obtenidos con MeOH fueron los más bajos (0.1-0.4%) en ambos medios (Experimento III, página 5, figuras 3 y 4).

Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel

Juan F Asturiano¹, Luz Pérez¹, Daniel L Garzón¹, David S Peñaranda¹, Francisco Marco-Jiménez², Silvia Martínez-Llorens¹, Ana Tomás¹ & Miguel Jover¹

¹Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, Valencia, Spain

²Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Ctra. Náquera-Moncada, Moncada, Valencia, Spain

Correspondence: J F Asturiano, Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia, Spain. E-mail: jfastu@dca.upv.es

Abstract

Five hormonal treatments with human chorionic gonadotropin (hCG) were tested for the induction of maturation and spermiation in male farmed eels. The main aim was to optimize previously used hormonal treatments to achieve shorter induction treatments, longer spermiation periods and/or higher sperm quality. Fish treated for just 3 weeks (treatment E) or until the onset of spermiation (treatment C) showed the worst results, while the treatment consisting of weekly administration of 1.5 IU hCG g⁻¹ fish (treatment A) induced the highest percentage of spermiating males, the highest number of sperm samples and sperm volumes and densities similar to the rest of the treatments (B: half hormone dosage, or D: biweekly administration). Evaluation of the sperm quality was performed by computer-assisted sperm analysis (CASA), considering the percentage of total motile spermatozoa, the percentage of fast and medium-velocity spermatozoa, as well as different motility parameters. Sperm samples from A–D groups showed between 44% and 54% motile spermatozoa, and between 10% and 15% fast spermatozoa, while samples from E-treated males showed 0% motile cells. No significant differences were found in the spermatozoa straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) or the angular velocity (VAP), neither spermatozoa beating cross frequency (BCF) between A–D groups.

Keywords: *Anguilla anguilla*, European eel, sperm, activation media, CASA

Introduction

The European eel (*Anguilla anguilla* L.) has suffered a dramatic reduction in its populations, due to intensive capture of both glass eels and reproductive eels. Moreover, populations have been decreasing owing to several others factors (Feunteun 2002), such as massive exportation to other countries, the deterioration of its natural habitat and the importation of alloctonous parasites (*Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi & Itagaki 1974) from the Asian species (Koops & Hartmann 1989; Kennedy & Fitch 1990). So, the development of methods for the reproduction of this species is necessary not only from an economical point of view, to meet the demands of fish farms, but also from an ecological point of view, to reduce the pressure on natural populations. Previous studies in Japanese eel (*Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1847) showed that repeated injections of human chorionic gonadotropin (hCG) allow the artificial maturation of immature male eels and induce milt production (Ohta, Kagawa, Tanaka, Okuzawa & Hirose 1996; Ohta, Kagawa, Tanaka, Okuzawa, Inuma & Hirose 1997a). Even a single injection of hCG is enough to induce maturation in Japanese eel (Miura, Yamauchi, Nagahama & Takahashi 1991; Saksena, Miura, Jiang & Nagahama 1995; Ohta & Tanaka 1997; Ohta *et al.* 1997a). The European eel has not yet been reproduced in captivity, but methods for the hormonal induction of gonad maturation in this species have been developed in previous studies, obtaining significant sperm volumes with a good quality in the case of males (Boëtius & Boëtius 1967; Billard &

Ginsburg 1973; Meske 1973; Bieniarz & Epler 1977; Dollerup & Graver 1985; Leloup-Hâtey, Oudinet & Lopez 1985; Khan, Lopez & Leloup-Hatey 1987; Pérez, Asturiano, Tomás, Zegrari, Barrera, Espinós, Navarro & Jover 2000; Müller, Urbányi, Váradi, Binder, Horn, Bercsényi & Horváth 2004; Müller, Baska, Niklesz, Horn, Váradi & Bercsényi 2005; Szabó, Müller, Bercsényi, Urbányi, Kucska & Horváth 2005). However, hormonal induction treatments of gonad maturation usually take several weeks, or even months, when single-injection treatments are applied (Khan *et al.* 1987), and scant attention has been paid to attempts at optimizing the hormonal treatments used in males to achieve shorter induction treatments, longer spermiation periods and/or higher sperm quality.

In one attempt to determine indicators of European eel sperm quality to cryopreservate the best gametes, previous studies have determined the fresh sperm characteristics during the spermiation period (Pérez *et al.* 2000; Pérez, Asturiano, Martínez, Tomás, Olivares, Mocé, Lavara, Vicente & Jover 2003). Changes in the ionic composition of seminal plasma correlated with changes in the sperm quality, in terms of spermatozoa motility, have been reported (Pérez *et al.* 2003; Asturiano, Pérez, Garzón, Marco-Jiménez, Peñaranda, Vicente & Jover 2005). In these studies, the pH values showed no significant differences during the 14 weeks of assay, being constant between 8.4 and 8.6. The seminal plasma osmolality showed a significant decrease during the first spermiation weeks and was maintained around 325–330 mOsm kg⁻¹ during the rest of the experiment. However, these results have been obtained with samples from fish treated with the treatment described by Pérez *et al.* (2000), 1.5 IU hCG g⁻¹ fish. These parameters, considered as possible sperm quality indicators, will be registered in the present study, trying to know its variation under different hormonal treatments and to corroborate its utility as quality indicators.

Materials and methods

Fish and hormonal treatments

Forty-eight male European eels (142.3 ± 5.2 g body weight) from the fish farm Valenciana de Acuicultura (East coast of Spain) were moved to our facilities. Fish were gradually acclimatized to sea water (salinity 37.0 ± 0.3 g L⁻¹, 19–21 °C) in 10 days.

Over 12 weeks, males were weighted and injected with hCG according to the treatments. At each weekly sampling, males were anaesthetized (benzocaine; 60 mg L⁻¹) before receiving hCG dose.

Table 1 Treatments tested for the induction of maturation and spermiation in farmed eel males

Treatment	Dosage (IU hCG g ⁻¹ fish)	Intervals of administration
A	1.5	Weekly
B	0.75	Weekly
C	1.5	Weekly until the onset of spermiation
D	1.5	Every 2 weeks
E	1.5	Weekly for just 3 weeks
F	0 (Control)	–

hCG, human chorionic gonadotropin.

Five treatments were tested for the induction of maturation and spermiation in farmed eel males (Table 1). The hormonal doses, hCG (Profasi, Spain), previously diluted in saline serum to obtain 1 IU hormone µL⁻¹ serum, were supplied via intraperitoneal injections.

Spermatozoa activation

The artificial sea water, used as activation medium, was tested in preliminary studies (Asturiano, Pérez, Pérez-Navarro, Garzón, Martínez, Tomás, Marco-Jiménez, Vicente & Jover 2004), and contained (in mM): MgCl₂ · 6H₂O 52.4, Na₂SO₄ 28.2, CaCl₂ · 2H₂O 9.9, KCl 9.4 and NaCl 354.7. The formula of artificial sea water (Cifuentes, Torres & Frías 1986) was modified, removing those salts in concentration lower than 1.9 mM. Sodium bicarbonate was also removed, to prevent an inhibitory effect on the motility of sperm, as has been observed in the Japanese eel (Tanaka, Zhang, Horie, Yamada, Okamura, Utoh, Mikawa, Oka & Kurokura 2002a). The osmolality was adjusted by an osmometer Osmomat 030 (Gonotec, Berlin, Germany) and pH was adjusted to 8.2.

Sampling

Eels started to produce sperm during the fifth week of treatment. Sperm samples were collected 24 h after administration of hCG because previous studies (Ohta *et al.* 1997; Pérez *et al.* 2000) showed that this was the time when the highest sperm quality is found.

Sperm was collected by gentle abdominal pressure to previously anaesthetized males after cleaning the genital area with distilled water and thoroughly drying to avoid contamination of samples with faeces, urine and sea water. A small aquarium air pump was modified to obtain a vacuum breathing force,

and a graduated tube was inserted into the system to collect the milt and measure the volume obtained. A new tube was used for every male, and distilled water was used to clean the collecting pipe between different males. Samples were maintained at 4 °C, and the total expressible milt was noted in mL 100 g⁻¹ fish weight.

To measure sperm density, samples were diluted 1:1000 or 1:10000 in P1 medium (in mM) NaCl 125, NaHCO₃ 20, KCl 30, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 1, pH 8.5 (Asturiano, Pérez, Marco-Jiménez, Olivares, Vicente & Jover 2003), cells were counted using a Thoma haemocytometer and results were noted as spermatozoa × 10⁹ × mL⁻¹.

pH and osmolality

The remaining sperm samples were centrifuged (2700 g, 20 min), to separate the spermatozoa of seminal plasma. Aliquots of 50 µL of the seminal plasma were taken for osmolality measurement using an Osmomat 050 Osmometer; data were noted in mOsm kg⁻¹. The remaining seminal plasma was used for pH measurement.

Evaluation of sperm motility

Evaluation of sperm quality was performed in triplicate for each sample. Two µL of sperm was mixed with 2 mL of activation medium M1000 (1:1001). The mixture was vortexed immediately and 2 µL of the shaken mixture was deposited in a slide with Teflon microwells. Slides were previously bathed in bovine serum albumin 10% solution (according to D. Kime, pers. comm., 2000) to avoid spermatozoa remaining adhered to the slide. Observation of slides was carried out using a × 20 negative phase-contrast objective (Nikon Plan Fluor) on an Eclipse E400 Nikon microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

A Sony CCD-IRIS video camera (Sony, Tokyo, Japan) transferred the image, which was recorded for subsequent analysis through a computer-assisted sperm analysis (CASA) technique, using the Sperm Class Analyzer[®] (Imagesp, Barcelona, Spain). The measured parameters were: percentage of motile spermatozoa, curvilinear velocity (VCL, in µm s⁻¹), straight line velocity (VSL, in µm s⁻¹), angular velocity (VAP, in µm s⁻¹) and beating cross frequency (BCF, in Hz). Data from fast and medium-velocity spermatozoa (VCL > 40 µm s⁻¹) were used to compare motility parameters between groups.

Statistical analysis

A one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to determine the effect of time on the relative variation of body weight, milt volume, sperm density, seminal plasma osmolality and pH, and sperm motility parameters measured by CASA. A least significant difference (LSD) procedure was used for comparisons between means at a 0.05 significant level. All values are expressed as mean ± standard error (SEM).

Results

Weight of eels and percentage of spermiating males

Although no significant differences were found in any case, increasing tendencies in the body weight during the first weeks of treatment (probably due to gonadosomatic index increase) were observed in all the treated groups, especially in A-, C- and D-treated eels, but not in the control group. Subsequently, a decrease in eel weight was detected in all the groups, including the control group, until the end of treatment, possibly as a consequence of eels starving (Fig. 1a–f).

Spermiation started in all the hormone-treated groups during the sixth week of treatment. The highest percentage of spermiating males (100%) was obtained with treatment A, and was maintained until the 12th week of treatment (Fig. 1a). Treatments B and D produced around 80% of spermiating males during the same period (6–7 to 12th week) (Fig. 1b and d). Treatment C led to 100% of spermiating males at the sixth week of treatment, reducing this percentage further on (Fig. 1c). Treatment E caused a maximum percentage of 60% spermiating males during the seventh week of treatment (Fig. 1e), while control fish never produced sperm (Fig. 1f).

Milt volume

Milt volume increased from the beginning of the spermiation in the A-, B- or D-treated fish, showing the highest volumes (3–4 mL 100 g⁻¹ fish) after 12 weeks of treatment (Table 2). The lowest volumes were recorded in the groups that received interrupted treatments (C, E).

Sperm density

Sperm density was not significantly different between A-treated fish and the rest of fish, showing an increase from one spermatozoa mL⁻¹ × 10⁹ at the fifth week to 1.5–2.5 spermatozoa mL⁻¹ × 10⁹ during the 12th week of treatment (Table 2).

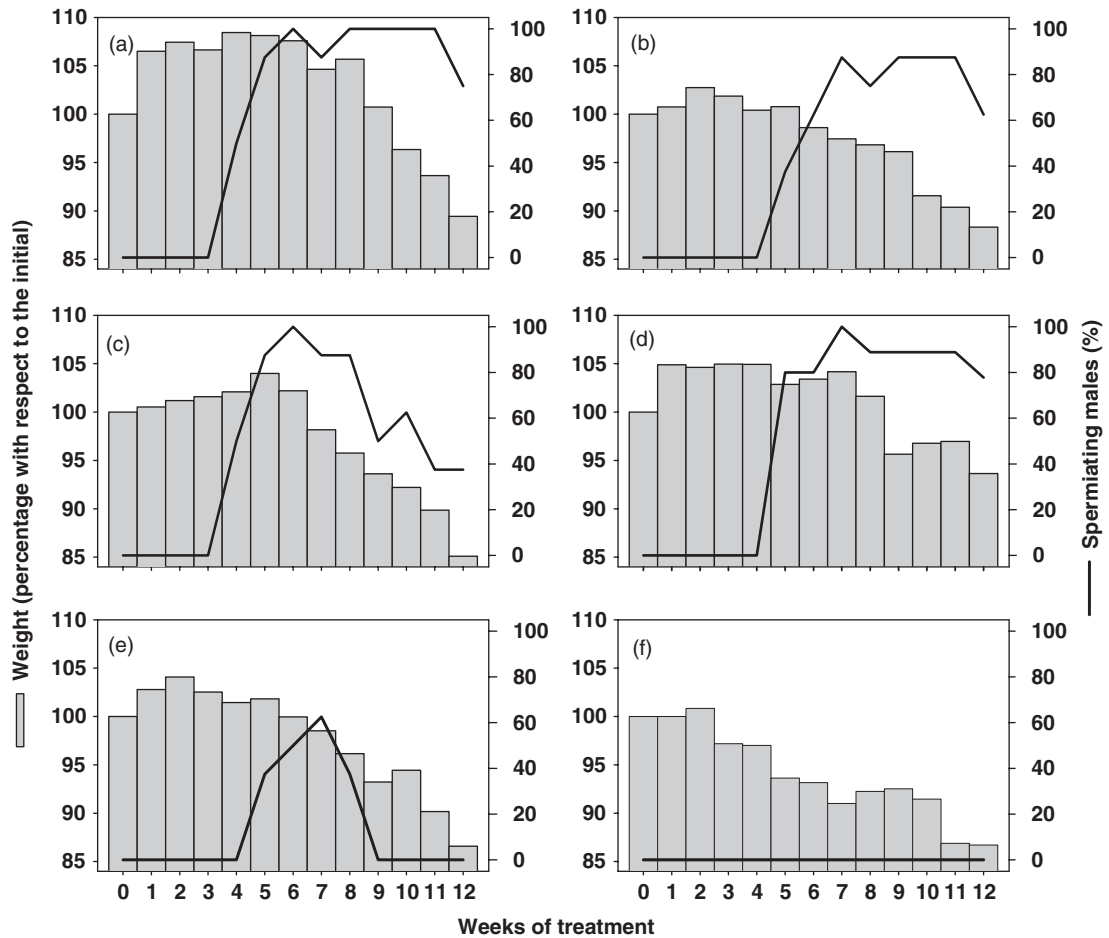


Figure 1 Evolution of weight (percentage with respect to the initial) and percentage of spermiating males during the 12th weeks of treatment. (a) 1.5 IU hCG (human chorionic gonadotropin) g^{-1} fish at weekly injections; (b) 0.75 IU hCG g^{-1} fish weekly; (c) 1.5 IU hCG g^{-1} fish weekly until beginning of spermiation; (d) 1.5 IU hCG g^{-1} fish every 2 weeks; (e) 1.5 IU hCG g^{-1} fish weekly during the first 3 weeks and (f) control group.

Osmolality and pH of seminal plasma

Seminal plasma osmolality and pH of the A-treated fish showed values between 320–330 mOsm kg^{-1} and 8.5–8.7 respectively (Table 2). Treatments B and D induced similar results, while C-treated fish showed mean values beyond these ranges (Table 2). The low sperm volumes obtained in this group made it impossible to develop pH measurements in part of the samplings.

Sperm motility

Samples from A–D groups showed between 44% and 54% mobile spermatozoa and between 10 and 15% fast spermatozoa (Table 3). Eight sperm samples were obtained from E-treated males during the experiment. However, all these samples showed 0% mobile sper-

matozoa and, therefore, no data from this group could be considered in the motility parameter analysis.

No significant differences were found in the spermatozoa straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) or the angular velocity (VAP), neither spermatozoa beating cross frequency (BCF) between A–D groups.

When data from both interrupted treatments (C, E) were excluded from the statistical analysis, no significant differences were observed between the results from A, B and D groups.

Discussion

All the assayed treatments induced male spermiation, even interrupted treatments (C: fish receiving hormone weekly just until the onset of spermiation;

Table 2 Milt volume (mL 100 g⁻¹ fish), sperm concentration (spermatozoa mL⁻¹ × 10⁹) and seminal plasma pH and osmolality (mOsm kg⁻¹) produced by eel males through A–E treatments

Sperm volume	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.0 ± 0.2	1.2 ± 0.4	2.8 ± 0.5 a	2.0 ± 0.4	3.4 ± 0.8	2.9 ± 0.5 a	4.0 ± 0.6 a	3.3 ± 0.7 ab
B	1.3 ± 0.9	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.5 b	1.8 ± 1.0	2.8 ± 0.9	1.9 ± 0.4 a	4.0 ± 1.1 a	4.1 ± 1.1 a
C	1.2 ± 0.4	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1 b	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1 b	0.2 ± 0.1 b	0.6 ± 0.4 b
D	0.6 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.4 b	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.5	2.2 ± 0.5 a	1.7 ± 0.3 ab	4.6 ± 0.7 a
E	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2 b	0.1 ± 0.1	–	–	–	–
<i>Sperm density</i>								
A	0.9 ± 0.2	1.0 ± 0.2	2.3 ± 0.7 a	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.5
B	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.2 b	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.5	2.5 ± 0.7	2.1 ± 0.4	1.4 ± 0.4
C	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.3 ab	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.6 ± 0.3	2.7 ± 0.4	2.3 ± 0.4
D	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.2 ab	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.1
E	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.3 ab	1.0 ± 0.5	–	–	–	–
<i>Seminal plasma osmolality</i>								
A	324 ± 4	330 ± 5	332 ± 3	318 ± 4	320 ± 2	319 ± 7	332 ± 2	323 ± 1
B	323 ± 19	321 ± 2	330 ± 4	330 ± 7	334 ± 4	345 ± 5	327 ± 3	327 ± 1
C	338 ± 8	334 ± 6	320 ± 4	312 ± 11	351 ± 10	350 ± 10	327 ± 0	331 ± 0
D	320 ± 10	339 ± 3	312 ± 9	315 ± 3	332 ± 6	329 ± 3	328 ± 4	322 ± 3
E	322 ± 0	355 ± 25	349 ± 2	315 ± 0	–	–	–	–
<i>Seminal plasma pH</i>								
A	8.5 ± 0.1	8.7 ± 0.0	8.7 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.7 ± 0.1	8.6 ± 0.2	8.6 ± 0.1	8.7 ± 0.1
B	8.5 ± 0.0	8.7 ± 0.1	8.9 ± 0.2	8.5 ± 0.1	8.5 ± 0.0	8.8 ± 0.0	8.6 ± 0.2	8.7 ± 0.1
C	8.4 ± 0.1	8.9 ± 0.0	–	8.5 ± 0.2	8.8 ± 0.0	–	–	8.6 ± 0.0
D	8.7 ± 0.0	8.7 ± 0.1	8.7 ± 0.1	8.5 ± 0.1	8.8 ± 0.1	8.7 ± 0.0	8.8 ± 0.0	8.8 ± 0.0
E	8.4 ± 0.0	8.6 ± 0.0	–	–	–	–	–	–

Different letters indicate significant differences in every sampling.

Table 3 Sperm motility parameters measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) (*Sperm Class Analyzer*[®]; Imagesp, Barcelona, Spain) on samples obtained from males treated with different hormonal treatments (A–E), including percentage of motile spermatozoa, curvilinear velocity (VCL), straight line velocity (VSL), angular velocity (VAP) and beating cross frequency (BCF)

	A	B	C	D	E
Samples (<i>n</i>)	22	9	6	20	8
Motile spermatozoa (%)	49.5 ± 2.5	44.4 ± 3.7	54.4 ± 7.0	49.7 ± 2.0	(0)
Fast spermatozoa* (%)	15.7 ± 2.8	10.1 ± 3.7	10.2 ± 2.0	12.0 ± 1.5	–
VSL (μm s ⁻¹)	26.1 ± 3.3	19.4 ± 4.5	27.5 ± 7.8	23.1 ± 1.9	–
VCL (μm s ⁻¹)	125.5 ± 15.6	97.6 ± 19.0	91.8 ± 11.8	98.5 ± 12.7	–
VAP (μm s ⁻¹)	44.6 ± 3.7	34.3 ± 5.3	43.4 ± 6.5	41.2 ± 3.1	–
BCF (Hz)	17.0 ± 1.2	25.7 ± 6.4	13.3 ± 1.9	13.5 ± 0.9	–

*Spermatozoa showing VCL > 40 μm s⁻¹.

E: fish treated just during the first 3 weeks) induced sperm production at least in part of the treated males. This last result is in agreement with a previous study by Khan *et al.* (1987), who reported stimulation of spermiation after 3 months by supplying just one single injection but using an hCG dose (250 IU to 40–110 g fish) higher than the one administered in the present study (1.5 IU g⁻¹ to 140 g fish). Similarly, previous studies carried out in the Japanese eel (Miura *et al.* 1991; Ohta & Tanaka 1997; Ohta *et al.*

1997a) administering single but higher hCG doses (5, 8 or 4 IU g⁻¹ respectively) produced spermiation in part of the treated males (i.e.: 3 out of 18, or 1 out of 7). In fact, spermiation started during the 6th week of treatment in all the groups in the present study, but the highest percentages of spermiating males (80–100%) were obtained and maintained during 5–6 weeks only by treatments A (1.5 IU hCG g⁻¹ fish), B (half hormone dosage) and D (biweekly administration). Likewise, the lowest volumes of milt were

recorded in the groups that received interrupted treatments, reaching zero in the case of E-treated fish from the ninth week.

