



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA / UNIVERSIDAD DE VALENCIA
MÁSTER OFICIAL INTERUNIVERSITARIO EN ACUICULTURA

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

**INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON FSH Y LH
RECOMBINANTES EN LA ESPERMATOGÉNESIS DE LA
ANGUILA EUROPEA (*Anguilla anguilla*)**

Autor:
JUAN IGNACIO MARI HERGUIDO

Directora:
Dra. Luz Pérez Igualada

VALENCIA, ABRIL 2019

RESUMEN

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON FSH Y LH RECOMBINANTES, POR SEPARADO, EN LA ESPERMATOGÉNESIS DE LA ANGIILA EUROPEA (*Anguilla anguilla*)

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie en peligro crítico de extinción debido, entre otras causas, a la sobrepesca. Para poder cerrar el ciclo de la anguila, es importante la maduración sexual en cautividad, la cual se logra con gonadotropina coriónica humana (hCG) en el caso de los machos. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre el efecto del tratamiento con gonadotropinas, FSH y LH, en la espermatogénesis. En el presente estudio se compara el tratamiento con gonadotropinas específicas de la anguila en la maduración sexual de los machos de esta especie. Los resultados indican que la FSH por sí sola es capaz de inducir todas las etapas de la espermatogénesis hasta la espermiación, mientras que con el tratamiento con LH sólo se observan etapas tempranas del desarrollo, y no se induce la meiosis de las espermatogonias en ningún caso.

Palabras clave: Anguila europea, espermatogénesis, hormonas recombinantes, FSH, LH, espermiogénesis, acuicultura, reproducción

Valencia, Abril 2019

Autor: Juan Ignacio Marí Herguido

Directora: Dra. Luz Pérez Igualada

ABSTRACT

INFLUENCE OF TREATMENT WITH RECOMBINANT FSH AND LH, SEPARATELY, ON EUROPEAN EEL (*Anguilla anguilla*) SPERMATOGENESIS

European eel (*Anguilla anguilla*) is a critically endangered species due to, among other causes, the overfishing. In order to close eel's life cycle, is important to induce sexual maturation in captivity, which is nowadays achieved with human chorionic gonadotropin (hCG) in the case of males. However, there are few papers about the effect of treatment with eel specific gonadotropins, FSH and LH, in spermatogenesis of male eels. In the present study, treatment with eel specific recombinant gonadotropins in sexual maturation of males of the species are compared. Results show that FSH by itself can induce all spermatogenesis stages, arriving to spermiogenesis, while with treatment with LH alones only induced early stages are observed, and it doesn't induce spermatogonia in any case.

Key words: European eel, spermatogenesis, recombinant gonadotropins, FSH, LH, spermiogenesis, aquaculture, reproduction

Valencia, April 2019

Author: Juan Ignacio Marí Herguido

Directors: Dra. Luz Pérez Igualada

AGRADECIMIENTOS

Directors: Dra. Luz Pérez Igualada

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	10
1.1	LA ANGUILA EUROPEA, GENERALIDADES.....	10
1.1.1	<i>Descripción morfológica</i>	11
1.1.2	<i>Ciclo de vida</i>	12
1.1.3	<i>Otras características</i>	13
1.1.4	<i>Situación actual de la especie</i>	14
1.2	LA ANGUILICULTURA	17
1.2.1	<i>Características generales</i>	17
1.2.2	<i>Cría de anguilas</i>	17
1.2.3	<i>Situación actual (mundial y nacional)</i>	19
1.2.4	<i>Condiciones ambientales para la cría de anguilas</i>	22
1.2.5	<i>La anguila como alimento</i>	23
1.3	LA REPRODUCCIÓN DE LA ANGUILA	26
1.3.1	<i>Anatomía del testículo</i>	26
1.3.2	<i>La espermatogénesis</i>	26
1.3.3	<i>El eje Cerebro-Hipófisis-Gónada</i>	29
1.4	LA REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL COMO ALTERNATIVA: ESTUDIOS SOBRE LA INDUCCIÓN DE ESPERMATOGÉNESIS EN ANGUILAS EUROPEAS	32
1.4.1	<i>Estudios sobre el efecto de las gonadotropinas recombinantes en la inducción de la espermatogénesis en peces</i>	33
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAL Y MÉTODOS	38
3.1	HISTOLOGÍA.....	39
3.2	ANÁLISIS DE IMAGEN.....	40
4	RESULTADOS	42
5	DISCUSIÓN	46
6	AGRADECIMIENTOS	48
7	BIBLIOGRAFÍA	49