The sperm density values were slightly higher in comparison with previous studies (Pérez *et al.* 2000, 2003). In the case of C-treated males, high sperm densities and low sperm volumes could be explained by a lack of hydration, possibly as a consequence of a hormonal failure at the maturation-inducing steroids (MIS) synthesis caused by the interruption of gonadotropin administration (Asturiano, Sorbera, Ramos, Kime, Carrillo & Zanuy 2002). Moreover, treatments A, B and D caused seminal plasma osmolality and pH values, and changes throughout the treatment similar to those previously described by Pérez *et al.* (2003), while samples from C-treated fish showed values beyond these ranges, probably as a consequence of the uncontrolled MIS production.

On the other hand, treatment E produced immotile spermatozoa while treatments A–D induced 44–54% motile cells. When motility parameters were analysed, samples from A-treated males showed relatively higher, although not significant, VCL values. This result acquires a higher relevance considering the study by Rurangwa, Kime, Ollevier and Nash (2004), who reviewed different studies carried out using sperm-tracking systems in African catfish, carp, goldfish, roach, Eurasian perch, trout and lake sturgeon, and concluded that the most useful parameters of velocity are the VCL (the actual velocity along the trajectory) and the VSL (the straight line distance between the start and end points of the track divided by the time of the track).

On the contrary, no significant differences were observed between the results from A, B and D groups when they were compared without considering the data from both interrupted treatments.

All these results indicate that a short hormonal treatment may be sufficient to bring about sexual maturation and spermiation, but a continuous supply of hormone is necessary to maintain both the sperm production and the sperm quality. Similarly, Ohta and Tanaka (1997) reported that the spermiogenic response of males to hCG depends on their ability to produce androgen in their testes, and after studying the hCG and 11-ketotestosterone serum levels after the hCG injection, they concluded that the maintenance of a high concentration of hCG in the body for more than 21 days, by repeated injections, appeared to be essential for the effective induction of testicular maturation in Japanese eels.

It can be concluded that treatment A (1.5 IU hCG g⁻¹ fish) induced results similar to those previously described by Pérez *et al.* (2000, 2003): 100% of spermating males over several weeks. In fact, treatment A induced the highest percentage of spermating males and produced the highest number of sperm samples in the present study. It also showed better motility parameters, at least in comparison with interrupted treatments.

Treatments B (half-hormone dosage: 0.75 IU hCG g⁻¹ fish) and D (biweekly administration) seem to be below the optimal limits of hormone, which was translated into just 80% of spermating males. This result could be explained by the individual differences in the rate of clearance of hCG (Ohta & Tanaka 1997).

On the other hand, interrupted treatments, E (just during 3 weeks) and C (just until the beginning of the spermiation), led to the worse results. Treatment E, even leading to 60% of spermating males, seems to be under the time limit necessary to induce good sperm, coinciding with the limit proposed by Ohta and Tanaka (1997).

The longer treatment received by the C-treated fish (until the sixth week of treatment) was sufficient to induce 100% of spermating males, but when hCG administration ceased, this percentage was reduced further, the sperm volume was reduced and the seminal plasma pH and osmolality showed abnormal values. The fact that C-treated spermating males several weeks after the last injection (i.e.: 40% during the 12th week) can be explained by the low rate of clearance of hCG in the eel, as reported by Fontaine, Dufour, Tanguy, Khan, Cédard and Leloup-Hatey (1984).

Some specific studies have been carried out on the characteristics of the movement of the European eel spermatozoa. In his works, Woolley (1997, 1998) described different aspects of the kinematics of movement, the flagellum structure and its vibratile and rotatory movement bending. The VCL values obtained in the present study ($125 \pm 15 \mu\text{m s}^{-1}$), are comparable with spermatozoa swimming velocities previously reported in this species: Gibbons, Baccetti and Gibbons (1985) reported $134 \pm 19 \mu\text{m s}^{-1}$, while Woolley (1998) reported $160 \mu\text{m s}^{-1}$.

It is very convenient to use sea water as spermatozoa activation medium from a practical point of view because it is easily available everywhere. However, the artificial sea water used in the present study did not contain sodium bicarbonate and a lower concentration of KCl in comparison with activation media used by Japanese authors. However, even using this concentration of KCl (9.4 mM), the percentage of

motile cells was around 50%, similarly to the data reported by Ohta, Ikeda and Izawa (1997b) and Ohta, Kagawa, Tanaka and Unuma (2001) after the dilution of samples in hyperosmotic solutions.

Tanaka *et al.* (2002a); Tanaka, Zhang, Yamada, Okamura, Horie, Utoh, Mikawa, Oka and Kurokura (2002b) suggested that NaHCO_3 has an inhibitory role in the Japanese eel spermatozoa motility, as a consequence of its dissociation in some products, which may influence intracellular pH. Two years later, Tanaka, Utoh, Yamada, Horie, Okamura, Akazawa, Mikawa, Oka and Kurokura (2004) suggested that NaHCO_3 has a dual role in the control of spermatozoa motility depending on its dissociation products: one inhibiting role mediated by CO_2 and one activating role mediated by HCO_3^- .

In one of their previous studies, Tanaka *et al.* (2002b) showed that the CO_2 concentration is low (around 0.2 mM) while the concentration of HCO_3^- is high (aprox. 25 mM) in media at pH 8.2, and then an activating role should be expected. However, Tanaka *et al.* (2002b) found that NaHCO_3 markedly depressed sperm motility under the suitable physical conditions for the initiation of sperm motility (pH 8.2, 800–1000 mOsm kg^{-1}), coinciding with our own activating medium conditions. These unclear results, together with some differences detected in the seminal plasma pH between Japanese and European eels, made us decide not to include NaHCO_3 in our sperm-activating medium. However, keeping in mind the Tanaka's team results, the inclusion of higher concentrations of K probably could increase the percentage of motile cells, but makes the standardization of working conditions more difficult. This extreme, together with the proportion of NaHCO_3 dissociation products at the European eel seminal plasma pH (approximately 8.5) should be reconsidered in future studies.

Seminal plasma osmolality and pH of the A-treated fish showed values between 320 and 330 mOsm kg^{-1} and 8.5–8.7, similar to those previously reported (Pérez *et al.* 2003; Asturiano *et al.* 2005). Treatments B and D induced similar results, while C-treated fish and the few samples obtained from E-treated fish, showed mean values beyond these ranges, especially in the case of osmolality, with values of around 350 mOsm kg^{-1} .

Probably pH and osmolality cannot be considered as very good indicators of sperm quality, but during the spermiation the expected range of values is clear, and values beyond these ranges can be considered as indicators of abnormalities.

Acknowledgments

This work was carried out in collaboration with Valenciana de Acuicultura, S.A., and was supported by the Generalitat Valenciana (GV04A-508, and a grant to D.S.P.), the Universidad Politécnica de Valencia (20030488) and the Spanish Ministry of Science and Technology (AGL2003-05362-CO2-01, including FEDER funds). J.F.A. is supported by a Ramón y Cajal research contract, cofinanced by the latter organizations. F.M.-J. is supported by the Centro de Investigación y Tecnología Animal (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias).

References

- Asturiano J.F., Sorbera L.A., Ramos J., Kime D.E., Carrillo M. & Zanuy S. (2002) Group-synchronous ovarian development, spawning and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina* **66**, 273–282.
- Asturiano J.F., Pérez L., Marco-Jiménez F., Olivares L., Vicente J.S. & Jover M. (2003) Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 501–502.
- Asturiano J.F., Pérez L., Pérez-Navarro F.J., Garzón D.L., Martínez S., Tomás A., Marco-Jiménez F., Vicente J.S. & Jover M. Optimization trial of methods for induction of spermiation in European eel (*Anguilla anguilla*) and test of different sperm activation media. In: *Aquaculture Europe 2004 Book of Abstracts. Biotechnologies for quality*. Barcelona, Spain 2004, pp. 130–131. Aquaculture Society Special Publication No. 34.
- Asturiano J.F., Pérez L., Garzón D.L., Marco-Jiménez F., Peñaranda D.S., Vicente J.S. & Jover M. (2005) Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry* (in press).
- Beniarsz K. & Epler P. (1977) Investigations on inducing sexual maturity in the male eel *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology* **10**, 555–559.
- Billard R. & Ginsburg S.A. (1973) La spermiogenese et le spermatozoïde de *Anguilla anguilla* L. étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* **13**, 523–534.
- Boëtius I. & Boëtius J. (1967) Studies in the European Eel, *Anguilla anguilla* (L.). Experimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri -og Havundersogelser* **4**, 339–405.
- Cifuentes J.L., Torres M.P. & Frías M. (1986) La composición química del agua del mar. In: *El océano y sus recursos II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química* (<http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen1/ciencia2/12/htm/sec.16.html>).
- Dollerup J. & Graver C.M. (1985) Repeated induction of testicular maturation and spermiation, alternating with

- periods of feeding and growth in silver eels, *Anguilla anguilla* (L.). *Dana* **4**, 19–39.
- Feunteun E. (2002) Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological Engineering* **18**, 575–591.
- Fontaine Y.A., Dufour S., Tanguy G., Khan I.A., Cédard L. & Leloup-Hatéy J. Clairances métaboliques de la gonadotrope chorionique humaine (hCG) et de la gonadotrope de carpe (cGTH) chez un poisson téléostéen, l'anguille. Colloque Physiologie des Poissons. In: *Actes des Colloques INRA: Physiologie des poissons*. Paimpont, France, pp. 10.
- Gibbons B.H., Baccetti B. & Gibbons I.R. (1985) Live and reactivated motility of the 9+0 flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Motility* **5**, 333–350.
- Kennedy C.R. & Fitch D.J. (1990) Colonisation, larval survival, and epidemiology of the nematode *Anguillicola crassus*, parasite in the eel *Anguilla anguilla* in Britain. *Journal of Fish Biology* **36**, 117–131.
- Khan I.A., Lopez E. & Leloup-Hatéy J. (1987) Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). *General and Comparative Endocrinology* **68**, 91–103.
- Koops H. & Hartmann F. (1989) *Anguillicola* infestations in Germany and in German eel imports. *Journal of Applied Ichthyology* **1**, 41–45.
- Leloup-Hatéy L., Oudinet J.P. & Lopez E. (1985) Testicular steroidogenesis during gonadotropin-induced spermatogenesis in male European eel (*Anguilla anguilla* L.). In: *Current Trends in Comparative Endocrinology* (ed. By B. Softs & W.N. Holmes), pp. 229–239. Hong Kong University Press, Hong Kong, China.
- Meske C. (1973) Experimentally induced sexual maturity in artificially reared male eels (*Anguilla anguilla* L.). In: *Genetics and Mutagenesis of Fish* (ed. by J.H. Schröder), pp. 161–170. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Miura T., Yamauchi K., Nagahama Y. & Takahashi H. (1991) Induction of spermatogenesis in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science* **8**, 63–73.
- Müller T., Urbányi B., Váradi B., Binder T., Horn P., Bercsényi M. & Horváth A. (2004) Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of the World Aquaculture Society* **35**, 240–46.
- Müller T., Baska F., Niklesz C., Horn P., Váradi B. & Bercsényi M. (2005) The testis histology of artificially matured European eel (*Anguilla anguilla* L.) at the end of sexual maturation, and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. *Acta Biologica Hungarica* **56**, 169–172.
- Ohta H. & Tanaka H. (1997) Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* **153**, 123–134.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K. & Hirose K. (1996) Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fisheries Science* **62**, 44–49.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., Iinuma N. & Hirose K. (1997a) Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* **17**, 163–169.
- Ohta H., Ikeda K. & Izawa T. (1997b) Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *The Journal of Experimental Zoology* **277**, 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**, 339–351.
- Pérez L., Asturiano J.F., Tomás A., Zegrari S., Barrera R., Espinós J.F., Navarro J.C. & Jover M. (2000) Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology* **57**, 1488–1504.
- Pérez L., Asturiano J.F., Martínez S., Tomás A., Olivares L., Mocé E., Lavara R., Vicente J.S. & Jover M. (2003) Ionic composition and physio-chemical parameters of the European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry* **28**, 221–222.
- Rurangwa E., Kime D.E., Ollevier F. & Nash J.P. (2004) The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1–28.
- Saksena D.N., Miura T., Jiang J. & Nagahama Y. (1995) A rapid activation of immature testis of Japanese eel (*Anguilla japonica*) by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Journal of Biosciences* **20**, 675–689.
- Tanaka S., Zhang H., Horie N., Yamada Y., Okamura A., Utoh T., Mikawa N., Oka H.P. & Kurokura H. (2002a) Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology* **60**, 139–146.
- Tanaka S., Zhang H., Yamada Y., Okamura A., Horie N., Utoh T., Mikawa N., Oka H.P. & Kurokura H. (2002b) Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology* **60**, 1134–1141.
- 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**, 780–787.
- Szabó G., Müller T., Bercsényi M., Urbányi B., Kucska B. & Horváth A. (2005) Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biologica Hungarica* **56**, 173–175.
- Woolley D.M. (1997) Studies on the eel sperm flagellum I. The structure of the inner dynein arm complex. *Journal of Cell Science* **110**, 85–94.
- Woolley D.M. (1998) Studies of the eel sperm flagellum. 3. Vibratile motility and rotatory bending. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **39**, 246–255.

Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm

J.F. Asturiano^{1,*}, L. Pérez¹, D.L. Garzón¹, F. Marco-Jiménez², D.S. Peñaranda¹, J.S. Vicente³ and M. Jover¹

¹Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia, Spain; ²Centro de Investigación y Tecnología Animal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Ctra Náquera-Moncada Km 4,5, 46113, Moncada, Valencia, Spain; ³Grupo de Mejora Animal, Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción, Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n 46022, Valencia, Spain; *Author for correspondence: (Phone: +34-96-387-70-07 (74355); Fax: +34-96-387-74-39; E-mail: jfastu@dca.upv.es)

Accepted 1 August 2005

Key words: *Anguilla*, CASA, cryopreservation, European eel, sperm

Abstract

The high sperm density, together with the short spermatozoa swimming time, makes European eel sperm manipulation and assessment for quality difficult. Two diluting media (K15 and K30) previously designed for Japanese eel sperm were tested. After 24 h, European eel sperm showed significant reduction in the percentage of motile spermatozoa after activation and different motility parameters (VAP, angular velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; BCF, beating cross frequency), concluding that these media are not suitable to preserve the sperm of this species. After a hormonal treatment to induce spermiation, sperm volume, density and motility were recorded at weekly samplings. The variation of the osmolality (325–330 mOsm kg⁻¹), pH (8.4–8.6) and the ionic composition (concentration of Na⁺, K⁺, Mg²⁺ and Ca²⁺) of the seminal plasma were registered. Physio-chemical results were related with sperm quality throughout the treatment, to determine which must be the suitable characteristics of one extender for the sperm of this species, and to find the best conditions to obtain suitable cryopreservation media for European eel sperm. K⁺ concentration increased, while Ca²⁺ and Mg²⁺ concentrations showed a progressive reduction in correlation with the sperm quality improvement. Na⁺ showed a decreasing, but not significant tendency. P1 and P2 freezing media were designed considering the physio-chemical parameters as well as the ionic composition shown by the best quality sperm samples, and then compared with the previously described solutions, TNK and K30. Sperm quality was determined, checking the percentage of motile spermatozoa and motility parameters using computer-assisted sperm analysis (CASA) software. Samples were frozen after dilution (1:5, 1:20, 1:100) in different freezing media supplemented with 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). After thawing, samples frozen with low dilution ratio (1:5) in TNK and P1 media showed higher, although not significant, spermatozoa survival (35.5 ± 14.5 and 36.6 ± 6.7%). The addition of L- α -phosphatidylcholine to the media seems to have a positive effect, as reported in the Japanese eel.

Introduction

The intensive capture of elvers and eels in the river outlets during recent decades has diminished the

European eel populations in their habitats. Also, the changes in its ecologic nest and the pollution of continental waters has exacerbated this effect (Feunteun 2002). The eel has an important

commercial value in some European and Asian countries, where it is sold at high cost, raising the over-exploitation of the brood stock and elvers to be exported.

The European eel does not mature sexually in captivity. Therefore, studies are warranted to develop techniques to induce European eel reproduction for the reliable supply of larvae (Amin et al. 1997; Pérez et al. 2000; Pedersen et al. 2003).

The sperm of this species shows a high density ($3\text{--}6 \times 10^9$ spermatozoa ml^{-1} ; Pérez et al. 2000) and the time of spermatozoa motility is very short after activation, from a few seconds to a few minutes (Gibbons et al. 1983, 1985; Woolley 1998). These characteristics make the sperm manipulation and its quality assessment difficult. These problems have been resolved in other fish species by diluting the sperm before using it to fertilize with an extender media having the same physio-chemical characteristics of the seminal plasma, which do not activate the sperm motility (Billard and Cosson 1992).

In Japanese eel (*Anguilla japonica*), several sperm conservation media have been developed using the chemical composition of the seminal plasma, obtaining conservation times in refrigeration of over 3 weeks (Ohta and Izawa 1995). Moreover, Ohta and Izawa (1996) reported that the use of diluted sperm could increase the fertilization rate. Moreover, the use of diluting solutions could extend the life of refrigerated sperm and even increase the spermatozoa motility after incubation time (Ohta et al. 2001).

These diluting media or extenders could be used for sperm freezing after the addition of some cryoprotectants. In fact, methods for the hormonal induction of gonad maturation in the European eel usually take several weeks (Amin 1997; Pérez et al. 2000; Asturiano et al. 2002a; Pedersen 2003, 2004) and unsynchronized maturation can successfully avoid egg fertilization. The sperm cryopreservation allows the availability of gametes at any time and the selection of the best reproducers to make sperm banks, avoiding the risk of infection transmission.

Sperm tracking systems as CASA were initially developed to examine sperm quality in mammals and birds, but in recent years it has been applied to fish sperm (Kime et al. 2001; Rurangwa et al. 2004; Van Look and Kime 2004). In the present study, physio-chemical characteristics as well as the ionic

composition of seminal plasma of European eel sperm were evaluated and related with sperm quality. Once determined the best conditions, different freezing media for the cryopreservation of European eel sperm were designed. CASA was applied both to sperm samples diluted in extenders and to sperm samples after cryopreservation in different freezing media and dilution factors, to compare the sperm condition objectively, determining the percentage of motile spermatozoa and different motility parameters (VAP, angular velocity; VCL, curvilinear velocity; VSL, straight line velocity; BCF, beating cross frequency).

Materials and methods

Animals

Twenty nine farmed male eels (body weight: 148 ± 4 g) from the fish farm Valenciana de Acuicultura, S.A. (Puzol, Valencia; East coast of Spain) were moved into our facilities. Fish were gradually acclimatized to sea water (salinity: 38‰; temperature: 20–21 °C).

Eels were tagged with passive integrated transponders (P. I. T. tags) and injected into the epiaxial muscle for individual identification and distributed in three 96 l aquaria. Fish were fasted during the experiment.

Hormonal treatment and samples collection

Males were hormonally treated for the induction of maturation and spermiation with hCG as described by Pérez et al. (2000). Briefly, once a week anesthetized fish (benzocaine; 60 mg l^{-1}) were weighed and hormonally treated with intraperitoneal injections of hCG (1.5 IU g^{-1} BW) for 14 weeks.

From the seventh week of treatment, when males began sperm production, fish were sampled 24 h after hormone administration because it has been observed that the best quality sperm is released at this time (Pérez et al. 2000).

Before collecting samples, the genital area was cleaned with freshwater and thoroughly dried to avoid contamination of samples with feces, urine and sea water. Then, a gentle abdominal pressure was applied. Samples were collected using a vacuum pump with a retention trap consisting of

graduated tubes to measure the volume. Samples were maintained at 4 °C until the quality test and freezing.

Evaluation of the sperm motility and samples selection

A first fast subjective evaluation of the sperm motility was made, to have an initial evaluation of the quality of samples and compare it with the seminal plasma physio-chemical parameters and ionic composition.

Two microliter of sperm were mixed with 2 ml of sea water (35% salinity) as the activating solution (1:1001). Motility was characterized using an arbitrary scale described by Chambeyron and Zohar (1990), in which 0 represented no motile sperm meanwhile I: < 25%, II: 25–50%, III: 50–75%, IV: 75–90% and V: 90–100% of the cells were vigorously motile.

In this way, samples showing more than 30% motile cells were selected for the extenders experiment, while only samples showing more than 50% motile cells (III or higher according the motile scale) were selected for the cryopreservation experiment.

Diluting solutions

Two extenders, previously described for the Japanese eel (Ohta and Izawa 1995; Ohta et al. 2001), were used because both media showed good results in sperm quality maintenance for this species; K15 medium containing (in mM): NaCl 120.6, NaHCO₃ 20, KCl 15, MgCl₂ 1.6, CaCl₂ 1.3, TAPS 20, pH 8.1; and K30 medium containing (in mM): NaCl 105.6, NaHCO₃ 20, KCl 30, MgCl₂ 1.6, CaCl₂ 1.3, TAPS 20, pH 8.1. Observations in triplicate were evaluated by CASA at 24, 48 and 72 h after dilution in K15 or K30 diluting media.

Volume and sperm density

Volume was measured directly at the moment of sampling, collected in graduated tubes and noted as ml 100 g⁻¹ fish.