RELACIÓN DE FIGURAS

FIGURA 1. FOTOGRAFÍA DE UNA ANGUILA AMARILLA EN LA ORILLA DE UN RÍO (IZQUIERDA) Y DE UNAS ANGULAS EN EL ESTUARIO DEL RÍO SHANNON DE IRLANDA (DERECHA).....	10
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE LA ANGUILA EUROPEA (ANGUILLA ANGUILLA)	11
FIGURA 3. ETAPAS DE LA EVOLUCIÓN DE LAS ANGUILAS, CON VARIAS CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE	11
FIGURA 4. LEPTOCÉFALO (LARVA) DE ANGUILA EUROPEA.....	12
FIGURA 5. ANGULAS MIGRANDO RÍO ARRIBA EN EL RÍO TEIFI, EN GALES	13
FIGURA 6. CATEGORÍAS DE LA VERSIÓN 2.3 DE LA LISTA ROJA DE LA UICN, VIGENTE HASTA HOY	14
FIGURA 7. MODELO DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE LAS LARVAS DE ANGUILA EUROPEA EN FASE TARDÍA EN 1980-1999 Y EN 2080-2099	14
FIGURA 8. FOTOGRAFÍAS DE ANGUILAS MUERTAS A CAUSA DE LAS TURBINAS DE LAS CENTRALES HIDROELÉCTRICAS	15
FIGURA 9. ZONAS HABITABLES POR LAS ANGUILAS EN AZUL OSCURO Y ZONAS EN LAS QUE VIVÍA EN EL SIGLO XIX EN AZUL SEMI-TRANSPARENTE. DISTRIBUCIÓN ACTUAL Y DISTRIBUCIÓN CON UN 60% DE RECUPERACIÓN.....	16
FIGURA 10. ANGUILAS CRIADAS EN UN SISTEMA DE RECIRCULACIÓN EN HOLANDA	17
FIGURA 11. CICLO DE PRODUCCIÓN DE LA ANGUILA EUROPEA (ANGUILLA ANGUILLA)	18
FIGURA 12. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE ACUICULTURA Y PESCA DE ANGUILAS (EN TONELADAS) Y VALOR ECONÓMICO DE LA ACUICULTURA (EN MILES DE DÓLARES), EN 2017	19
FIGURA 13. EVOLUCIÓN DE LA PESCA Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA DE ANGUILAS ENTRE 1950 Y 2017 (EN TONELADAS) Y DEL VOLUMEN DE BENEFICIOS DE LA ANGUICULTURA ENTRE 1984 Y 2017 (EN MILES DE DÓLARES). A LA IZQUIERDA, A NIVEL MUNDIAL, MIENTRAS QUE A LA DERECHA SE CENTRA EN LA ANGUILA EUROPEA	20
FIGURA 14. MAPA CON LA UBICACIÓN DE LAS DIFERENTES INSTALACIONES DEDICADAS A LA CRÍA DE ANGUILAS, SU FINALIDAD, EL TIPO DE ACUICULTURA Y SISTEMAS DE CULTIVO, EN ESPAÑA EN 2017	21
FIGURA 15. EVOLUCIÓN EN LA PESCA DE CAPTURA Y PRODUCCIÓN DE ANGUILAS EN ACUICULTURA (EN TONELADAS) Y DEL VALOR ECONÓMICO (EN MILLONES DE EUROS) EN ESPAÑA ENTRE 2008 Y 2016.....	21
FIGURA 16. FOTOGRAFÍAS DE ANGUILAS EN UN PUESTO DEL MERCADO CENTRAL DE VALENCIA Y EN LA PESCADERÍA DE MERCADONA EN L'ELIANA, VALENCIA	23
FIGURA 17. EVOLUCIÓN DEL ASPECTO DEL TESTÍCULO DE LA ANGUILA A LO LARGO DE LA MADUREZ SEXUAL.....	26