To measure density, samples were diluted 1:1000 or 1:10,000 in sea water. Ten microliter of the dilution were taken for counting on a Thoma hemocytometer and expressed as spermatozoa × 10⁹ ml⁻¹.

pH measurement and osmolality

One milliliter sperm samples were centrifuged (4500 rpm, 20 min) and 50 µl of the seminal plasma were taken for osmolality measurement using an Osmomat 050 Osmometer, data were noted in mOsm kg⁻¹.

The remaining seminal plasma was used for pH measurement, and finally frozen at -40°C until the ionic composition analysis.

Ionic composition analysis of seminal plasma

The ionic composition analysis was carried out by an atomic absorption spectrophotometer Perkin–Elmer 3300. For Ca²⁺ and Mg²⁺ analyses, samples were diluted 1:10 (v/v) with a 1% lantane solution (La₂O₃). For Na⁺ and K⁺ analyses, samples were diluted 1:200 (v/v) with a 2% HCl solution, adding as internal standard KCl (5 meq l⁻¹).

Freezing media

Four different solutions as the basis for the freezing media: (1) Tanaka's modified medium (Tanaka et al. 2002a, b): (in mM) NaCl 137, NaHCO₃ 76.2, TAPS 20, pH 8.2; (2) Ohta's K30 modified medium (Ohta et al. 2001): NaCl 134.5, NaHCO₃ 20, KCl 30, MgCl₂ 1.6, CaCl₂ 1.3, pH 8.1; and two media isoionic with the European eel seminal plasma, considering the results on the ionic composition obtained in this study: (3) P1 medium: NaCl 125, NaHCO₃ 20, KCl 30, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 1, pH 8.5, and (4) P2 medium: NaCl 70, NaHCO₃ 75, KCl 30, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 1, pH 8.5. All media were supplemented with 10% v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) as a cryoprotectant. The addition of 1.4 g L-α-phosphatidylcholine 100 ml⁻¹ of freezing media, which showed a clear positive effect in Japanese eel (Tanaka et al. 2002a, b), was assayed. Different dilution factors (1:5, 1:20, 1:100) of fresh sperm in the freezing media were also evaluated.

Freezing–thawing method

Sperm selected samples were diluted 1:5, 1:20 or 1:100 in the different freezing media. Temperature of media was around 0 °C before dilution and, once the sperm was diluted, samples were immediately

introduced in 0.25 ml straws. After sealing the straws, they were frozen in liquid nitrogen vapor for 10 min and then immersed in liquid nitrogen (-196°C). Samples were kept frozen for at least 30 days until being thawed and evaluated. Samples were thawed by immersion in a water bath at 20°C for 1 min. Immediately after thawing, sperm motility was evaluated by CASA.

Evaluation of the sperm motility by CASA

Evaluation of the sperm quality was done in triplicate for each sample. Two microliter of sperm were mixed with 2 ml of sea water (35‰ salinity) as the activating solution (1:1001). Mixture was vortexed immediately and $2\ \mu\text{l}$ of shaken mixture was deposited in a slide with Teflon microwells. To prevent the spermatozoa adhering to the slides, they were previously bathed in a 10% bovine serum albumin solution (30 min, 4°C), then washed with distilled water and dried in a hood (according to D. Kime; personal communication, 2000). Observation of slides was carried out using a $20\times$ negative phase contrast objective (Nikon Plan Fluor) on Eclipse E400 Nikon microscope.

A Sony CCD-IRIS video camera transferred the image that was recorded for a later analysis through computer-assisted sperm analysis (CASA) technique, using the Sperm Class Analyzer[®] (Microptic, Barcelona, Spain). Measured parameters were: percentage of motile spermatozoa, curvilinear velocity (VCL, in $\mu\text{m s}^{-1}$), straight line velocity (VSL, in $\mu\text{m s}^{-1}$), angular velocity (VAP, in $\mu\text{m s}^{-1}$) and beating cross frequency (BCF, in Hz).

Statistical analysis

The normality and homocedasticity of data were tested with Kolmogorov–Smirnov and Bartlett tests, respectively. One way analysis of variance (ANOVA) was used to compare parameters between different samplings or the ionic composition of the samples between different sperm quality classes. Post-ANOVA multiple comparison of means was carried out using a Student–Newman–Keuls test with a signification level of 95%. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All values are expressed as mean \pm standard error (SEM).

Results

Diluting assay

Although no differences were observed after 3 h of incubation, after 24 h of the sperm incubation in K15 and K30 media, the percentage of motile spermatozoa after activation had decreased considerably (Figure 1). A similar reduction was observed in all the motility parameters (VCL, VSL, VAP and BCF) at 24–48 h of incubation. No significant differences were found comparing the results obtained using K15 and K30 diluents at any incubation time.

Sperm production and physio-chemical parameters

Spermiation started at the seventh week of treatment. The sperm volume showed no significant differences, although an increasing tendency was observed from the eighth week and throughout the weeks of treatment (Figure 2a).

The density showed no statistical differences between the sperm of the different samplings (Figure 2b), but a certain increasing–decreasing trend was shown. Likewise, Figure 2c shows that the pH values had no significant differences during the 14 weeks of assay, being constant between 8.4 and 8.6 during the whole assay.

From the eighth to the ninth weeks of treatment, the seminal plasma osmolality showed a significant decrease (Figure 2d). From this week and until the fourteenth week of treatment, osmolality was maintained around $325\text{--}330\ \text{mOsm kg}^{-1}$.

Figure 3 shows the frequency of the different quality classes of the sperm in the samples of each collecting sampling, taking into account only the spermating males. The highest quality was reached during the ninth to 11th weeks of treatment.

Ionic composition of the seminal plasma

Seminal plasma ionic composition showed significant variations correlated with the sperm quality (Table 1). K^{+} concentration increased, while Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations showed a progressive reduction in correlation with the sperm quality improvement. Na^{+} showed a decreasing, but not significant tendency.

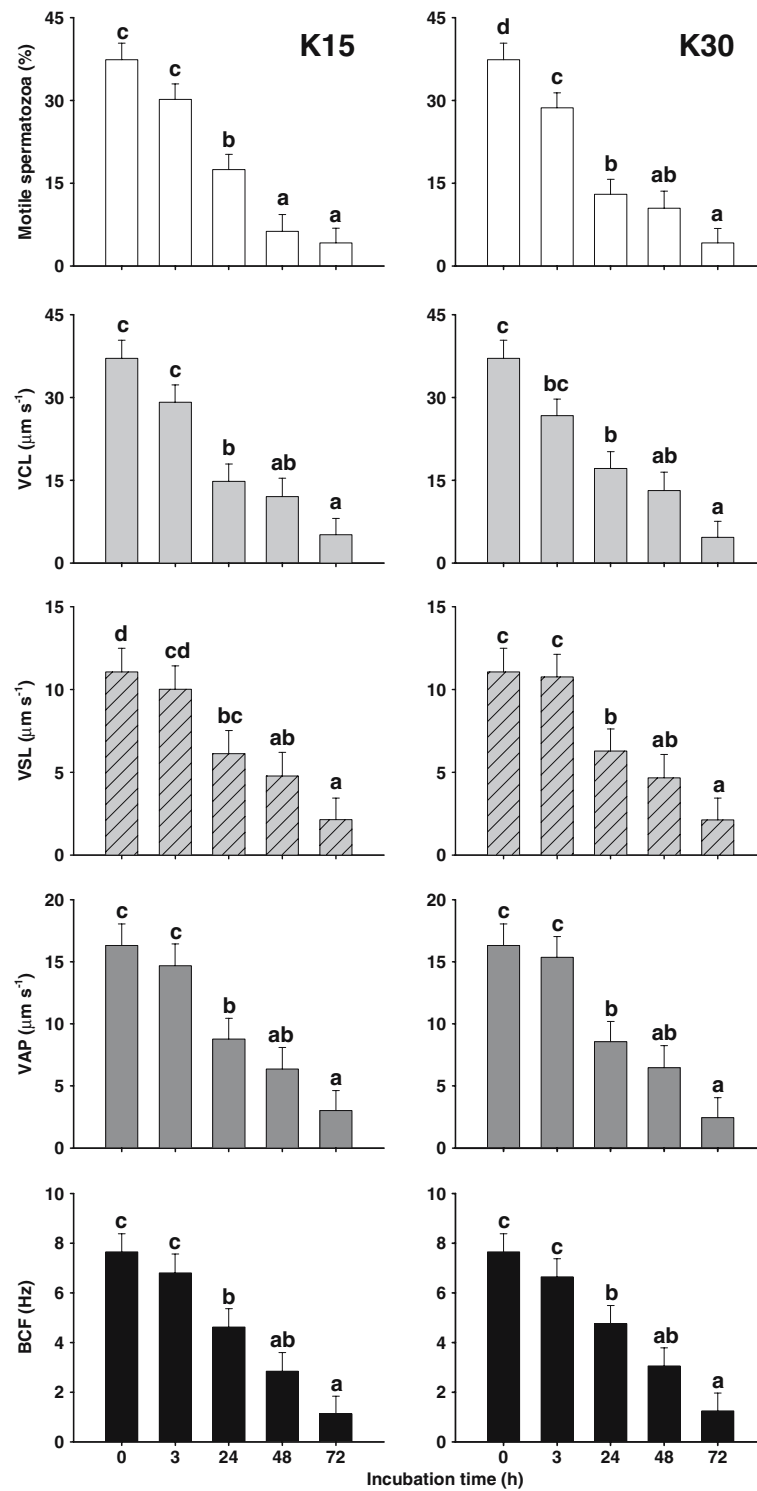


Figure 1. Percentage of motile spermatozoa and spermatozoa motility parameters (curvilinear velocity, VCL; straight line velocity, VSL; angular, VAP; beating cross frequency, BCF) after incubations of 0, 3, 24, 48 or 72 h in K15 (left) or K30 (right) diluting media. Data are expressed as mean \pm SEM.

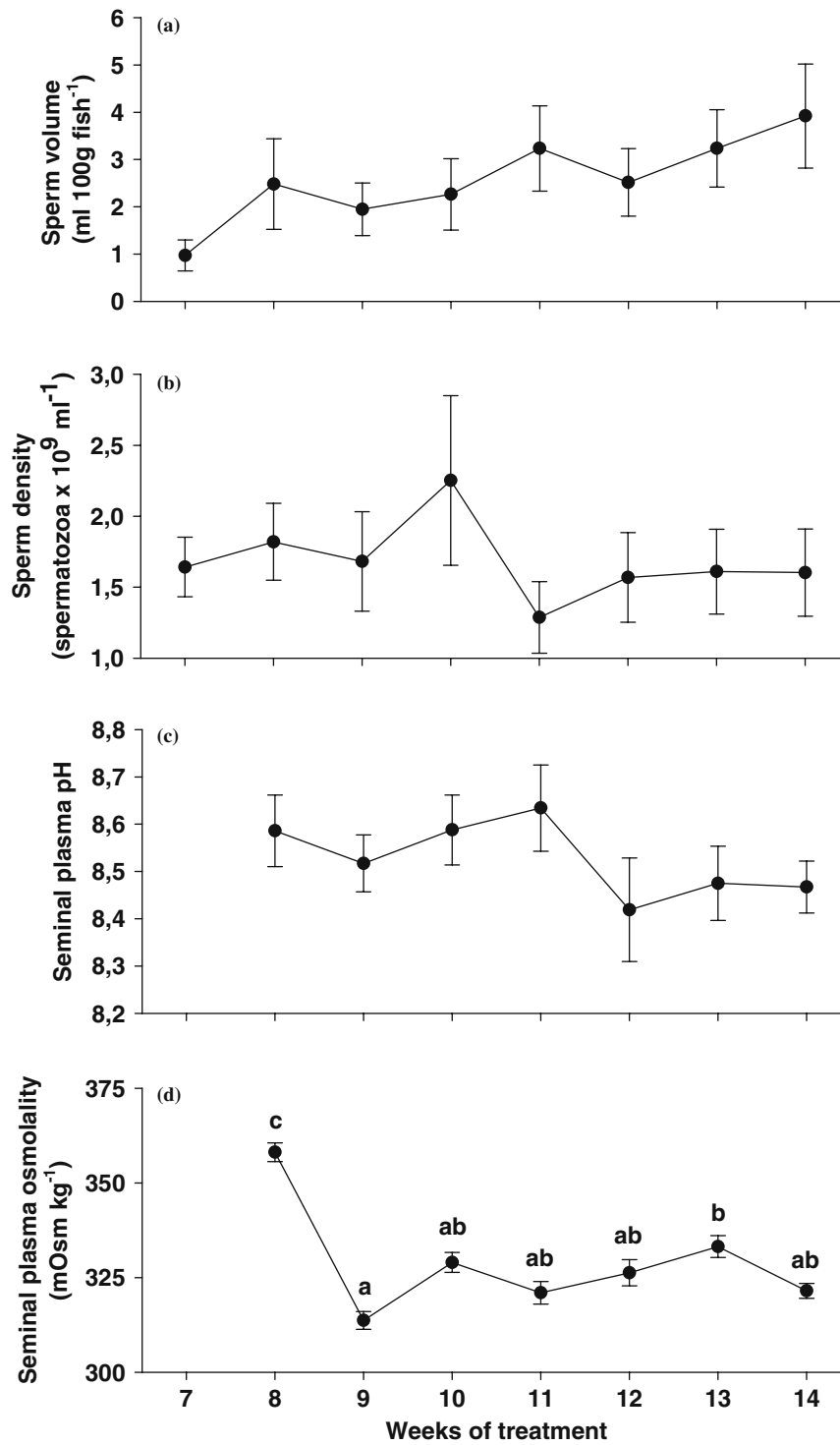


Figure 2. Variation in the sperm volume (a) and sperm density (b) produced by males from the seventh week of treatment. Changes in the seminal plasma pH (c) and osmolality (d) from the eighth week of treatment. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicates significant differences.

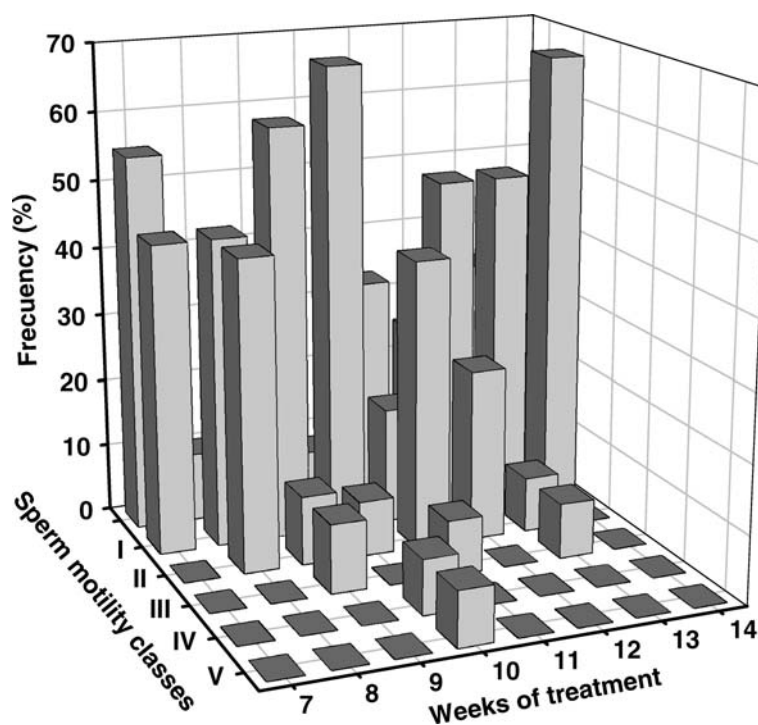


Figure 3. Frequency of sperm motility classes (classes 0–V) from the seventh week of treatment.

Freezing media

P1 and P2 freezing media were designed considering the physio-chemical parameters (pH and osmolality) as well as the ionic composition shown by the best quality sperm samples, and then compared with the previously described solutions, TNK and K30.

The P2 medium caused a mortality of 100 percent of spermatozoa in all the samples, and that is why not shown in the results.

No significant differences were found when the rest of freezing media were compared and a high variability in the results of the 5 sperm samples used was found, as is evidenced by the high stan-

dard errors of the means. However, clear tendencies were drawn by the TNK and the P1 freezing media, showing better results when they were used at 1:5 dilution: 35.5 ± 14.5 and $36.6 \pm 6.7\%$ of motile spermatozoa after thawing and higher motility parameters (Figure 4).

Likewise, the addition of *L*- α -phosphatidylcholine showed a clear positive tendency on the results, albeit without significant differences.

Discussion

The use of diluting media can give longer life to the Japanese eel sperm (Ohta and Izawa 1996) as well

Table 1. Ionic composition of European eel seminal plasma in relation with sperm motility categories, where 0 represent no motile sperm meanwhile I: <25%, II: 25–50%, III: 50–75%, IV: 75–90% and V: 90–100% of the population were vigorously motile

(mM)	0	I	II	> III
Ca ²⁺	1.00 ± 0.15 c	0.57 ± 0.06 bc	0.41 ± 0.05 ab	0.20 ± 0.02 a
Mg ²⁺	5.74 ± 1.15 b	4.09 ± 0.59 ab	2.37 ± 0.31 ab	1.54 ± 0.28 a
K ⁺	27.45 ± 2.39 b	34.90 ± 1.83 ab	37.53 ± 2.95 b	36.16 ± 2.94 ab
Na ⁺	118.18 ± 6.14	116.29 ± 3.28	113.14 ± 4.15	109.34 ± 10.30

Different letters show significant differences.

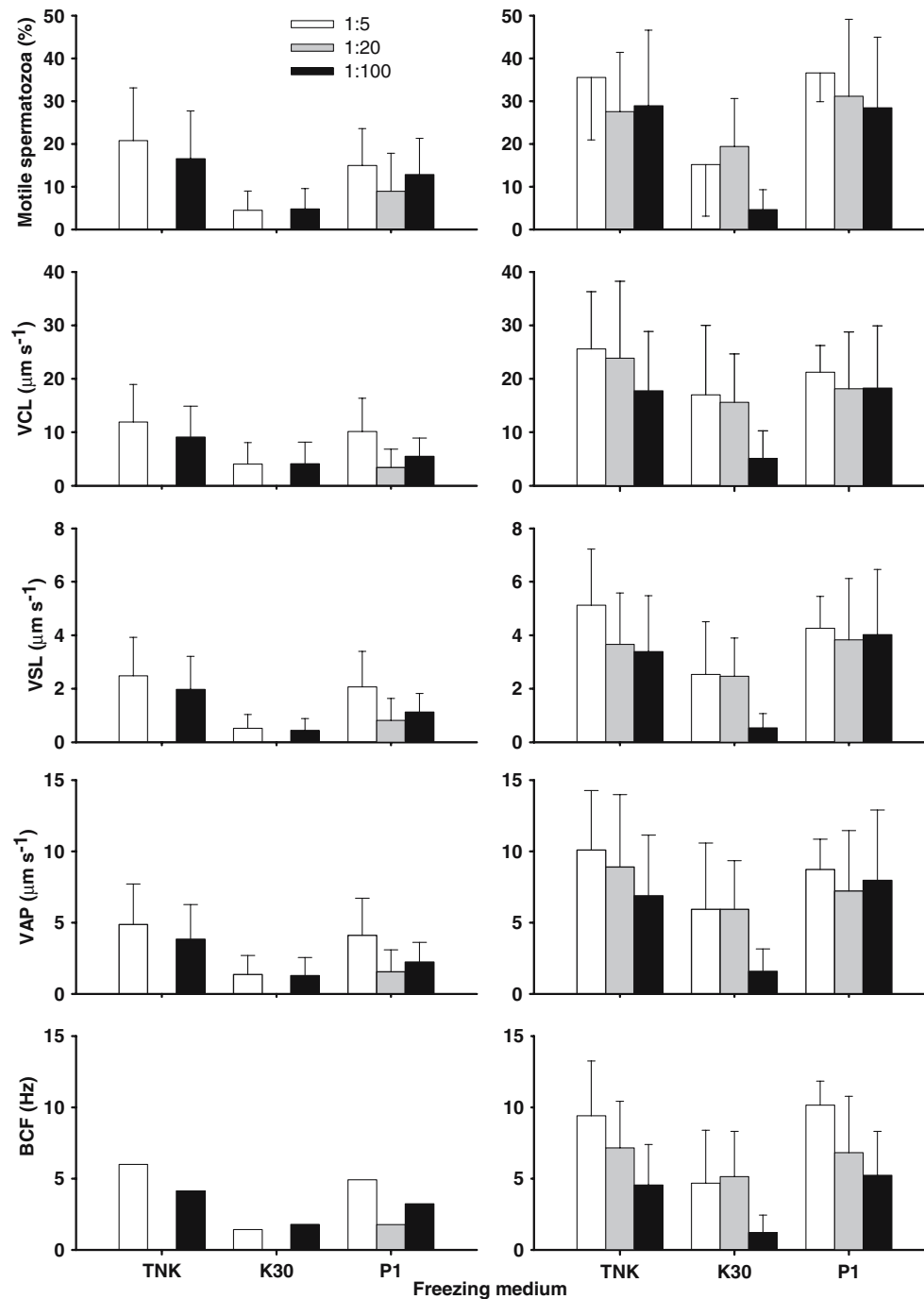


Figure 4. Percentage of motile spermatozoa and spermatozoa motility parameters (curvilinear velocity, VCL; straight line velocity, VSL; angular, VAP; beating cross frequency, BCF) estimated by CASA after freezing in TNK, K30 or P1 media, containing DMSO as cryoprotectant. Different colors indicate dilution factors (1:5, 1:20 or 1:100). Graphs on the left and right shows the results without and with the L- α -phosphatidylcholine, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM.

as increase the sperm motility after some incubation time (Ohta et al. 2001). Ohta et al. (1996) obtained a fecundation rate of 89.6% eggs, using a

sperm with 33.5% of motile spermatozoa previously diluted 100-fold in TNK (Tanaka et al. 2002a, b) artificial diluting media.

Ohta and Izawa (1995, 1996) have developed a variety of diluting media for Japanese eel sperm. They considered as a base the chemical composition of the seminal plasma of this species and changed the K^+ and HCO_3^- levels while adjusting Na^+ quantity in order to maintain constant osmolality and a pH value around 8.2. The seminal plasma osmolality in the Japanese species is $337.7 \text{ mOsm kg}^{-1}$ (Ohta and Izawa 1996). They found immotile spermatozoa when the diluting media were isosmotic ($300\text{--}400 \text{ mOsm kg}^{-1}$) with the seminal plasma, becoming active when the osmolality increased ($> 500 \text{ mOsm kg}^{-1}$), and concluded that one of the factors controlling the activation of the Japanese eel spermatozoa is the increase of osmolality, as has been well documented in several marine species with commercial interest, such as the gilthead seabream (*Sparus aurata*; Chambeyron and Zohar 1990) or the European seabass (*Dicentrarchus labrax*; Sansone et al. 2001).

In the present study, two sperm diluting media (K15 and K30) were tested, both of which had shown good results in the Japanese eel (Ohta and Izawa 1995, 1996). However, the European eel spermatozoa viability showed noticeable time-dependent reduction, concluding that these media are not suitable to preserve the sperm of this species.

The movement of European eel sperm is characterized by a rapid forward progression and rolling motion of the entire sperm, and high flagellar beat frequency. The time of sperm motility is very short, from a few seconds to a few minutes (Gibbons et al. 1983, 1985; Woolley 1998). Moreover, it has a high density of $3\text{--}6 \times 10^9$ spermatozoa ml^{-1} (Pérez et al. 2000), making the sperm manipulation and its quality assessment difficult. Specific extenders should be developed in further studies. In this regard, sperm samples from the present study were used to determine the physio-chemical characteristics and the ionic composition of the seminal plasma.

Media used for the spermatozoa activation of the Japanese eel spermatozoa have a pH of 8.2 (Miura et al. 1995; Ohta et al. 1997a). This value is near to the 8.1–8.2 measured in the sperm (Ohta et al. 1996, 2001) and similar to the 8.1–8.2 used for sperm diluting media (Ohta and Izawa 1995, 1996; Ohta et al. 1997b, c, 2001). In recent years, Ohta et al. (2000; personal communication) and Tanaka et al. (2002a, b) have developed different

protocols for the cryopreservation of Japanese eel. They obtained good percentages of post-thawing spermatozoa survival using freezing media with pH adjusted to 8.2.

The only data from European eels were published by Amin (1997). The sperm of hormonally induced males showed pH 8, although the seminal plasma pH was not measured. The results from the present study indicate that the osmolality of the European eel seminal plasma is between the $308.8 \text{ mOsm kg}^{-1}$ reported by Amin in 1997, and the $337.7 \text{ mOsm kg}^{-1}$ measured in the Japanese species (Ohta and Izawa 1996).

The absence of pH data in seminal plasma of both eel species makes comparison between them impossible, although the results obtained in the present study show a pH higher than that found in the sperm, in the diluting media or in activating media used until now in both eel species.

When the seminal plasma ionic composition was compared with the data reported by the review of Linhart et al. (1991) on four salmonids species (*Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus keta*, *Salmo salar*, *Salmo clarki*) and four cyprinids species (*Ciprinus carpio*, *Vimba vimba*, *Ctenopharingodon idella*, *Stizostedion vitreum*), it was found that the Ca^{2+} , K^+ , Na^+ and Mg^{2+} levels in the European eel are inside the ranges found in these species.

Some differences were found when a comparison was made with the Japanese eel seminal plasma ionic composition. In this last case, the seminal plasma contains (in mM): K^+ 15.2, Na^+ 149.3, Mg^{2+} 1.6 and Ca^{2+} 1.3 (Ohta et al. 2001), while the data from the present study showed that best quality sperm samples contained a higher concentration of K^+ and Ca^{2+} , a lower concentration of Na^+ , and a similar concentration of Mg^{2+} .

It should be noticed that when extenders have been used for Japanese eel sperm preservation under refrigeration, the composition of these media has been quite different from the seminal plasma composition (Ohta et al. 1997b, c) in some experiments. Thus, best results were obtained with media containing $15\text{--}45 \text{ mM } K^+$, $149.5\text{--}119.5 \text{ mM } Na^+$ (for preserving periods of 28 days) or $45\text{--}75 \text{ mM } K^+$, $119.5\text{--}89.5 \text{ mM } Na^+$ (in the case of preserving periods until 7 days) (Ohta and Izawa 1996; Ohta et al. 2001). These ranges of the K^+ and Na^+ concentrations used for the Japanese eel extenders contain the values found in the

seminal plasma of best European eel sperm samples reported in the present study.

On the other hand, the correlation found between the seminal plasma ionic composition and the sperm quality gives a good indication on the composition to be used in the extenders for this species. New studies are required in this subject, but these changes are probably a consequence of the hormonal profiles during spermiation, and specially due to the hydration controlled by the maturation-inducing steroids (MIS) at the final phase (Asturiano et al. 2002b).

Considering the results of Japanese eel and comparing them with the results of the present work, it can be asserted that the best composition for a European eel extender should have the following ionic composition (in mM): K^+ 35–40; Na^+ 110–120; Mg^{2+} 2 and Ca^{2+} 0.25; and physicochemical characteristics: osmolality 320–330 mOsm kg^{-1} and pH 8.5.

The CASA system is a useful tool to achieve reliable results to analyze sperm quality, because it takes several images of sperm samples and, using an automatic process, analyses the motility parameters which are essential to determine the quality of the studied sperm. The results obtained with the CASA system suggest that the TNK and P1 media are the best freezing media, having a good spermatozoa post-thawing survival. Different motility parameters (VCL, VSL, VAP and BCF) showed similar profiles and could be used as quality indicators, although Rurangwa et al. (2004) who reviewed different studies carried out using sperm tracking systems in African catfish, carp, goldfish, roach, Eurasian perch, trout, lake sturgeon, concluded that the most useful parameters of velocity are the VCL (the actual velocity along the trajectory) and the VSL (the straight line distance between the start and end points of the track divided by the time of the track).

The results from the present study show DMSO as a useful cryoprotectant for the European eel sperm freezing process. However, DMSO increases the medium osmolality activating the spermatozoa movement, barely reducing the pre-freezing and post-thawing time to manipulate the spermatozoa before they become inactive (unpublished results), which could explain at least in part the high variability detected. In this regard, further experiments with alternative cryoprotectants should be developed. For the moment,

methanol seems to be a suitable choice, considering the results obtained by Ohta et al. (2000; personal communication) in the Japanese eel, when they reported 60% of post-freezing surviving cells using 15% methanol in the freezing media.

The addition of L- α -phosphatidylcholine to the media seems to have positive effect, as reported in the Japanese eel by Tanaka et al. (2002a).

The lowest sperm dilution factor (sperm: freezing medium) in the present study (1:5) caused the best post-thawing sperm survival. New experiments are required using dilution factors as low as 1:1 or 1:2, allowing the maintenance of high concentrated sperm samples in the 250 μ l straws. On the other hand, sodium bicarbonate concentrations as high as 75 mM seem to be a critical point, due to its role in controlling the initiation of spermatozoa motility, as has been proven in the Japanese eel (Tanaka et al. 2002a, 2002b; 2004).

Acknowledgements

Carried out in collaboration with Valenciana de Acuicultura, S.A. Supported by the Generalitat Valenciana (GV04A-508, and a grant to D.S. Peñaranda), the Universidad Politécnica de Valencia (20030488) and the Spanish Ministry of Science and Technology (AGL2003-05362-C02-01, including FEDER funds). J.F. Asturiano is supported by a Ramón y Cajal research contract, cofinanced by the two last organizations. F. Marco-Jimenez is supported by the Centro de Investigación y Tecnología Animal (Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias).

References

- Amin, E.M. 1997. Observations on reproduction techniques applicable to the European eel (*Anguilla anguilla* L.). In: Genetics and Breeding of Mediterranean Aquaculture Species. Edited by D. Bartley and B. Basurco. Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM-FAO) 34: 223–34.
- Asturiano, J.F., Pérez, L., Tomás, A., Zegrari, S., Espinós, F.J. and Jover, M. 2002a. Inducción hormonal de la maduración gonadal y puesta en hembras de anguila europea (*Anguilla anguilla* L.) 1758: primeros resultados. Bol. Inst. Esp. Oceanog. 18((1–4): 127–137(In Spanish with abstract in English).
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M. and Zanuy, S. 2002b. Group-synchronous ovarian

- development, spawning and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci. Mar.* 66(3): 273–282.
- Billard, R. and Cosson, M.P. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.* 261: 122–131.
- Chambeyron, F. and Zohar, Y. 1990. A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 90: 345–352.
- Feunteun, E. 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecol. Eng.* 18: 575–591.
- Gibbons, B.H., Gibbons, I.R. and Baccetti, B. 1983. Structure and motility of the 9+0 flagellum of eel spermatozoa. *J. Submicrosc. Cytol.* 15: 15–20.
- Gibbons, B.H., Baccetti, B. and Gibbons, I.R. 1985. Live and reactivated motility of the 9+0 flagellum of *Anguilla* sperm. *Cell Motil.* 5: 333–350.
- Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E. and Ollevier, F. 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 425–433.
- Linhart, O., Slechta, V. and Slavic, T. 1991. Fish sperm composition and biochemistry. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica. Monograph* 16: 285–311.
- Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y. and Yamauchi, K. 1995. Acquisition of potential for sperm motility *in vitro* in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish. Sci.* 61: 533–534.
- Ohta, H. and Izawa, T. 1995. Cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. In: *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Edited by Goetz F.W. and Thomas P.
- Ohta, H. and Izawa, T. 1996. Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* 142: 107–118.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. and Hirose, K. 1996. Milt production in the Japanese eel (*Anguilla japonica*) induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fish. Sci.* 62: 44–49.
- Ohta, H., Ikeda, K. and Izawa, T. 1997a. Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility *in vitro* by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 277: 171–180.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Inuma, N. and Hirose, K. 1997b. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.* 17: 163–169.
- Ohta, H., Tanaka, H., Kagawa, H., Okuzawa, K. and Inuma, N. 1997c. Artificial fertilization using testicular spermatozoa in the Japanese eel, (*Anguilla japonica*). *Fish. Sci.* 63(3): 393–396.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H. and Unuma, T. 2001. Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture* 198: 339–351.
- Pedersen, B.H. 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224: 323–338.
- Pedersen, B.H. 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 237: 461–474.
- Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C. and Jover, M. 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.* 57: 1488–1504.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. and Nash, J.P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1–28.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Zupa, A., Lavadera, S.L., Rispoli, S. and Matassino, D. 2001. Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture* 202: 257–268.
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada, Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P. and Kurokura, H. 2002a. Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.* 60: 139–146.
- Tanaka, S., Zhang, H., Yamada, Y., Okamura, A., Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P. and Kurokura, H. 2002b. Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *J. Fish Biol.* 60: 1134–1141.
- Tanaka, S., Utoh, T., Yamada, Y., Horie, N., Okamura, A., Akazawa, A., Mikawa, N., Oka, H.P. and Kurokura, H. 2004. Role of sodium bicarbonate on the initiation of sperm motility in the Japanese eel. *Fish. Sci.* 70: 780–787.
- Van Look, K.J.W. and Kime, D.E. 2004. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *J. Fish Biol.* 63: 1020–1033.
- Woolley, D.M. 1998. Studies of the eel sperm flagellum. 3. Vibratile motility and rotatory bending. *Cell Motil. Cytoskel.* 39: 246–255.

Effects of pH, Sodium Bicarbonate, Cryoprotectants and Foetal Bovine Serum on the Cryopreservation of European Eel Sperm

DL Garzón¹, DS Peñaranda¹, L Pérez¹, F Marco-Jiménez², X Espert¹, T Müller², M Jover¹ and JF Asturiano¹

¹Departamento de Ciencia Animal, Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain;

²Department of Fish Culture, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Szent István University, H-2103 Gödöllo, Péter K u 1 Hungary.

Contents

The main objective of the present study was to evaluate the influence of pH and bicarbonate concentration in the activation or inhibition of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa and to evaluate the effect of different cryoprotectants: dimethyl sulphoxide (DMSO), acetamide, ethylene glycol, propanol, glycerol and methanol (MeOH). The effect of these factors was evaluated comparing the percentage of motile cells, the percentage of alive cells (by Hoechst staining) and the spermatozoa morphometry pre- and post-cryopreservation (by computer-assisted morphology analysis). Based on the above findings, three cryoprotectants (DMSO, MeOH and glycerol) were chosen and evaluated in two media (P1 and P1 modified) with different concentrations of NaHCO₃ and in the presence or absence of foetal bovine serum (FBS). The effect of these factors was evaluated comparing the percentage of alive and motile cells post-cryopreservation. DMSO was the cryoprotectant showing better results in relation to the percentage of spermatid alive cells post-freezing and caused a smaller modification of the head spermatozoa morphology. The combination of P1-modified medium with DMSO and containing FBS increased slightly but significantly the percentage of motile spermatozoa post-cryopreservation.

Introduction

The development of the artificial insemination has allowed important changes in animal production. The frozen semen has different applications such as maintenance of genetic banks, disease control, synchronization of gamete obtaining in both sexes and total use of sperm volume in animals of difficult obtaining, simplifying the storage of the sperm (Kime et al. 2001; Rurangwa et al. 2004).

The cryopreservation of fish sperm has been studied widely, especially in salmonids (Gwo et al. 1999) and cyprinids (Basavaraja and Hegde 2004). Although it has been achieved to obtain semen of Japanese eel (*Anguilla japonica*), quality and quantity of this one are very changeable; due to this, its cryopreservation has been tried for many years (Ohta and Izawa 1996; Tanaka et al. 2002a). Nevertheless, it is a type of technique scarcely used in the Mediterranean fish farming and especially in the reproduction of European eel (*Anguilla anguilla*).

In addition, it is necessary to consider the problems in managing and assessing the sperm quality of the European eel due to its high density with habitual concentrations of $3\text{--}6 \times 10^9$ spermatozoa/ml (Pérez et al. 2000). This problem has been settled in other fish species by diluting the sperm before using it during the fertilization process. For this, a protocol of dilution is used habitually in two phases, using first a diluting

media or extender with physio-chemical characteristics similar to the seminal plasma which does not activate the spermatozoa movement as an intermediate dilution, followed by an activating solution to reach the final dilution and activate the cell movement (Billard and Cosson 1992). The use of diluting media or extenders can prolong the sperm lifetime and even though increase the spermatozoa motility after an incubation period of the sperm in these extenders (Ohta and Izawa 1996; Tanaka et al. 2002a).

Previous studies analysed ionic composition and physio-chemical characteristics of the seminal plasma of the European eel (Pérez et al. 2003; Asturiano et al. 2004). The results were used to design a new diluting medium, named P1, isoionic with the seminal plasma and that might facilitate its dilution for quality analyses and also be used as the first step of dilution of the sperm before the fertilization process. In the case of Japanese eel, similar studies on seminal plasma and diluting media production have been achieved. This way, Ohta and Izawa (1996) managed the times of conservation of the diluted sperm under refrigeration for longer than 3 weeks.

In a more recent study, Tanaka et al. (2002a) described a medium containing 76.2 mM of NaHCO₃ which improved the sperm motility post-freezing. In the present study, we will compare the P1 medium (Asturiano et al. 2004) and the medium described above (Tanaka et al. 2002a). Tanaka et al. (2002b) suggested that NaHCO₃ has an inhibitory role on the movement of the Japanese eel sperm, as to trigger the initiation of movement is necessary the influx of H⁺ in the cell, and NaHCO₃ decreases intracellular pH. This decrease in the intracellular pH is produced because intracellular CO₂ (derived from NaHCO₃) is converted in HCO₃⁻ and H⁺ by carbonic anhydrase. Two years later, Tanaka et al. (2004) suggested that NaHCO₃ has a double role on the control of spermatozoa motility: one inhibiting role mediated by CO₂ and one activating role mediated by HCO₃ ion.

At the moment, there is no ideal cryoprotectant for eels and the options change depending on the author. For example, Tanaka et al. (2002a) presented dimethyl sulphoxide (DMSO) as an effective cryoprotectant for the Japanese eel. In European eel sperm, Asturiano et al. (2003) used DMSO and phosphatidylcholine diluted in the medium proposed by Tanaka et al. (2002a) for Japanese eel and in the P1 medium proposed by Pérez et al. (2003), obtaining a result of survival post-freezing with P1 medium ($24.2 \pm 9.7\%$). This result suggests that DMSO could be a good cryoprotectant for European eel.

Szabó et al. (2005) studied the cryoprotectant role of DMSO and methanol (MeOH) in different extender media: as Tanaka's (137 mM NaCl, 76.2 mM NaHCO₃; Tanaka et al. 2002a), Kurokura's modified (350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl₂, 8 mg MgCl₂ and 20 mg NaHCO₃, for 100 ml; Magyary et al. 1996) and glucose extender (1350 mM glucose, 30 mM Tris, pH 8.0; Szabó et al. 2005). Ten per cent DMSO or 10% MeOH (in v/v final concentration) was used as cryoprotectant. They concluded that glucose and Kurokura's modified extenders are the best because they showed the lowest sperm motilities.

On the other hand, Müller et al. (2004) worked with MeOH as another cryoprotectant for European eel obtaining a spermatid motility post-freezing of $36 \pm 11\%$ using the modified Kurokura medium as extender.

Marco-Jiménez et al. (2006a) also worked with MeOH as cryoprotectant, describing that MeOH causes a higher reduction in the head area and perimeter of the spermatozoa compared with cells frozen with DMSO or with the spermatozoa in fresh samples, probably due to the fact that MeOH induces the reduction of the content of intracellular water.

In the sperm cryopreservation media, the foetal bovine serum (FBS) is in use from the first assays in mammals and then in fish due to its effect as buffer of the osmotic shock and due to the fact that proteins can award a protection of mechanical type to the membrane, diminishing the risks of crystallization, recrystallization or ice melting during the different phases of the process of freezing and thawing (Rana 1995).

Among the works developed for European eel, good results have been obtained by the addition of L- α -phosphatidylcholine to different freezing media with 10% DMSO and using 1 : 5, 1 : 20 or 1 : 100 sperm : freezing media dilutions (Asturiano et al. 2003, 2004).

Based on the previous studies, the present work aims to determine the influence of the pH and the concentration of NaHCO₃ of the sperm dilution media in the inhibition or cell activation (experiment 1), and to determine which is the best cryoprotectant for the freezing of European eel sperm, as well as the effect of FBS addition to the freezing media (experiments 2 and 3).

Materials and Methods

Fish

Two groups of farmed eels were kept for the experiments: 24 eel males were used for experiments 1 and 2, and 16 males for experiment 3. They showed a body average weight of 137.6 g. Fish were reared and done by the fish farm Valenciana de Acuicultura, S. A. (Puzol, Valencia, east coast of Spain) and were moved into our facilities (Laboratorio de Acuicultura, Departamento de Ciencia Animal). Fish were gradually acclimatized to sea water and were distributed in 100 l aquaria with a density of five to six animals for each aquarium. Temperature was maintained at 21–24°C during the experiment.

Eels were tagged with passive integrated transponders and injected into the epaxial muscle (1–2 mm below the dorsal fin and perpendicular to the axis of the vertebral column) for individual identification.

Hormonal treatment and samplings

Males were hormonally treated for the induction of maturation and spermiation with weekly intraperitoneal injections of human chorionic gonadotropin (1.5 IU/g BW) (Ohta and Izawa 1996; Pérez et al. 2000; Müller et al. 2004; Asturiano et al. 2005). Once a week during the spermiation period, from the 5th to the 13th week of treatment, sperm was sampled 24 h after the hormone administration when the best quality has been observed (Pérez et al. 2000). After cleaning the genital area with freshwater and thoroughly drying to avoid contamination of samples with faeces, urine and sea water, total expressible milt was collected by applying gentle abdominal pressure to anaesthetized males (benzocaine; 60 mg/l).

Motility evaluation

Immediately after collection, all the fresh sperm samples were evaluated by the same trained observer to avoid subjective differences on the motility evaluation. Two microlitres of fresh sperm was diluted in 2 ml (1 : 1001) of artificial sea water as an activating solution.

Mixture was vortexed immediately and 2 μ l of shaken mixture was placed in a slide with Teflon microwells. To prevent the spermatozoa adhering to the slides, they were previously bathed in a 10% bovine serum albumin solution (30 min, 4°C), and then washed with distilled water and dried in a hood (according to D. Kime, personal communication, 2000). Observation of slides was carried out using a 20 \times negative phase-contrast objective on Eclipse 80i Nikon Microscope (IZASA, S. A.; Valencia, Spain).

Samples showing more than 50% motile spermatozoa from at least three males were pooled to avoid individual male differences. Percentage of motile cells was evaluated once the pools were constituted. The same method was used to evaluate the percentage of motile spermatozoa post-freezing.

Sperm viability assessed by Hoechst 33258 staining

Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Inc; Madrid, Spain) was used to evaluate the viability of eel spermatozoa before motility activation in fresh sperm and post-thawing samples. Briefly, 5 μ l Hoechst 33258 (1 mg/ml) was mixed with 5 μ l eel sperm and 50 μ l P1 medium. After 5 min incubation at room temperature in the dark, at least 100 spermatozoa per sample were assessed in a Nikon Eclipse 80i epifluorescence microscope, using UV-2A (EX: 330–380 nm, DM: 400 nm, BA: 420 nm) filter. Spermatozoa were classified as *dead* when nuclei showed bright blue fluorescence over sperm head, and *alive* when they did not show this strong fluorescence.

Morphology evaluation

Samples from each one of the pools were diluted with 2.5% glutaraldehyde fixative solution. Sperm morphology was analysed using a computer-assisted morphology analysis (ASMA) software (SPERM CLASS ANALYZER®, Morfo Version 1.1; Imagesp, Barcelona, Spain), follow-

ing Marco-Jiménez et al. (2006b). Approximately 100 spermatozoa were analysed in each pool. The morphometry parameters determined were projected head perimeter (μm) and head area (μm^2).

Experimental design

Experiment 1

The pH effect, NaHCO_3 concentration and DMSO presence on the European eel spermatozoa motility were evaluated. Two diluting media were used, P1, an isosmotic and isoionic medium with the European eel seminal plasma: 125 mM NaCl, 20 mM NaHCO_3 , 2.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 mM KCl proposed by Asturiano et al. (2003, 2004), and TNK medium: 137 mM NaCl, 76.2 mM NaHCO_3 , 20 mM TAPS proposed by Tanaka et al. (2002a).

For the evaluation of the pH effect, sperm was diluted 1 : 20 in P1 or TNK medium adjusted to different pH: 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5 for the P1 medium, and 7.8 and 8.5 for the TNK medium. Immediately, motility of sperm samples was assessed. The obtained results will be compared with the results reported by Tanaka et al. (2002b), as the motility-inhibiting effect is probably based on some product dissociated from NaHCO_3 , which may influence the intracellular pH, because the intracellular pH is an internal factor for the initiation of sperm motility (Lee et al. 1983; Oda and Morisawa 1993).

Bearing in mind that DMSO causes spermatozoa activation by changes in the sperm osmolality not only in eels (Tanaka et al. 2001, 2002a) but also in other fish species (Fabbrocini et al. 2000; Medina et al. 2005), it was decided to analyse the influence of DMSO in sperm motility. For this purpose, a mixture was prepared containing 10% DMSO (v/v final concentration), 56.6% of extender (P1 or TNK), and ultimately 33% of sperm was added to this mixture. From this addition, the mixture was incubated for 5 min and the motility was observed for every pH value previously mentioned.

Experiment 2

In this assay, P1 medium (Asturiano et al. 2004) was used as extender using six different cryoprotectants, including MeOH and DMSO as previously used in Japanese eel (Tanaka et al. 2001, 2002a) and in European eel (Asturiano et al. 2004; Müller et al. 2004) and some others like glycerol, propanol, ethylene glycol and acetamide used in fish (Fabbrocini et al. 2000; Medina et al. 2005). Each of the mixtures contained 75 μl of cryoprotectant and 425 μl of extender to which 250 μl of sperm was added at the end. The sperm activation was evaluated immediately after the sperm addition.

At the same time, samples were prepared with the same proportions and were packaged in 0.25 ml straws (IMV® Technologies, L'Aigle, France), sealed with modelling paste and frozen in liquid nitrogen vapour (-120°C), 5 cm above the liquid nitrogen level for 10 min, before being plunged into the liquid nitrogen (-196°C) for storage.

The percentage of alive spermatozoa post-freezing was evaluated (by Hoechst staining), and spermatozoa morphometry parameters determined were projected

head perimeter (μm) and head area (μm^2), being compared with same parameters obtained in cells from the fresh pools.

Experiment 3

Using a new group of fish, new sperm samples were collected and used to test different freezing protocols, evaluating their effects on the sperm motility and the percentage of alive cells post-freezing.

Two media with different NaHCO_3 concentrations were evaluated, P1 and P1-modified media: (in mM): 125 NaCl, 75 NaHCO_3 , 2.5 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 30 KCl, pH 8.5, as well as three cryoprotectants (DMSO, MeOH or glycerol) which were added in these two media having a final concentration of 10% (v/v). Moreover, the effect of FBS addition (25% final concentration) to the freezing media was evaluated.

Statistical analysis

Data are shown as means \pm SEM. A one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to compare mean results obtained. Multiple comparisons of means were carried out using a Student–Newman–Keuls test. In all cases, differences were considered significant at $p < 0.05$. All statistical procedures were run using STATGRAPHICS® Plus 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, MO, USA).

Results

Experiment 1

The P1 medium (pH 7.0, 7.5, 8.0 or 8.5) and TNK medium (pH 7.8 or 8.5) induced sperm motility without significant differences between them. The percentage of motile cells was immediately evaluated after being diluted in each media. A motility range was observed from $11.3 \pm 4.3\%$ to $36.3 \pm 6.9\%$, whereas the fresh pools showed motilities of $64.8 \pm 2.9\%$ once activated with sea water (Fig. 1a).

Figure 1b shows the effect of DMSO (final concentration 10% v/v) on the percentage of motile spermatozoa in P1 and TNK media 5 min after all the samples were activated with sea water. Samples incubated in P1 medium added with DMSO did not show sperm motility after the activation with sea water, whereas samples in TNK medium added with DMSO presented a percentage of motile cells that was not significantly minor than the motility of the fresh pools activated with sea water.

Experiment 2

Figure 2a shows the activation effect of the spermatozoa movement with P1 medium combined with several cryoprotectants (MeOH, glycerol, DMSO, propanol, ethylene glycol and acetamide).

When the activation effect of the different cryoprotectants was compared with the activation effect of sea water to the fresh pools, it showed that DMSO caused a similar percentage of motile cells. Meanwhile, ethylene glycol and glycerol showed smaller values without differences between them. The rest of cryoprotectants

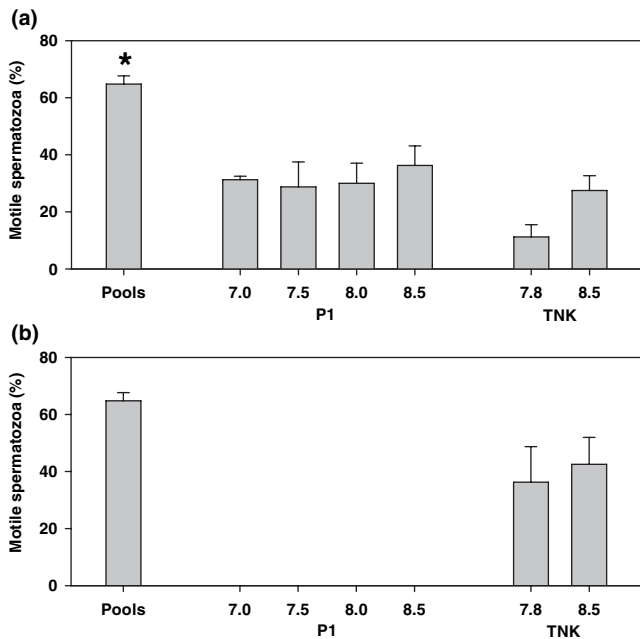


Fig. 1. (a) Percentage of motile spermatozoa in sperm samples just after dilution in P1 or TNK media at different pH, in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 4$). (b) Percentage of motile spermatozoa in sperm samples after 5-min incubation in P1 or TNK media at different pH, in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 4$). Asterisks mean significant differences

(MeOH, propanol and acetamide) showed the smallest percentages of activation of the spermatozoa movement.

Figure 2b shows the percentage of alive cells measured by Hoechst of the fresh pools ($82.2 \pm 7.9\%$) and the post-freezing samples frozen with different cryoprotectants. DMSO ($64.8 \pm 7.9\%$) did not show statistical differences with MeOH, glycerol and propanol, as in the same way with the fresh pools. Acetamide ($24.3 \pm 7.9\%$) and ethylene glycol ($25.6 \pm 7.9\%$) caused the lowest survival values in relation to other cryoprotectants.

Finally, in Fig 2c and d, the results of the morphometric analyses (ASMA) for the spermatozoa frozen with different cryoprotectants are shown. The measured values were the spermatozoa head area (Fig. 2c) and perimeter (Fig. 2d).

Cells frozen in P1 medium added with DMSO presented an increase of the head area of approximately $0.5 \mu\text{m}^2$, statistically significant in comparison with the fresh pools. With MeOH, the spermatozoa presented an area reduction of approximately $1 \mu\text{m}^2$, in comparison with the fresh samples or spermatozoa frozen with other cryoprotectants. With regard to the head perimeter (Fig. 2d), it was observed that sperm cells frozen with DMSO did not show significant differences with regard to fresh pools, while the spermatozoa frozen with the rest of cryoprotectants presented lower perimeters than fresh samples, especially in the case of cells frozen with ethylene glycol and MeOH, which showed the major reduction in their head perimeter of approximately $1.7 \mu\text{m}$.

Dimethyl sulphoxide was the cryoprotectant with the best results obtained with regard to alive cell percentage,

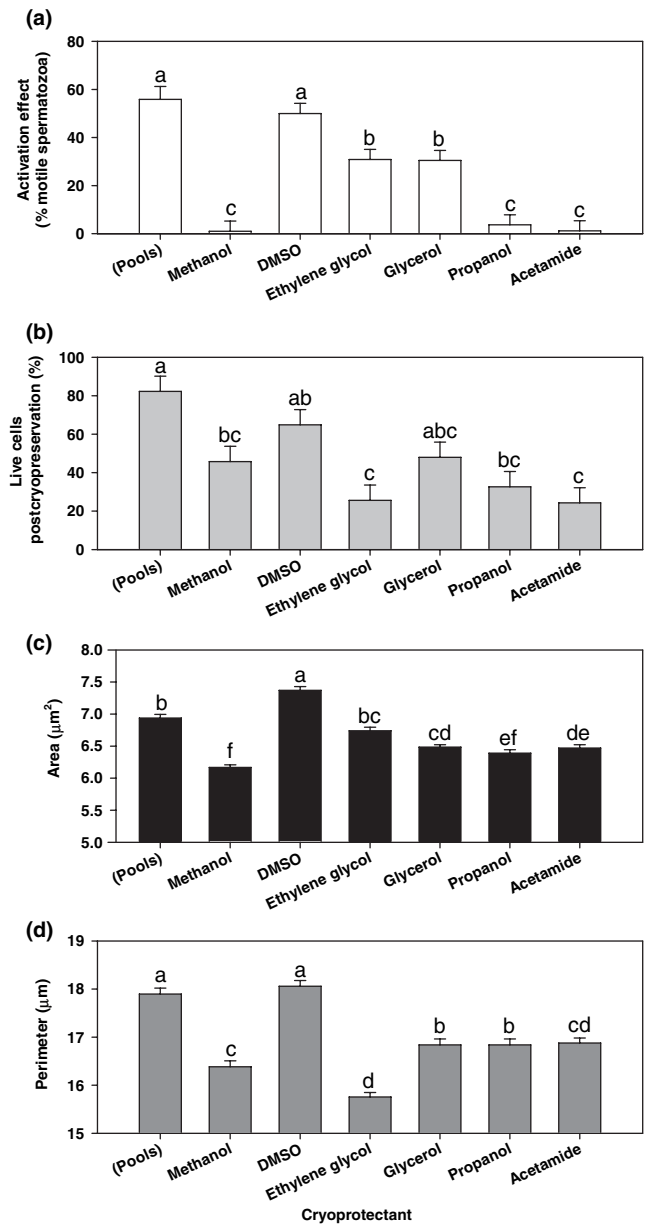


Fig. 2. (a) Percentage of activation effect in motile spermatozoa samples with six different cryoprotectants in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 6$). (b) Percentage of alive cells in sperm samples after cryopreservation with six different cryoprotectants in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 4$). (c) Effect of cryoprotectant in the spermatozoa head area (μm^2) in comparison with fresh sperm pooled samples ($n = 6$). (d) Effect of cryoprotectant in spermatozoa head perimeter (μm) in comparison with fresh sperm pooled samples

and it maintained the spermatozoa head perimeter. MeOH and glycerol were the other two cryoprotectants showing good results, especially of alive cells post-freezing.

Experiment 3

Considering the results obtained in experiments 1 and 2, experiment 3 was designed having a 10% (v/v) final concentration of MeOH, glycerol or DMSO which was diluted in P1 or P1-modified medium (with a NaHCO_3

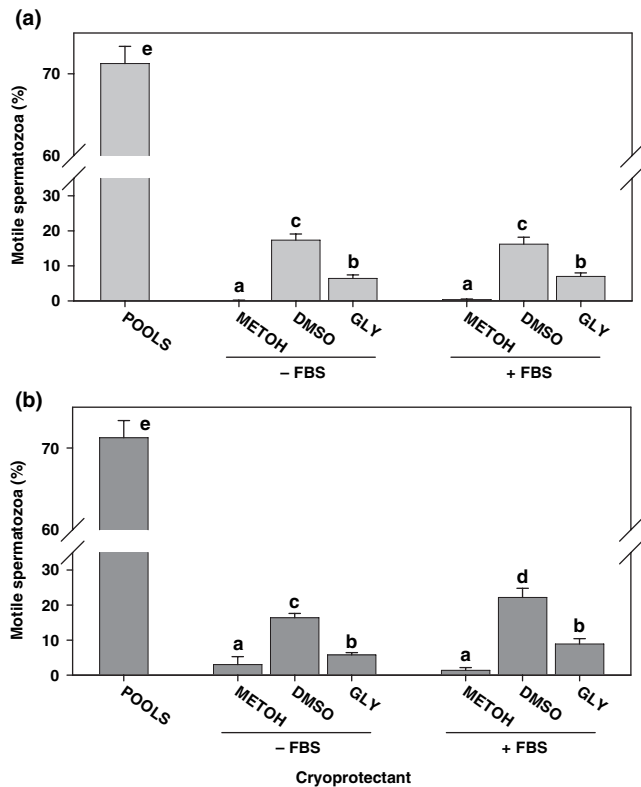


Fig. 3. Percentage of motile cells after cryopreservation in P1 (a) or P1-modified medium (b) with MeOH, DMSO or glycerol as cryoprotectant, and with or without FBS, in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 19$). Different letters indicate significant differences

concentration closer to TNK medium), verifying besides the possible membrane protective effect of the FBS as suggested in previous studies (Ohta et al. 2001; Marco-Jiménez et al. 2006a).

All the frozen samples showed reductions higher than 50% of sperm motility compared with the fresh pools (Fig. 3a and b). The percentage of motile spermatozoa in the frozen samples with DMSO was significantly higher than those obtained with glycerol or MeOH, independently of the used media. Frozen samples in P1-modified medium with DMSO and added with FBS presented a significantly higher percentage of motile spermatozoa ($22.2 \pm 1.5\%$) than in the rest of conditions. The samples frozen with glycerol showed an intermediate value (5–9%) of motile cells, whereas the values obtained with MeOH were the lowest (0.1–0.4%) in both media.

Figure 4 shows the percentage of alive spermatozoa post-freezing. Samples frozen in P1 and P1-modified media showed a significant reduction (>48%) with regard to fresh pools (Fig. 4a and b) independent of FBS addition. Unlike as observed for the motility, the survival of post-freezing spermatozoa was similar with all the used treatments, with values between 22% and 34%.

Discussion

The sperm of the European eel has a high density ($3\text{--}6 \times 10^9$ spermatozoa/ml; Pérez et al. 2000), which becomes a problem at the moment of its manipulation.

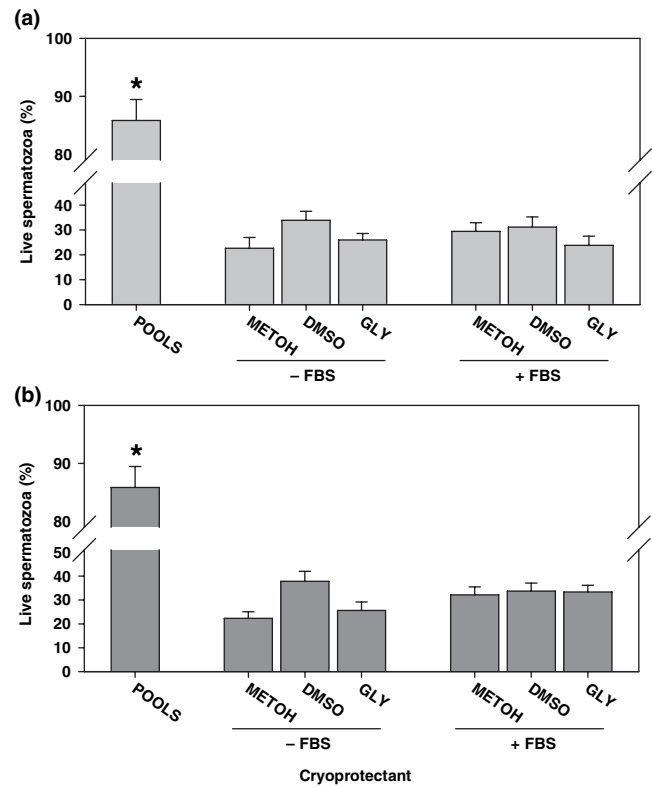


Fig. 4. Percentage of alive spermatozoa after cryopreservation in P1 (a) or P1-modified medium (b) with MeOH, DMSO or glycerol as cryoprotectant, and with or without FBS, in comparison with fresh sperm pooled samples activated with sea water ($n = 19$). Different letters indicate significant differences

As in other fish species, it is necessary to use an extender based on the physio-chemical parameters of the seminal plasma and thereby it does not activate the spermatozoa movement (Billard and Cosson 1992).

In experiment 1, two extenders were used: TNK, described for Japanese eel by Tanaka et al. (2002a), and P1 proposed by Asturiano et al. (2004) for European eel. The results showed that pH does not represent an important factor controlling the motility of European eel spermatozoa, at least in the selected range (pH 7–8.5). Tanaka et al. (2002b) suggested that the concentration of the K^+ and HCO_3^- ions could be related to the sperm motility, indicating that in acid or neutral pH the HCO_3^- dissociates mainly into CO_2 . CO_2 is one of the responsible factors for the sperm movement inhibition. In the present experiment, the relationship between the pH range and $NaHCO_3$ concentration was analysed (Fig. 1), showing that TNK medium (with a higher $NaHCO_3$ concentration) shows a higher sperm motility than that obtained with the P1 medium, confirming Tanaka's hypothesis. According to these results, for the next experiment, the HCO_3^- ion concentration in P1 medium was modified looking for the improvement of the post-freezing motile response. On the other hand, it has been described that the DMSO produces spermatozoa movement activation (Tanaka et al. 2001, 2002a; Asturiano et al. 2004; Müller et al. 2004). In the present study, no sperm movement was found after 5 min of incubation in DMSO presence (Fig. 1b), which might

owe to the activation, with the consequent energetic consumption, during the incubation period. In the same form it is possible to question the integrity of mitochondria, as these are the main energy producers. If mitochondria are damaged as a consequence of osmotic stress caused by the addition of a cryoprotectant, it is possible to produce a decrease in ATP production (Medina et al. 2005). In the same way, morphometric changes produced with DMSO addition, might influence the cell movement (Asturiano et al. 2007).

Studies in Japanese eel (Ohta et al. 2001; Tanaka et al. 2002b) attribute the possible loss in the motility capacity to imbalances in the K^+ concentration (low levels) and HCO_3^- in the spermatozoa. Ohta et al. (2001) demonstrated that these ions can be restored, giving new movement capacity to the cells, as it happens in the spermatid conduct. Ohta et al. (2001) suggested that the potential for motility of eel spermatozoa can be regulated by altering extracellular concentration of K^+ and HCO_3^- ions.

In the present study (Fig. 1b), cells incubated for 5 min in TNK medium in DMSO presence can be activated by sea water. The difference with the P1 medium is a higher $NaHCO_3$ concentration, which seems to coincide with the inhibiting role of the bicarbonate ion of the movement suggested by Tanaka et al. (2002b).

Considering the results of different previous studies (Fabbrocini et al. 2000; Tanaka et al. 2001, 2002a; Asturiano et al. 2004, 2007; Müller et al. 2004; Medina et al. 2005) reporting the possible problems of DMSO as cryoprotectant due its influence in the spermatozoa activation, experiment 2 was done. In this experiment, the effect of six cryoprotectants on the spermatozoa motility, the percentage of alive cells and morphometric parameters post-freezing (Fig. 2a–d) were evaluated. The set of results of experiment 2 showed DMSO as the best cryoprotectant, especially considering the cell perimeter and the percentage of alive spermatozoa post-freezing. As MeOH and glycerol showed good results, reason for which, these three cryoprotectants, were chosen to make the third experiment. The experiment in turn verified the protective effect of FBS as described by Ohta et al. (2001) in Japanese eel and by Marco-Jiménez et al. (2006a) in European eel.

According to the results obtained in experiment 1, differences in $NaHCO_3$ concentration between P1 and TNK media caused differences in the percentage of motile spermatozoa after an incubation of 5 min in the presence of DMSO.

The best results of sperm motility after freezing in experiment 3 were obtained in the mixture containing DMSO and FBS in P1-modified medium (Fig. 3b). The positive influence of FBS can be due to the serum proteins and lipids, playing an important role in the cryopreservation process as a defence mechanism in the instability of the plasmatic membrane (Watson 1995). It is possible that mechanical protection at membrane level be provided by the FBS, and it allows that internal structures of the cells should be in good conditions to be reactivated post-freezing.

Figure 3a and b showed a lower percentage of motile spermatozoa in comparison with Fig. 1. This is because

sperm pools in Fig. 1 were tested when fresh and those of the Fig. 3 after freezing, and the cryopreservation caused a significant decrease on the quantity of alive cells.

The present study evaluated the influence of different factors in the cryopreservation of European eel sperm: composition of diluting medium (extender), cryoprotectants and pH. In relation to extenders, modification in the concentration of $NaHCO_3$ (P1-modified medium) caused a higher sperm motility with respect to P1 medium (Fig. 1a and b). DMSO was the cryoprotectant causing the highest percentage of alive spermatozoa post-freezing with a final mixture concentration of 10% (v/v), and a minor modification of the spermatozoa perimeter, without significant differences in relation to cells in the fresh pools (Fig. 2d). Confirming previous studies made by ASMA computer method by Marco-Jiménez et al. (2006a), FBS addition can be an important factor in the protection of the integrity of the spermatozoa membrane during freezing and thereby facilitates the process of activation post-freezing of spermatozoa (Fig. 3).

The pH range used in the present study must be extended and compared with the variation of $NaHCO_3$ concentration. This will allow determining its relation with processes of activation or inhibition with the aim to improve the functionality post-freezing of European eel spermatozoa.

Acknowledgements

Supported by the Generalitat Valenciana (GV04A-508 and a grant to DS Peñaranda), the Spanish Ministry of Education and Science (AGL2003-05362-C02-00, including FEDER funds) and the Universidad Politécnica de Valencia (20030488). JF Asturiano is supported by a Ramón y Cajal research contract, co-financed by the two last organizations.

References

- Asturiano JF, Pérez L, Marco-Jiménez F, Olivares L, Vicente JS, Jover M, 2003: Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiol Biochem* **28**, 501–502.
- Asturiano JF, Pérez L, Garzón DL, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Vicente JS, Jover M, 2004: Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiol Biochem* **30**, 283–293.
- Asturiano JF, Pérez L, Peñaranda DS, Garzón DL, Marco-Jiménez F, Martínez S, Tomás A, Jover M, 2005: Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquac Res* **36**, 1480–1487.
- Asturiano JF, Marco-Jiménez F, Peñaranda DS, Garzón DL, Pérez L, Vicente JS, Jover M, 2007: Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reprod Domest Anim* **42**, 162–166.
- Basavaraja N, Hegde SN, 2004: Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor Khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology* **49**, 149–156.
- Billard R, Cosson MP, 1992: Some problems related to the assessment of sperms motility in freshwater fish. *J Exp Zool* **261**, 122–131.

- Fabbrocini A, Lubrano Lavadera S, Rispoli S, Sansone G, 2000: Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* **40**, 46–53.
- Gwo J-C, Ohta H, Okuzawa K, Wu HC, 1999: Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology* **51**, 569–582.
- Kime DE, Van Look KJW, McAllister BG, Huyskens G, Rurangwa E, Ollevier F, 2001: Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp Biochem Physiol C* **130**, 425–433.
- Lee HC, Johnson C, Epel D, 1983: Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Dev Biol* **95**, 31–45.
- Magyary I, Urbányi B, Horváth L, 1996: Criopreservación de common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Ichthyol* **12**, 117–119.
- Marco-Jiménez F, Garzón DL, Peñaranda DS, Pérez L, Viudes de Castro MP, Vicente JS, Jover M, Asturiano JF, 2006a: Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of rate dilution, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology* **53**, 51–57.
- Marco-Jiménez F, Pérez L, Viudes de Castro MP, Garzón DL, Peñaranda DS, Vicente JS, Jover M, Asturiano JF, 2006b: Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* **65**, 1302–1310.
- Medina V, Velasco Y, Cruz P, 2005: Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **18**, 34–48 (in Spanish).
- Müller T, Urbányi B, Váradi B, Binder T, Horn P, Bercsényi M, Horváth A, 2004: Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *J World Aquac Soc* **35**, 240–246.
- Oda S, Morisawa M, 1993: Rises of intracellular Ca^{+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskeleton* **25**, 171–178.
- Ohta H, Izawa T, 1996: Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture* **142**, 107–118.
- 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**, 339–351.
- Pérez L, Asturiano JF, Tomás A, Zegrari S, Barrera R, Espinós JF, Navarro JC, Jover M, 2000: Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J Fish Biol* **57**, 1488–1504.
- Pérez L, Asturiano JF, Martínez S, Tomás A, Olivares L, Mocé E, Lavara R, Vicente JS, Jover M, 2003: Ionic composition and physio-chemical parameters of the European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma. *Fish Physiol Biochem* **28**, 221–222.
- Rana KJ, 1995: Methods in Molecular Biology, Vol 38: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. In: Day JG, McLellan MR (eds), *Cryopreservation of Fish Spermatozoa*, Humana, Totowa, NJ, pp. 151–165.
- Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F, Nash JP, 2004: The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* **234**, 1–28.
- Szabó G, Müller T, Bercsényi M, Urbányi B, Kucska B, Horváth A, 2005: Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biol Hung* **56**, 173–175.
- Tanaka H, Kagawa H, Ohta H, 2001: Production of leptcephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* **201**, 51–60.
- Tanaka S, Zhang H, Horie N, Yamada Y, Okamura A, Utoh T, Mikawa N, Oka HP, Kurokura H, 2002a: Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *J Fish Biol* **60**, 139–146.
- Tanaka S, Zhang H, Yamada Y, Okamura A, Horie N, Utoh T, Mikawa N, Oka HP, Kurokura H, 2002b: Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *J Fish Biol* **60**, 1134–1141.
- Tanaka S, Utoh T, Yamada Y, Horie N, Okamura A, Akazawa A, Mikawa N, Oka HP, Kurokura H, 2004: Role of sodium bicarbonate on the initiation of sperm motility in the Japanese eel. *Fish Sci* **70**, 780–787.
- Watson PF, 1995: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* **7**, 871–891.

Submitted: 16.10.2006

Author's address (for correspondence): Juan F. Asturiano, Instituto de Creencia y Tecnología Animal, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain. E-mail: jfastu@dca.upv.es

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Debido a que las anguilas no maduran sexualmente en cautividad se hace necesario el desarrollo de métodos de inducción hormonal que logren la producción de volúmenes importantes de esperma de buena calidad (Pérez *et al.*, 2000; Asturiano *et al.*, 2004b; Müller *et al.*, 2004). Así pues, la reproducción en cautividad se presenta como una de las alternativas de mayor importancia en la producción a gran escala.

Este hecho ha motivado el interés por desarrollar técnicas sobre la calidad del esperma de anguila europea, su recolección, congelación y manejo apropiado. Para lo cual se realizaron una serie de experimentos recogidos en el presente trabajo.

Los primeros experimentos tuvieron como finalidad determinar el método de inducción hormonal apropiado para anguila europea (Artículo I). Se probó la eficiencia del tratamiento hormonal sugerido por Amin (1997) para anguilas salvajes y empleado por Pérez *et al.* (1999 y 2000) para machos de piscifactoría, experimentos que consistían en la aplicación de inyecciones semanales de 1.5 UI hCG g/pez, como en el tratamiento A del presente trabajo y que fue comparado con tratamientos hormonales alternativos.

Así, en el artículo I se ensayaron diversas dosis de hCG a diferentes intervalos de aplicación (Tabla 1, pág 51) para la obtención de semen de anguila tomando como base trabajos previos realizados por Boetiüs (1967), Døllerup y Graver (1985), Amin (1997) y Pérez *et al.* (2000). Se conformaron cinco grupos (A-E) con dosis de 1.5 UI hCG g/pez, para los grupos A, C y D y de 0.75 UI hCG g/pez para el grupo B. Estas dosis se aplicaron a diferentes intervalos de tiempo. Al grupo E no se le administró tratamiento por ser el grupo control. Se obtuvo un mayor número de machos espermiantes a partir de la 5ª a 6ª semanas de tratamiento en los grupos A, C y D.

El tratamiento A indujo un alto porcentaje de machos espermiantes y debido a un periodo de espermiación más largo, se observó el mayor número de muestras de esperma en este estudio (Artículo I, tabla 2, pág. 54).

Después de estudiar los resultados del artículo I y tomando en cuenta los resultados obtenidos con los tratamientos hormonales utilizados, se puede concluir que los tratamientos hormonales cortos pueden ser suficientes para lograr la maduración

sexual y la espermiación, pero estímulos hormonales continuos son necesarios para mantener una buena producción de esperma de buena calidad en anguila europea (Artículo I, pág 55).

Estudios realizados en esperma de anguila europea por Pérez *et al.* (2000), consiguieron determinar que el esperma de anguila europea presenta una elevada densidad, $3-6 \times 10^9$ espermatozoides/ml. Además, el tiempo que los espermatozoides permanecen en movimiento suele limitarse a pocos segundos, lo que hace difícil la manipulación y valoración de la calidad del esperma, por lo cual se hizo necesaria la utilización de un diluyente para solventar estos problemas al igual que en otras especies de peces. Este diluyente tendría que estar basado en las características fisicoquímicas del plasma seminal y de esta manera procurar que no activase el movimiento de los espermatozoides (Billard y Cosson, 1992).

Así, una vez definido el tratamiento hormonal, continuamos con la obtención de un medio diluyente apropiado, ya que se ha demostrado en algunos trabajos, que la dilución del esperma puede aumentar las tasas de fertilización (Ohta e Izawa 1996). Además, el uso de diluyentes puede prolongar la vida del esperma refrigerado (Ohta e Izawa 1995) e incluso, puede incrementar la movilidad espermática después de un periodo de incubación (Ohta e Izawa 1996; Ohta *et al.* 2001). Para confirmar estas observaciones realizadas en anguila japonesa, y con la intención de compararlas con el esperma de anguila europea, utilizamos el sistema informático CASA que se ha empleado en el análisis de esperma de mamíferos, aves y recientemente se ha probado en peces (Kime *et al.* 2001; Rurangwa *et al.* 2004; Van Look y Kime, 2004). Este programa nos permite evaluar diferentes parámetros de movimiento espermático (VCL, VSL, VAP y BCF) y el porcentaje de espermatozoides activados.

Utilizando el sistema informático CASA, analizamos los parámetros de movilidad espermática de las muestras obtenidas con los distintos tratamientos hormonales (Artículo I, tabla 3, pág. 54). Las muestras de los machos del tratamiento A, mostraron el más alto número de machos espermiantes, aunque los valores de movilidad espermática como la velocidad curvilínea (VCL) y velocidad rectilínea (VSL), al igual que los otros parámetros estudiados (VAP y BCF), no fueron estadísticamente significativos. Este resultado posiblemente esté ligado a la disparidad en la n de cada grupo analizado.

Se han realizado algunos estudios específicos sobre las características del movimiento de los espermatozoides en anguila europea. Por ejemplo, Woolley (1997 y 1998)

describió diferentes aspectos de la cinética espermática como la estructura del flagelo, su oscilación y el movimiento en espiral rotativo, estos estudios reportaron un VCL de 160 $\mu\text{m/s}$. Otros estudios en anguila fueron los de Gibbons *et al.* (1985) que reportaron un VCL de $134 \pm 19 \mu\text{m/s}$, mientras Woolley (1998) obtuvo 160 $\mu\text{m/s}$, resultados que al ser comparados con los valores de VCL obtenidos en el presente estudio ($125 \pm 15 \mu\text{m/s}$), nos muestran que nuestros resultados se encuentran dentro de un rango similar a los obtenidos previamente para anguila europea.

También es importante destacar que la aplicación del sistema CASA en el presente estudio, ha supuesto un prolongado trabajo, en particular en cuanto a la puesta a punto de la técnica, diluciones y condiciones de grabación de los espermatozoides activados de anguila. Asimismo, hay que mencionar que los datos aquí presentados son algunas de las primeras aplicaciones realizadas en espermatozoides de peces.

El uso de diluyentes en esperma de peces supone la estandarización de las condiciones fisicoquímicas del medio durante el almacenaje. Estos diluyentes pueden constituir además la base de los medios de criopreservación del esperma. Ohta e Izawa (1995 y 1996) desarrollaron varios medios de conservación de esperma de anguila japonesa, tomando como base la composición química del plasma seminal de esta especie, y variando los niveles de K^+ y HCO_3^- , al tiempo que ajustaban la cantidad de Na^+ para mantener la osmolaridad constante (337.7 mOsm/kg) (Ohta *et al.* 1996) y un pH de 8.2. Ellos lograron observar que los espermatozoides permanecían inmóviles si las disoluciones eran isosmóticas (300-400 mOsm/kg) con el plasma seminal, pero se activan cuando la osmolaridad aumentaba (>500 mOsm/kg). Concluyendo que éste es uno de los principales factores a tener en cuenta en relación con la activación del esperma de anguila japonesa y posiblemente en anguila europea. El fenómeno de activación espermática está reportado en los trabajos realizados para anguila japonesa por Ohta e Izawa (1996), y también está documentado para diversas especies de teleósteos marinos como la dorada (*Sparus aurata*) (Chambeyron y Zohar, 1990) o la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Sansone *et al.* 2001).

Datos referentes a anguila europea publicados por Amin (1997) mostraron que el esperma de machos inducidos hormonalmente presentó un pH de 8, aunque no se midió el pH del plasma seminal. Además, Amin realizó un estudio sobre la composición de las soluciones activadoras de la movilidad de los espermatozoides. Para ello utilizó una solución empleada previamente para la maduración *in vitro* de huevos de esta especie, con una osmolalidad de 308.8-337.7 mOsm/kg y un pH 8.05.

Se observó que se presentaba cierta movilidad de los espermatozoides, aproximadamente un tercio del mayor tiempo de movimiento obtenido con una solución de osmolaridad 967.8 mOsm/kg (Asturiano *et al.* 2002b).

Con los datos obtenidos y basándonos en los estudios anteriormente mencionados para anguila europea (Amin 1997; Pérez *et al.* 2000) y japonesa (Miura *et al.* 1995; Ohta *et al.* 1997a, 1997b y 2001), se tomaron muestras de semen y se analizaron los plasmas seminales para determinar la composición fisicoquímica del esperma de anguila europea. Se obtuvo una osmolaridad de 320-330 mOsm/kg, un pH de 8.5 y una composición iónica (en mM): K^+ 35-40, Na^+ 110-120, Mg^{2+} 2 y Ca^{2+} 0.25 (Artículo II, pág. 60).

Se observó en el presente estudio que las mejores muestras de esperma para anguila europea mostraron concentraciones más altas de K^+ y Ca^{2+} , así como una concentración inferior de Na^+ y una concentración similar de Mg^{2+} con respecto a la anguila japonesa (Artículo II, tabla 1, pág. 64).

Por otro lado, cuando se han probado diluyentes para la criopreservación del esperma de anguila japonesa, se han utilizado composiciones bastante distintas. Así, los mejores resultados se han obtenido con soluciones (en mM) de K^+ 15-45, Na^+ 149.5-119.5 (para periodos hasta 28 días) o bien K^+ 45-75, Na^+ 119.5-89.5 (en el caso de periodos de conservación de 7 días). Estos rangos de valores en las concentraciones de K^+ y Na^+ utilizados en anguila japonesa comprenden las concentraciones medias obtenidas en el presente trabajo (Artículo II, tabla 1, pág. 64).

Finalmente, al comparar los resultados en anguila europea con los reportados para el plasma seminal de anguila japonesa (Ohta *et al.* 2001), se puede concluir que la composición iónica del plasma seminal de ambas especies es diferente.

La Figura 3 (Artículo II, pág. 64) muestra la frecuencia con que aparecieron las distintas categorías de calidad del esperma entre las muestras recogidas en cada muestreo, teniendo en cuenta sólo los machos espermiantes en cada muestreo. El mayor porcentaje de muestras de calidades altas se centró en los muestreos realizados durante las semanas décima y undécima de tratamiento.

En la anguila japonesa los medios de activación de espermatozoides tienen un pH de 8.2 (Miura *et al.* 1995). Este valor es cercano al 8.1-8.2 medido en el esperma (Ohta *et al.* 1996, 2001) y similar al 8.1-8.2 usado para medios diluyentes (Ohta e Izawa 1995,

1996; Ohta *et al.* 1997b, 1997c y 2001). En los últimos años Ohta *et al.* (2000, comunicación personal) y Tanaka *et al.* (2002a y 2002b) han desarrollado diferentes protocolos de criopreservación para anguila japonesa. Ellos obtuvieron buenos porcentajes de supervivencia en espermatozoides post-congelación con el pH ajustado a 8.2.

Partiendo del concepto de que el uso de diluyentes puede prolongar la vida del esperma refrigerado (Ohta *et al.* 1996) e incluso incrementar la movilidad de los espermatozoides tras un período de incubación (Ohta *et al.* 2001), se probaron los diluyentes K15 y K30 que presentaron resultados positivos en trabajos con anguila japonesa (Ohta e Izawa, 1995). Estos diluyentes con el esperma de anguila europea no presentaron buenos resultados. La viabilidad de los espermatozoides diluidos en estos medios mostró una reducción importante en relación al tiempo de incubación, por lo que se puede concluir que estos medios diluyentes no son buenos para la conservación de espermatozoides de anguila europea a medio plazo (Artículo II, figura 1, pág.62).

Tomando en cuenta que los medios diluyentes pueden ser utilizados como medios de congelación después de la adición de un determinado crioprotector (Ohta e Izawa 1996; Tanaka *et al.* 2002a), y una vez definidos los parámetros físico-químicos del semen de anguila europea, continuamos con otros experimentos para determinar el medio de dilución y de congelación que permitan obtener una mejor calidad de células espermáticas post-congelación. Para ello se utilizaron dos medios de congelación descritos previamente para anguila japonesa, el TNK (Tanaka *et al.* 2002a y 2002b) y el K30 (Ohta *et al.* 2001) junto con dos medios isosmóticos P1 y P2 (Asturiano *et al.* 2004a). Estos medios (P1 y P2) fueron preparados considerando los resultados de pH y composición iónica del plasma seminal de las muestras de esperma con mejor calidad obtenida en el experimento anterior. Durante las pruebas preliminares, encontramos que los medios P2 y K15 no mostraron buenos resultados en cuanto al porcentaje de células móviles después de la congelación, por lo cual los descartamos para el siguiente experimento.

En este estudio fueron evaluados diferentes factores de dilución (1:5, 1:20 y 1:100) para esperma en fresco en diferentes medios de congelación. Los medios de congelación utilizados fueron suplementados con el 10% (v/v) de DMSO como crioprotector. Los resultados obtenidos desde el punto de vista estadístico no fueron significativos, pero nos dejan ver una tendencia positiva en la dilución 1:5 en el medio

P1 con DMSO suplementado con lecitina, mostrando los mejores parámetros de movilidad espermática post-congelación (VCL, VSL, VAP y BCF) (Artículo II, figura 4, pág. 65).

Continuando con el estudio de los espermatozoides post-congelación de anguila europea, en el presente trabajo, se compararon los medios TNK y P1 utilizando DMSO como crioprotector y su comportamiento ante la presencia o ausencia de L- α -fosfatidilcolina. En general los mejores resultados se obtuvieron en las muestras con lecitina en cuanto a movilidad espermática y los parámetros de CASA (VCL, VSL, VAP y BCF) (Artículo II, figura 4, pág. 65). En forma global se puede decir que el DMSO se comportó como el mejor crioprotector para el proceso de congelación de espermatozoides de anguila europea, aunque los resultados no fueron significativos estadísticamente.

El uso del DMSO ha mostrado gran eficacia en el proceso de crioconservación de semen de diversas especies de teleosteos, hechos reportados en estudios previos (Ohta *et al.* 2001; Cabrita *et al.* 2001; Tanaka *et al.* 2002a; Basavaraja y Hegde 2004; Müller. *et al.* 2004; Medina *et al.* 2005). Tanto los diluyentes como los crioprotectores cumplen funciones específicas dentro del proceso de criopreservación, como proteger al espermatozoide de la acción tóxica de los productos del metabolismo celular y de los cambios bruscos de temperatura. Por otro lado, se ha descrito que la L- α -fosfatidilcolina (lecitina) tiene un efecto protector positivo durante el proceso de congelación (Tanaka *et al.* 2002a; Medina *et al.* 2005). Con la finalidad de reducir la mortalidad de las células espermáticas de anguila post-congelación se decidió suplementar con lecitina estos medios.

Para la activación de los espermatozoides, creemos que desde un punto de vista práctico, es conveniente usar el agua de mar por su fácil obtención. Sin embargo, con la intención de estandarizar la técnica y disminuir las variables dependientes del lugar de obtención, transporte, etc., el agua de mar usada en el presente estudio fue artificial, preparada en nuestro laboratorio, y no contenía bicarbonato de sodio. Asimismo, la concentración de KCl era inferior en comparación con los medios de activación usados por los autores japoneses. Sin embargo, aún usando esta concentración de KCl (9.4 mM), el porcentaje de células móviles obtenido en nuestro experimento superaba el 50% (clases de movilidad II–III). Dato similar al reportado por Ohta *et al.* (1997a y 2001) para anguila japonesa, lo cual nos sirvió para continuar utilizando esta solución como activador.

En el primer experimento del trabajo III se estudio el pH, la concentración de NaHCO_3 y el efecto del DMSO sobre la motilidad de espermatozoides de anguila europea. Se utilizaron dos diluyentes: TNK descrito para anguila japonesa por Tanaka *et al.* (2002a) y P1, propuesto por Asturiano *et al.* (2004a) para anguila europea y utilizando DMSO como crioprotector. Para determinar el efecto del pH en los medios el espermatozoides fue diluido 1:20 en P1 o TNK y a cada medio se le ajustó el pH: 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5 para P1 y 7.8 y 8.5 para el medio TNK, los resultados que fueron comparados con los *pools* control después de 5 min de incubación. Los resultados dejaron ver que el pH no representaba un factor importante en la movilidad espermática para los espermatozoides de anguila europea, al menos en el rango escogido.

Al mismo tiempo en el presente trabajo se pudo observar la imposibilidad de activar las muestras tras 5 min de incubación en medio P1 con DMSO (Artículo III, Fig. 1B, pág. 72), lo que podría deberse a la activación espermática causada por el DMSO (Tanaka *et al.* 2001, 2002a; Asturiano *et al.* 2004b; Müller *et al.* 2004), con el consiguiente consumo energético durante el periodo de incubación. De la misma forma se puede cuestionar la integridad de las mitocondrias, ya que éstas son las encargadas de suministrar la energía en forma de ATP. Si las mitocondrias son dañadas como consecuencia del estrés osmótico causado por la adición del crioprotector, se puede producir una disminución en la producción de ATP (Medina *et al.* 2005).

Estudios en anguila japonesa (Ohta *et al.* 2001; Tanaka *et al.* 2002b) atribuyen la posible pérdida en la capacidad de la movilidad a desequilibrios en la concentración de K^+ (bajos niveles) y NaHCO_3^- en las células espermáticas. Ohta *et al.* (2001) demostraron que estos iones pueden ser restaurados, dando nueva capacidad de movimiento a los espermatozoides como sucede en el conducto espermático.

La diferencia entre los medios P1 y TNK fue la mayor concentración de NaHCO_3^- del segundo (Artículo III, experimento 1), y fue tras incubar los espermatozoides en el medio TNK cuando pudieron ser activados. Esto coincide con el papel inhibitor de movimiento del NaHCO_3 sugerido por Tanaka *et al.* (2002b).

Tomando en cuenta la variabilidad de datos anteriormente descritos, se podría ampliar el rango de pH utilizado en el presente estudio y analizarlo junto con la concentración de NaHCO_3 con el fin de poder determinar su relación en los procesos de activación de los espermatozoides; para lograr de esta manera una aproximación más clara

sobre la acción de estos iones en el proceso de activación o inhibición del movimiento espermático post-congelación.

Considerando los resultados anteriores, se realizó un experimento en el cual se aumento la concentración de NaHCO_3 del medio P1, al que se llamó P1 modificado. En el artículo III (Experimento 3, Fig. 3B, pág. 73) donde se pudo ver que el medio P1 modificado (mayor concentración de NaHCO_3), presentó un porcentaje de células móviles significativamente mayor con respecto al medio P1 inicial.

El proceso de criopreservación causa inestabilidad funcional, pérdida en la integridad de la membrana y cambios en la capacidad de respuesta de las células frente a la situación de estrés. Para mantener constante la concentración iónica se producen cambios en los mecanismos de regulación del volumen intracelular durante la congelación y descongelación (Petrunkina *et al.* 2004). La reducción del área y del perímetro de la cabeza es la respuesta osmótica a las presiones durante el proceso de criopreservación. Los mejores resultados en cuanto a protección se obtienen cuando el crioprotector penetra rápidamente en las células durante el enfriamiento, retrasa el enfriamiento intracelular y minimiza el efecto solución o deshidratación celular (Simione, 1998; Medina *et al.* 2005).

Conociendo los resultados de distintos estudios previos (Fabbrocini *et al.* 2000; Tanaka *et al.* 2001, 2002a; Asturiano *et al.* 2004b; Müller *et al.* 2004; Medina *et al.* 2005) en cuanto a los posibles problemas del DMSO como crioprotector y su influencia en la activación espermática, decidimos utilizar el método de análisis informático ASMA (Davis *et al.* 1992; Marco-Jiménez *et al.* 2004). Para lograr una cantidad mayor de información sobre el comportamiento de los espermatozoides a nivel morfológico ante la presencia del DMSO y de otros crioprotectores.

En el experimento 2 del artículo III se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos (tinción vital de Hoechst) y los parámetros morfométricos de los espermatozoides post-congelación (ASMA) considerando así los efectos causados por una batería de 6 crioprotectores (MeOH, glicerol, DMSO, propanol, etilenglicol y acetamida). Los resultados se compararon con los mismos parámetros obtenidos en las células espermáticas de los *pools* en fresco (Artículo III, Fig. 2 A-D, pág.72).

El DMSO fue el que presentó el mayor porcentaje de espermatozoides vivos post-congelación y una menor modificación en el perímetro de los espermatozoides sin diferencias significativas en relación a las células de los *pools* en fresco. Este

resultado puede explicarse probablemente debido a su bajo peso molecular y su alto grado de permeabilidad en las células (He y Woods, 2003) lo que facilita su entrada y salida de las células espermáticas (Basavaraja y Hegde, 2004), disminuyendo el daño mitocondrial y la producción de ATP necesario para la movilidad espermática.

En conjunto los resultados del experimento 2 mostraron al DMSO, al MeOH y al glicerol como los mejores candidatos, siendo así escogidos para el tercer experimento.

Las proteínas y lípidos presentes en el FBS pueden jugar un papel importante en el proceso de criopreservación como mecanismo de defensa frente a la inestabilidad de la membrana plasmática (Watson, 1995) y facilitar la supervivencia de los espermatozoides, posiblemente gracias a la protección sobre las enzimas lábiles o por la capacidad de estabilizar las proteínas en soluciones acuosas. Aunque, por otro lado, las enzimas pueden provocar la desnaturalización de las proteínas a altas temperaturas y provocar toxicidad en los sistemas celulares (Chao, 1991).

En el experimento 3 (Artículo III, Fig. 3B, pág. 73) se observó que el mejor resultado en cuanto a movilidad espermática post-congelación fue conseguido utilizando P1 modificado en la mezcla que contenía DMSO + FBS. Probablemente la protección mecánica a nivel de membrana suministrada por el FBS permitiría que las estructuras internas de los espermatozoides se encontraran en buenas condiciones durante la congelación. Este resultado confirma el efecto protector del FBS descrito por Ohta *et al.* (2001) en anguila japonesa y por Marco-Jiménez *et al.* (2006a) en anguila europea.

Existe la hipótesis de que determinadas sustancias podrían interactuar con la membrana plasmática manteniendo la estabilidad estructural durante el proceso de congelación y descongelación (Anchordoguy *et al.* 1988; Lahnsteiner 1996; He y Woods, 2003). Estudios previos de Ohta (2000, comunicación personal) en los que se empleaban medios con FBS ya hacían referencia a buenos resultados en cuanto a incrementos en la movilidad espermática post-congelación en la anguila japonesa.

En el presente estudio (Artículo III, experimento 3, Fig. 3a y b, pág. 73) se aprecia una mayor movilidad espermática post-congelación en las muestras en el medio P1 modificado con DMSO como crioprotector y en presencia de FBS ($22.2 \pm 1.5\%$).

En lo referente a la supervivencia de los espermatozoides post-congelación, las muestras congeladas en los medios P1 y P1 modificado mostraron una reducción

significativa (>48%) con respecto a los *pools* en fresco independiente de la adición del FBS (artículo III, experimento 4, Fig. 4a y b, pág. 73).

Resumiendo los aportes de los tres artículos que comprenden la presente tesis sobre la inducción de la espermiación y la criopreservación del esperma de anguila europea son:

- En cuanto a los métodos de inducción hormonal se vio que el tratamiento A induce el más alto porcentaje de machos espermiantes y por esto también el mayor número de muestras, esto con aplicaciones periódicas de hormonas durante todo el periodo de espermiación.
- Al probar los diferentes factores de dilución pudimos ver que en el artículo II la relación 1:5 (esperma: medio de congelación) da el mejor resultado en cuanto a células espermáticas vivas post-congelación y por eso, se plantea continuar los experimentos con factores de dilución menores como 1:1 ó 1:2 permitiendo de esta manera mantener altas concentraciones de esperma congelado.
- El DMSO con una concentración final de la mezcla del 10% v/v (Artículos II y III) mostró ser el crioprotector que proporciona mejores resultados en cuanto a porcentaje de células espermáticas vivas post-congelación y una menor modificación del área de los espermatozoides (Artículo III, fig. 2D), confirmando los estudios previos realizados con el método informático ASMA por Marco-Jiménez *et al.* (2006).
- La adición de FBS puede ser un factor importante en la protección de la integridad de la membrana espermática durante la congelación y de esta manera, aumentar la supervivencia de los espermatozoides (Artículo III, figura 3).
- El rango de pH utilizado en el presente estudio se debe ampliar (Artículos I, II y III) y comparar con la variación en la concentración de NaHCO_3 (Artículo III). Esto permitirá determinar su relación en los procesos de activación o inhibición con el objetivo de mejorar la funcionalidad post-congelación de los espermatozoides.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. En machos procedentes de piscifactoría con un peso inicial promedio de 142.3 ± 5.2 g el tratamiento A (dosis semanal de 1.5 UI hCG/g pez durante 12 semanas) permitió obtener el máximo porcentaje de machos espermiantes, así como un periodo de espermiación más largo y un mayor volumen de esperma.
2. La aplicación de hCG a machos de anguila en tratamientos cortos puede ser suficiente para producir maduración sexual y espermiación, y un estímulo hormonal continuo, permite mantener una buena calidad del esperma.
3. Los medios diluyentes adecuados para el semen de anguila japonesa, al ser probados en anguila europea producen disminuciones considerables en el porcentaje de espermatozoides móviles y en los parámetros de movilidad, por lo que estos medios no son convenientes para preservar el esperma de anguila europea.
4. Los medios de congelación TNK y P1, conteniendo DMSO y lecitina, originaron los mayores resultados de supervivencia post-congelación.
5. El DMSO es un crioprotector útil en el proceso de congelación de esperma de anguila europea. Sin embargo, el DMSO incrementa la osmolaridad del medio activando el movimiento de los espermatozoides, lo que reduce los tiempos de manipulación del esperma en los procesos de pre-congelación y post-congelación antes de que los espermatozoides consuman su energía.
6. La adición de lecitina al medio tiene cierto efecto positivo en el proceso de congelación del esperma de anguila europea, coincidiendo con resultados previos para anguila japonesa.
7. El menor factor de dilución espermática (esperma:medio de congelación) en el presente estudio (1:5) dio el mejor resultado de supervivencia espermática post-congelación.
8. El pH no representa un factor importante en el control de la movilidad de los espermatozoides de anguila europea, al menos en el rango seleccionado (7-8.5).

9. El mejor resultado global se logró con DMSO mezclado en P1 modificado conteniendo FBS como diluyente, dando como resultado un incremento significativo del porcentaje de movilidad espermática post-congelación.

X. BIBLIOGRAFÍA

Amerand, A., Vettier, A., Sebert, P. y Moisan, C. (2006). Does hydrostatic pressure have an effect on reactive oxygen species in the eel? *Undersea Hyperb. Med.*, 33, 3, 157-60.

Amin E. M. (1997). Observations on reproduction techniques applicable to the European eel (*Anguilla anguilla* L.). In: Bartley D, Basurco B., eds. Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species. *Cahiers Options Méditerranéennes* (CIHEAM-FAO). 34, 223-234.

Anchordoguy, T., Crowe, J., Griffin, F. y Clark, W. (1988). Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Cryobiology*, 25, 238-243.

Asturiano, J. F., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D. S., Garzón, D. L., Pérez, L., Vicente, J. S. y Jover, M. (2007). Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animal*, 42, 162-166.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Garzón, D. L., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S. y Jover, M. (2004a). Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, 283-293.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Garzón, D. L., Peñaranda, D. S., Marco-Jiménez, F., Martínez, S., Tomás, A. y Jover, M. (2005). Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquaculture Research*, 36, 1480-1487.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Marco-Jiménez, F., Olivares, L., Vicente, J. S. y Jover, M. (2003). Media and methods for the cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 501-502.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Pérez-Navarro, E. J., Garzón, D. L., Martínez, S., Tomás A., Marco-Jiménez, E., Vicente, J. S. y Jover, M. (2004b). Optimization trial of methods for induction of spermiation in European eel (*Anguilla anguilla*) and test of different sperm activation media. *Aquaculture Europe 2004 book of abstracts*. Biotechnologies for quality. *Aquaculture society special publication*, 34, 130-131.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Tomás, A., Zegrari, S., Espinós, F. J. y Jover, M. (2001). Inducción hormonal de la maduración gonadal y puesta en hembras de anguila europea (*Anguilla anguilla*): Primeros resultados en: Dirección General de Pesca y Alimentación, Gobierno de Cantabria, eds. Actas VIII Congreso Nacional de Acuicultura, p.p. 162-163.

Asturiano, J. F., Pérez, L., Tomás, A., Zegrari, S., Espinós, F. J. y Jover, M. (2002a). Inducción hormonal de la maduración gonadal y puesta en hembras de anguila europea (*Anguilla anguilla*): primeros resultados. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, 18, 1-4, 127-137.

Asturiano, J. F., Sorbera, L. A., Ramos, J., Kime, D. E., Carrillo, M. Y Zanuy, S. (2002b). Group-synchronous ovarian development, spawning and spermiation in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci. Mar.*, 66, 3, 273-282.

- Babiak, I., Glogowski, J., Kujawa, R., Kucharczyk, D. y Mamcarz. (1998). Cryopreservation of sperm from asp *Aspius aspius*. *Prog. Fish-cult.*, 60, 2, 146-148.
- Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M., Kucharczyk, D. y Luczynski, M. (1995). Cryopreservation of the milt of northern pike. *Journal of Fish Biol.*, 46, 819-828.
- Baker, H. W. G. y Clarke, G.N. (1987). Sperm morphology: consistency of assessment of the same sperm by different observers. *Clin. Reprod. Fertil.*, 5, 37-43.
- Basavaraja, N. y Hegde, S.N. (2004). Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor Khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio and storage period on post-thaw viability. *Cryobiology*, 49, 149-156.
- Bieniarz, K. y Epler, P. (1977). Investigation on inducing sexual maturity in male eel *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology*, 10, 555-559.
- Billard, R. (1978). Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture*, 14, 187-198.
- Billard, R. (1983). Ultrastructure of trout spermatozoa: changes after dilution and deep-freezing. *Cell and Tissue Research*, 228, 205-218.
- Billard, R. y Cosson, M.P. (1992). Some problems related to the assessment of sperms motility in freshwater fish. *J. Exp. Zool.*, 261, 122-131.
- Billard, R. y Ginsburg, S. A. (1973). La spermiogenese et le spermatozoïde de d'Anguilla anguilla L. étude ultrastructurale. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, 13, 523-534.
- Billard, R., Cosson, J. y Linhart, O. (2000). Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baerii* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research*, 31, 283-287.
- Blythe, W.G., I.A. Helfrich y V. Sullivan. (1994). Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6, 9 and 12 month photothermal cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 94, 122-134.
- Boëtius, I. y Boëtius, J. (1967). Studies in the European Eel, *Anguilla anguilla* (L.). Experimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri-og Havundersogelser*, 4, 11, 339-405.
- Boëtius, I. y Boëtius, J. (1980). Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana*, 1, 1-28.
- Breton, B. Weil, C., Jalabert, B., y Billard, R. (1972). Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Bélier (*Ovis aries*) et des poissons téléostéens sur la sécrétion in vitro des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophysés de Carpe et de Bélier. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III*. 274, 2530-2533.
- Cabrera E. Anel L. y Herraéz M.P. (2001) Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizer on cryopresered rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 56, 623-635.

- Cabrita E., Robles V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete y Herráez, M. P. (2005) Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml microtubes. *Cryobiology*, 50, 3, 273-284.
- Caylor R. E., Biesiot, P.M. y Franks, J.S. (1994). Culture of cobia (*Rachycentron canadum*): cryopreservation of sperm and induced spawning. *Aquaculture*, 125, 1-2, 81-92.
- Chambeyron, F. y Zohar, Y. (1990). A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 90, 345-352.
- Chang, J.P., Johnson, J.D., Van Goor, F., Wong, C.J., Yunker, W.K., Uretsky, A.D., Taylor, D., Jobin, R.M., Wong, A.O. y Goldberg, J.I. (2000). Signal transduction mechanisms mediating secretion in goldfish gonadotropes and somatotropes. *Biochem Cell. Biol.*, 78, 139-153
- Chao, N. y Liao, Ch. (2001). Cryopreservation of fish and shell fish gametes and embryos. *Aquaculture*, 197, 161-189.
- Chao, NH. (1991). Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extension efforts. Paper on International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture. Department of Aquaculture, Taiwan Fishery Research Institute, Taiwan; 31.
- Chereguini, O., Fernández, P. C. y Rasines, I. (1992). Adaptación de la técnica de criopreservación de esperma para el rodaballo (*Scoththalmus maximus*) y besugo (*Pagellus bogaraveo*). *Instituto Español de Oceanografía*, 117, 1-11.
- Cifuentes, J. L., Torres, M. P. y Frías, M. (1986). La composición química del agua del mar. El océano y sus recursos II. Las ciencias del mar: oceanografía geológica y oceanografía química. ([www. Omega.ilce.edu.mx](http://www.Omega.ilce.edu.mx):3000).
- Claassens, O.E., Kaskar, K., Coetzee, K., Lombard, C.J., Franken, D.R. y Kruger, T.F. (1996). Comparison of motility characteristics and normal sperm morphology of human semen samples separated by percoll density gradient centrifugation. *Arch. Androl.*, 36, 2, 127-32.
- Çolak, A. y Yamamoto, K. (1974). Ultrastructure of the Japanese eel spermatozoa. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, 47, 48-54.
- Copeland, P. A., y Thomas, P. (1993). Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic Croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 115-125.
- Davis, R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Andrew, J.B. y Gravance, C.G. (1992). Accuracy and precision of the Cell Form. Human automated sperm morphometry instrument. *Fertility and Sterility*, 58, 763-769.
- Davis, R.O. y Gravance, C.G. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertility and Sterility*, 59, 412-417.
- Davis, R.O., Gravance, C.G. y Overstreet, J. W. (1995). A standardized test for visual analysis of human sperm morphology. *Fertility and Sterility*, 63, 5, 1058-1063.

- Dollerup, J. y Graver C.M. (1985). Repeated induction of testicular maturation and spermiation, alternating with periods of feeding and growth in silveer eells. *Anguilla anguilla* L., *Dana*, 4, 19-39.
- Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H. y Zohar, Y. (1996). Gonadotropins beta-GtHI and beta-GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 102, 39-46.
- Ellerby, D.J., Spierts, Ily. y Altringham, J.D. (2001). Fast muscle function in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) during aquatic and terrestrial locomotion. *J. Exp. Biol.*, 204, 2231-2238.
- F.A.O. (2000, 2004, 2006). Bases de datos estadísticas. (<http://www.fao.org>)
- Fabbrocini, A., Lubrano Lavadera, S., Rispoli, S. y Sansone, G. (2000). Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*, 40, 46-53.
- Feunteun, E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecological Engineering*, 18, 575-591.
- Fontaine, Y. A., Dufour, S., Tanguy, G., Khan, L.A., Cédrad, I. y Leloup-Hatey, J. (1985). Clairances métaboliques de la gonadotropina chorionique humana (hCG) et de la gonadotropina de carpe (cGTH) chez un poisson téléostéen, l'anguille. *Colloque Physiologie des poissons. Actes des colloques INRA: Physiologie des poisson*. Paimpont, France. p.p 10.
- Fricke, H. y Kaese, R. (1995). Tracking of artificially matured eels (*Anguilla anguilla*) in the Sargasso sea and the problem of the eel's spawning site. *Naturwissenschaften*, 83, 32-36.
- Gage, M., Stockley, J. G. y Parker, G. A. (1998). Sperm morphometry in the Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 53, 835-840.
- García-Hernández, M. P., Koide, Y., Díaz, M. V. Kawauchi, H. (1994). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). *Gen. Com. Endocrinol.*, 106, 389-399.
- Garner A. (1986). Future opportunities for drug therapy in peptic ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.*, 125, 203-210.
- Garner A. (1994). Development of modern anti-ulcer drugs. *Br. J. Clin. Pract. Suppl.* May-Jun, 75, 1-5, discussion 6-8.
- Gibbons, B. H., Bacseti, B. y Gibbons, I. R. (1985). Live and reactivated motility of the 9+0 flagellum of *anguilla* sperm. *Cell Motility*, 5, 333-350.
- Gibbons, B. H., Gibbons, I. R. y Bacseti, B. (1983). Structure and motility of the 9 + 0 flagellum of eel spermatozoa. *J. Submicr. Cytol.*, 15, 15-20.
- Gousset, B. (1992). Eel culture in Japan. Bulletin de l'institute Océanographique, Monaco. N° spécial 10. 1-128. *Éditeurs scientifiques: François Doumenge et anne Toulemont*. ISSN : 0304-5722.

- Gwo, J.-C. y Arnold, C.R. (1992). Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. *Journal of Experimental Zoology*, 264, 444-453a.
- Gwo, J.-C., Ohta, H., Okuzawa, K. y Wu, H.-C. (1999). Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). *Theriogenology*, 51, 569-582.
- Han, Y.S., Liao, I.C., Huang, Y.S., Tzeng, W.N. y Yu, J.Y. (2003). Profiles of PGH-alpha, GTH I-beta, and GTH II-beta mRNA transcript levels at different ovarian stages in the wild female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 8-16.
- Hara A., Yamauchi, K. y Hirai, H. (1980). Studies on female specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk protein in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp Biochem Physiol.*, 65B, 315-320.
- Hazum, E. y Conn, P.M., (1988). Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). I. The GnRH receptor. *Endocrine Rev.*, 9: 379-395.
- He, S. y Woods, L.C. (2003). Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*, 46, 17-25.
- Hellqvist, A., Bornestaf, C., Borg, B. y Schmitz, M. (2004). Cloning and sequencing of the FSH-beta and LH beta-subunit in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and effects of photoperiod and temperature on LH-beta and FSH-beta mRNA expression. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 135, 167-174.
- Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.*, 62, 3-22.
- ICES, International Council for Exploration of the Sea (2006). ICES Cooperative Research Report, nº 246.
- Kagawa, H., Iinuma, N., Tanaka, H., Ohta, H. y Okuzawa, K. (1998) Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 64, 77-82.
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Okuzawa, K. y Iinuma, N. (1997). Induced ovulation by injection of 17,20b-dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Science*, 63, 365-367.
- Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., y de Monbrison, D. (1993). The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem*, 11, 85-98.
- Kajimura, S., Yoshiura, Y., Suzuki, M. y Aida, K. (2001). cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-Ibeta and -IIbeta) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 122, 117-129.
- Kennedy, C. R. y Fitch, D. J. (1990). Colonisation, larval survival, and epidemiology of the nematode *Anguillicola crassus*, parasite in the eel *Anguilla anguilla* in Britain. *Journal of Fish Biology*, 36, 117-131.

- Khan, I. A., López, E. y Leloup-Hatey, J. (1987). Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). *General and comparative Endocrinology*, 68, 91-103.
- Kime, D. E., Van Look, K. J. W., Mcallister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E. y Ollevier, F. (2001). Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130, 425-433.
- King, J.A. y Millard, R.P. (1982). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *J. Biol. Chem.*, 257, 10722-10728.
- Klinefelter, G.R., Gray, E.G. Jr, Suárez, J.D. (1991). The method of sperm collection significantly influences sperm motion parameters following ethane dimethanesulphonate administration in the rat. *Reprod Toxicol.*, 5, 39-44.
- Koide, Y., H. Itoh y H. Kawauchi. (1993). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus pelamis*) pituitary glands. *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 41, 52-65.
- Koops, H. y Hartmann, F. (1989). *Anguillicola* infestations in Germany and in German eel imports. *Journal of Applied Ichthyology*, 1, 41-45.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weissmann, T. y Patzner, R. A. (1996). The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after cryopreservation. *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 99-106.
- Lee, H. C., Johnson, C. y Epel, D. (1983). Changes in internal pH associated with initiation of motility and acrosome reaction of sea urchin sperm. *Developmental Biology*, 95, 31-45.
- Leeuw, A.R. y Dreschler, W.A. (1991). Advantages of directional hearing aid microphones related to room acoustics. *Audiology*, 30, 6, 330-344.
- Leloup-Hâtey, L., Oudinet, J.P. y López, E. (1985). Testicular steroidogenesis during gonadotropin-induced spermatogenesis in male European eel (*Anguilla anguilla* L.) *Current trend in comparative Endocrinology* (ed. By B. Softs y W.N. Holmes). p.p. 229-239. China: Hong Kong University Press.
- Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.J. y Kah, O. (2004). Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 135, 1-16.
- Lin, X-W.P., Rupnow, B.A., Price, D.A., Greenberg, R.M., y Wallace, R.A. (1991). Fundulus heteroclitus gonadotropins. Cloning of gonadotropic hormone (GTH) I and II β subunits using the polimerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 85, 127-139.
- Linhart, O., Slechta, V. y Slavíc, T. (1991). Fish sperm composition and biochemistry Bulltin of the Institute of Zoology. *Academia Sinica. Monograph.*, 16, 285-311.
- Magyary, I., Urbányi, B. y Horváth, L. (1996). Criopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal Appl. Ichthyol.*, 12, 117-119.

Marco-Jiménez, F., Asturiano, J. F., Pérez, L., Garzón, D. L., Pérez-Navarro, F.J., Martínez, S., Tomás, A., Vicente, J.S. y Jover, M. (2006). Morphometry characterization of the European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 65, 1302-1310.

Marco-Jiménez, F., Asturiano, J.F., Pérez, L., Garzón, D.L., Pérez-Navarro, F.J., Martínez, S., Tomás, A., Vicente, J.S. y Jover, M. (2004). Morphometric characterization of the European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis. 5th International Symposium on Fish Endocrinology. Castellón (Spain).

Marco-Jiménez, F., Garzón, D. L., Peñaranda, D. S., Pérez, L., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Jover, M. y Asturiano, J.F. (2006a). Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*, 53, 51-57.

Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Viudes de Castro, M. P., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Jover, M. y Asturiano, J.F. (2006b). Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 65, 1302-1310.

Maricine, M. y Sergner, H. (1998). Glutathione status of metal-exposed fish cells: time and dose dependency. Proceedings of the 19th ESCPB congress, cellular and molecular responses to environmental changes. *European Society for Comparative Physiology and Biochemistry*. Turkey.

Mateos, J., Mañanos, E., Martínez-Rodríguez, G., Carrillo, M., Querat, B. y Zanuy, S. (2003). Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits(alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 133, 216-232.

Medina, V., Velasco, Y. y Cruz, P. (2005). Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18, 1, 34-48.

Meske, C. (1973). Experimentally induced sexual maturity in artificially reared male eels (*Anguilla anguilla* L). Genetics and Mutagenesis of Fish (ed. By J.H. Shröder). Germany: *Springer-Verlag*. p.p. 161-170.

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (2004-2006). (<http://www.mapya.es/jacumar/>).

Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y. y Yamauchi, K. (1995). Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fisheries Science*, 61, 533-534.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H. y Nagahama, Y. (1991). Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science*, 8, 63-73.

Mizukami, A., Carrell, D.T., Peterson, C. M. (1999). *Cryopreservation of embryos*. *Encyclopedia of reproduction*. Uhta: Academic Press. 1, 768-772.

- Mounib, M.S. (1978). Cryogenic preservation of fish and mammalia spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 53, 13-18.
- Müller, T., Baska, F., Niklesz, C., Váradi, B., Horn, P. y Bercsényi, M. (2005). The testis histology of artificially matured European eel (*Anguilla anguilla*) at the end of sexual maturation, and spermatozoa ultrastructure in freshwater rearing. *Short communication Acta Biologica Hungarica*, 56, 1-2, 169-172.
- Müller, T., Urbányi, B., Váradi, B., Binder, T., Horn, P., Bercsényi, M. y Horváth, A. (2004). Cryopreservation of sperm of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 240-246.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.*, 38, 217-229.
- Nagoya, H., Okamoto, H., Nakayama, I., Araki, K. y Onozato, H. (1996) Production of androgenetic diploids in mago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae*. *Fish Sci.*, 62, 380-383.
- Nielsen, T. (1998). Elevages en Chine: Les revers du succès. *Eaux libres*, 24, 20-22. (<http://www.traffic.org/bulletin/Nov2002/eels.pdf>).
- Oda, S. y Morisawa, M. (1993). Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. *Cell Motil Cytoskeleton*, 25, 171-178.
- Ogier de Baulny, B. (1997). Cryoconservation de sperme de poissons. Evaluation des dommages cellulaires. Amélioration de la technique de congélation. Permèabilité Membranaire aux Cryoprotectants. Thesis, Rennes.
- Ohta, H. e Izawa, T. (1995). Cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. In: Goetz FW, Thomas P, eds.). *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*.
- Ohta, H. e Izawa, T. (1996). Diluent for cool storage of the Japanese eel (*Anguilla japonica*) spermatozoa. *Aquaculture*, 142, 107-108.
- Ohta, H. y Tanaka, H. (1997). Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153, 123-134.
- Ohta, H., Ikeda, K. e Izawa, T. (1997a). Increases in concentrations of potassium and bicarbonate ions promote adquisition of motility in vitro by Japanese eel spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 277, 171-80.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H. y Unuma, T. (2001). Control by the environmental concentration of ions of the potential for motility in Japanese eel spermatozoa. *Aquaculture*, 198, 339-351.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K. y Hirose, K. (1996). Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fisheries Science*, 62, 44-49.

Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Linuma, N., y Hirose, K. (1997b). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.*, 17, 163-169.

Ohta, H., Tanaka, H., Kagawa, H., Okuzawa, K. y Linuma N. (1997c). Artificial fertilization using testicular spermatozoa in the Japanese eel, (*Anguilla japonica*). *Fisheries Science*, 63, 3, 393-396.

Okada, T., Kawazoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida, K., y Kawauchi, H., (1994). Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int. J. Peptide Prot. Res.*, 43, 69-80.

Okamura, A. y Motonobu, T. (1999). Spermatozoa of *Conger myriaster* observed by electron microscopy. *Zoological Science*, 16, 927-933.

Okamura, A., Zhang, H., Yamada, Y., Tanaka, S., Horie, N., Mikawa, N., Utoh, T., y Oka, H.P. (2000). Re-examination of the spermatozoal ultrastructure of eels: observations of the external morphology of spermatozoa in three species. *Journal of Fish Biology*, 57, 161-169.

Palstra, A. (2006). *Energetic requirements and environmental constraints of reproductive migration and maturation of European silver eel (Anguilla angilla L.)*. Integrative zoology, Institute of Biology Leiden, van der klaauw laboratories. Tesis Doctoral. Netherlands

Pedersen, B.H. (2003). Induced sexual maturation of European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture*, 224, 323-338.

Pedersen, B.H. (2004). Fertilization of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquaculture*, 237, 461-474.

Pérez, L., Asturiano, J. F., Barrera, R. y Jover. M. (2004). Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *Revista AquaTIC*, 20, 51-78

Pérez, L., Asturiano, J.F., Martínez, S., Tomás, A., Olivares, L., Mocé, E., Lavara, R., Vicente, J.S. y Jover, M. (2003). Ionic composition and physio-chemical parameters of the European eel (*Anguilla anguilla*) seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 221-222.

Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C. y Jover, M. (1999). Inducción de la espermiación con gonadotropina en la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Estudio de la evolución de la morfología externa y de los parámetros de calidad del esperma. *VII Congreso Nacional de Acuicultura*, Las Palmas de Gran Canaria. 211.

Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C. y Jover, M. (2000). Induction of maturation and spermiation in the male European eel (*Anguilla anguilla*). Assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.*, 57, 1488-1504.

- Peter, R.E., Trudeau, V.L., Sloley, B.D., Peng, C., y Nahorniak, C.S., (1991). Actions of the catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. En Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Scott, A.P., University of East Anglia. Norwich, U.K., FishSymp 91.Sheffield. 30-33.
- Petrunkina, A.M., Gropper, B., Gunzel-Apel, A.R., Topfer-Petersen, E. (2004). Functional significance of the cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. *Reproduction*, 128, 829-842.
- Pierce y Parsons. (1981). Glycoprotein hormones:structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 465-495.
- Piironen, J. (1993). Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta m. lacustris* L.) and arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Aquaculture*, 116, 2-3, 275-285.
- Pursel, V.G. y Johnson, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1, 2, 63-8.
- Rana, K.J. (1995). *Methods in Molecular Biology, Vol 38: Cryopreservation and Freeze-drying Protocols*. Cryopreservation of Fish Spermatozoa. Chapter 16.
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F. y Nash, J.P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234, 1-28.
- Saksena, D.N., Miura, T., Jiang, J. y Nagahama, Y. (1995). A rapid activation of mature testis of japanese eel (*Anguilla japonica*) by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Journal of Biosciences*, 20, 675-689.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Zupa, A., Lavadera, S.L., Rispoli, S. y Matassino, D. (2001). Inactivator media of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa motility. *Aquaculture*, 202, 257-268.
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chávez, C., Tiersch, T.R. (2000). Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*, Apr 15, 53, 7, 1489-1499.
- Sherwood, N. M., Lovejoy, D. A. y Coe, I.R., (1993). Origin of non-mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Rev.*, 14, 241-254.
- Simione, F.P. (1998). Cryopreservation manual. New York: Nalge Nunc International Corp. 8.
- Slott, V.L., Suarez, J.D. y Perreault, S.D. (1991). Rat sperm motility analysis: Methodologic considerations. *Reprod. Toxicol.*, 5, 449-458.
- Slott, V.L., Suárez, J.D., Poss, P.M., Linder, R.E., Strader, L.F. y Perrault, S.D. (1993). Optimization of the Hamilton-Thorn Computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21, 298-307.
- Sorensen, P.W. y Winn, H.E. (1984). The induction of maturation and ovulation in American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur), and the relevance of chemical and visual cues to male spawning behaviour. *Journal of Fish Biology*, 25, 261-268.

- Stein, H. y Bayrle, H. (1978). Cryopreservation of sperm of some fresh water teleosts. *Ann. Biol. Anim. Biophys*, 18, 1073-1076.
- Susquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J. y Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research*, 31, 231-243.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. y Nagahama, Y. (1988). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 71, 292-301.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas. En: Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime & M.S. Rolfe, Eds.). *Fish Symp*, 91. Sheffield. 2-7.
- Szabó, G., Müller, T., Bercsényi, M., Urbányi, B., Kucska, B. y Horváth, A. (2005). Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. *Acta Biologica Hungarica*, 56, 1-2, 173-175.
- Tanaka, H., Kagawa, H. y Ohta, H. (2001). Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture*, 201, 51-60.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Okuzawa, K., Hirose, K. (1995). The first report of eel larvae ingesting rotifers. *Fisheries Science*, 61, 171-172.
- Tanaka, S., Utoh T., Yamada Y., Horié N., Okamura A., Akazawa A., Mikawa N., Oka H.P. y Kurokura, H. (2004). Role of sodium bicarbonate on the initiation of sperm motility in the Japanese eel. *Fisheries Science*, 70, 780-787.
- Tanaka, S., Zhang, H., Horie, N., Yamada Y., Okamura, A., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P. y Kurokura, H. (2002a). Long-term cryopreservation of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology*, 60, 139-146.
- Tanaka, S., Zhang, H., Yamada, Y., Okamura, A., Horie, N., Utoh, T., Mikawa, N., Oka, H.P. y Kurokura, H. (2002b). Inhibitory effect of sodium bicarbonate on the motility of sperm of Japanese eel. *Journal of Fish Biology*, 60, 1134-1141.
- Tesch, F. W. (2003). *The eel*. Blackwell Science Lt, Oxford.
- Thorgaard, G. H. (1983). Chromosomal differences among rainbow trout populations. *Copeia*, 3, 650-662.
- Trudeau, V.L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.*, 2, 55-68.
- Usui, A. (1991). "Eel culture, 2nd edition." Cambridge, MA, USA, *Blackwell Scientific Pub.* 148.
- Van Look, K. J. W. y D. E. Kime. (2004). Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, 63, 1020-1033.
- Vettier, A., Amerand, A., Cann-Moisan, C y Sebert P. (2005) Is the silvering process similar to the effects of pressure acclimatization on yellow eels? *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 145, 2-3, 243-50.

- Vicente Antón, J. S. (2001). *Crioconservación de gametos y embriones*. Editorial U.P.V. Ref: 2001.948.
- Viveiros, A. T. (2001) Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted show-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias griepinus*. *Cryobiology*, 43, 276-287.
- Vladic, T. V., Afzelius, B. A. y Bronnikov, G. E. (2002). Sperm quality as reflected through morphology in salmon alternative life histories. *Biol. Reprod.*, 66, 98-105.
- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, 871-891.
- Weltzien, F.A., Kobayashi, T., Andersson, E., Norberg, B. y Andersen, O. (2003). Molecular characterization and expression of FSHbeta, LHbeta, and common alpha-subunit in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 131, 87-96.
- Woolley, D.M. (1997). Studies on the eel sperm flagellum I. The structure of inner dynein arm complex. *Journal of Cell Science*, 110, 85-94.
- Woolley, D.M. (1998). Studies on the eel sperm flagellum III. Vibratile motility and rotatory bending. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 39, 246-255.
- Yang H. Carmichael C. Varga Z y Tiersch T. (2007). Development of simplified and standardized protocol with potencial for high-throughput for sperm cryopreservation in Zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*, 68, 2, 128-136.
- Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A. y Levavi-Sivan, B. (2003). Regulation of fish gonadotropins. *Int. Rev. Cytol.*, 225, 131-185.
- Yu, J. Y. L. y Shen, S. T. (1989). Isolation of pituitary glycoprotein gonadotropins from the grass carp (*Ctenopharyngodon idell*). *Fish Physiol. Biochem.* 7, 177-183.

XI. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis directores los Doctores Luz Pérez y Juan F. Asturiano por su tiempo, dirección y aporte experimental.

Al Doctor Rodolfo Barrera de la empresa Valenciana de Acuicultura, S.L. por su aporte al suministrar la materia prima de estos experimentos (anguilas).

Al Doctor Miguel Jover Cerda, director del GAB, vínculo de unión entre nosotros y con él a todos y cada uno de los miembros del grupo: profesores, doctorandos y técnicos. Compañeros de una larga, pero única travesía de conocimiento y cultura.

A Dulce. Mi mejor ejemplo y motivación para continuar en la lucha y entrega a un ideal y a la vida misma.

Al señor Vicerrector Don Francisco Morant Anglada. Por su gran apoyo a Latinoamérica, por su fé en los estudiantes Colombianos y con él a todos los miembros del Vicerrectorado de Cooperación y Proyectos de Desarrollo.

A Víctor Francisco y Consuelo. Paciencia y respaldo, aún en la distancia.

Y a mis hermanos Louise, Constanza, Felipe y junto a ellos el futuro, Catalina y Gabriela.

XII. DISEMINACIÓN DE RESULTADOS Y OTRAS PUBLICACIONES

Además de los trabajos incluidos en la presente Tesis Doctoral:

J.F. Asturiano, L. Pérez, D.L. Garzón, F. Marco-Jiménez, D.S. Peñaranda, J.S. Vicente y M. Jover. (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, 283-293.

J.F. Asturiano, L. Pérez, D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, F. Marco-Jiménez, S. Martínez-Llorens, A. Tomás y M. Jover. (2005). Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquaculture Research*, 36, 1480-1487.

D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, L. Pérez, F. Marco-Jiménez, X. Espert, T. Müller, M. Jover y J.F. Asturiano Effects of pH, sodium bicarbonate, cryoprotectants and FBS on the cryopreservation of European eel sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. **En prensa**

A continuación se presentan las siguientes publicaciones realizadas a lo largo del ciclo doctoral.

Comunicaciones en congresos

F. Marco-Jiménez, J.F. Asturiano, L. Pérez, D.L. Garzón, F.J. Pérez-Navarro, S. Martínez, A. Tomás, J.S. Vicente y M. Jover. (2004). Morphometric characterization of the European eel spermatozoa with computer assisted spermatozoa analysis. *5th International Symposium on Fish Endocrinology*. Castellón

J.F. Asturiano, L. Pérez, F.J. Pérez-Navarro, D.L. Garzón, S. Martínez, A. Tomás, F. Marco-Jiménez, J.S. Vicente y M. Jover. (2004). Optimization trial of methods for induction of spermiation in European eel (*Anguilla anguilla*) and test of different sperm activation media. *Aquaculture Europe '04 Barcelona. Biotechnologies for quality European Aquaculture Society*. Special Publication, 34, 130-131.

L. Pérez; D.S. Peñaranda; D.L. Garzón; S. Martínez; A. Tomás; R. Barrera; M. Jover y J.F. Asturiano. (2005). Resultados de los tratamientos de inducción de la maduración sexual de hembras de anguila europea en cautividad. *X Congreso Nacional de Acuicultura Gandía* (Valencia). Libro de Actas, 482-483.

J.F. Asturiano; G. Blanco; J.A. Sánchez; E. Vázquez; D.S. Peñaranda; D.L. Garzón; L. Pérez; S. Martínez; A. Tomás; P. Mayer; J.S. Vicente y M. Jover. (2005). Primeros pasos para la formación de lotes de reproductores para futuros planes de mejora genética de dorada. *X Congreso Nacional de Acuicultura Gandía* (Valencia) Libro de Actas, 500-501.

J.F. Asturiano; F. Marco-Jiménez; D.L. Garzón; D.S. Peñaranda; L. Pérez y M. Jover. (2005). Criopreservación de esperma de anguila europea y métodos para la evaluación de su calidad. *X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía (Valencia). Libro de Actas, 502-503.

D.L. Garzón; F. Marco-Jiménez; D.S. Peñaranda; L. Pérez; S. Martínez; A. Tomás; R. Barrera; M. Jover y J.F. Asturiano. (2005). Efecto de la adición de distintos criopreservadores y de FBS en la criopreservación de esperma de anguila europea:

primeros resultados. *X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía (Valencia). Libro de Actas, 514-515.

I. Jauralde, L. Pérez, D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, S. Martínez-Llorens, A. Tomás, M. Jover y J.F. Asturiano. (2005). Histological comparison of the ovary development stage in farmed and wild European eels, and evolution of gonad development in hormone treated fish Diadfish. *Fish and Diadromy in Europe Bordeaux* (Francia) Libro de Abstracts, 72.

D.S. Peñaranda; M.P. Viudes de Castro; D.L. Garzón; L. Pérez; J.S. Vicente; M. Jover y J.F. Asturiano. (2005). Variación del perfil de proteínas presentes en el plasma seminal durante el periodo de espermiación de la anguila europea y relación con parámetros de calidad. *5 Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada Faro* (Portugal). Libro de Actas, 12.

L. Pérez; D.S. Peñaranda; D.L. Garzón; M. Jover y J.F. (2005). Asturiano Inducción de la maduración sexual de hembras de anguila europea en cautividad: éxitos y fracasos. *5 Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada Faro* (Portugal). Libro de Actas, 18.

Artículos

F. Marco-Jiménez, L. Pérez, M.P. Viudes de Castro, D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, J.S. Vicente, M. Jover y J.F. Asturiano. (2006). Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology*, 65, 1302-1310.

F. Marco-Jiménez, D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, L. Pérez, M.P. Viudes-de-Castro, J.S. Vicente, M. Jover y J.F. Asturiano. (2006). Cryopreservation of European eels (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of rate dilution, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*, 53, 51-57.

J.F. Asturiano, F. Marco-Jiménez, L. Pérez, S. Balasch, D.L. Garzón, D.S. Peñaranda, J.S. Vicente, M.P. Viudes de Castro y M. Jover. (2006). Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology*, 66, 1012-1020.

J.F. Asturiano, F. Marco-Jiménez, D.S. Peñaranda, D.L. Garzón, L. Pérez, J.S. Vicente y M. Jover. (2007). Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 162-166.