FIGURA 18. EVOLUCIÓN PASO A PASO DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN PEZ CEBRA (DANIO RERIO), A TRAVÉS DE SUS TRES FASES, DESDE LAS ESPERMATOGONIAS A LOS ESPERMATOZOIDES.....	27
FIGURA 19. ESQUEMA DEL EJE CEREBRO-HIPÓFISIS-GÓNADA	29
FIGURA 20. MECANISMOS ENDOCRINOS DE REGULACIÓN DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN ANGUILA JAPONESA (ANGUILLA JAPONICA)	31
FIGURA 21. RESUMEN GRÁFICO DE LA INDUCCIÓN ARTIFICIAL DE MADURACIÓN Y FERTILIZACIÓN EN ANGUILAS JAPONESAS, SEGÚN OHTA ET AL. (1997).....	32
FIGURA 22. LENGUADO SENEGALÉS (SOLEA SENEGALENSIS), ESCATÓFAGO MANCHADO (SCATOPHAGUS ARGUS) Y JUREL DE CASTILLA (SERIOLA LALANDI)	34
FIGURA 23. VARIACIÓN DE LAS DOSIS DE GONADOTROPINAS RECOMBINANTES A LO LARGO DEL TIEMPO EN LOS TRES TRATAMIENTOS CON DOSIS VARIABLES DEL EXPERIMENTO 1 (F/L, F/LI Y FD/LI).....	35
FIGURA 24. VARIACIÓN DE LAS DOSIS DE GONADOTROPINAS RECOMBINANTES A LO LARGO DEL TIEMPO EN LOS TRES TRATAMIENTOS CON DOSIS VARIABLES CONSTANTES DE FSH Y VARIABLE DE LH DEL EXPERIMENTO 2	36
FIGURA 25. CORTES HISTOLÓGICOS DE LOS TESTÍCULOS DE UNO DE LOS PECES NO TRATADOS CON HORMONAS Y DE PECES TRATADOS CON FSH	43
FIGURA 26. CORTES HISTOLÓGICOS DE LOS TESTÍCULOS DE UNO DE LOS PECES CONTROL (FOTO A, LA MISMA QUE EN LA FIGURA ANTERIOR) Y DE PECES TRATADOS CON LH (DE LA B A LA D).	44
FIGURA 27. PORCENTAJES RELATIVOS DE LAS FASES DE DESARROLLO DE LOS TESTÍCULOS DE LAS ANGUILAS TRATADAS CON FSH Y CON LH, Y LOS VALORES MEDIOS DE LOS PORCENTAJES RELATIVOS DE AMBOS TRATAMIENTOS.....	44

RELACIÓN DE TABLAS

TABLA 1. TAXONOMÍA DE LA ANGIULA EUROPEA (ANGUILLA ANGIULLA).....	10
TABLA 2. PARÁMETROS AMBIENTALES ADECUADOS PARA EL ENGORDE DE LA ANGIULA	22
TABLA 3. NIVELES RECOMENDADOS DE ALCALINIDAD, AMONIO/AMONIACO Y NITRITOS PARA LA ANGIULA EUROPEA	23
TABLA 4. TABLA DE LA COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LA ANGIULA POR CADA 100 GRAMOS DE PARTE COMESTIBLE	24
TABLA 5. IMÁGENES DE ALGUNOS PLATOS HECHOS CON ANGIULAS.....	25
TABLA 6. LAS DISTINTAS GENERACIONES DE LAS ESPERMATOGONIAS DURANTE LA FASE PROLIFERATIVA DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN PECES, INCLUYENDO INFORMACIÓN SOBRE SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS AL MISMO NÚMERO DE AUMENTOS.....	28
TABLA 7. LAS DISTINTAS GENERACIONES DE LOS ESPERMATOCITOS, CON INFORMACIÓN SOBRE SUS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS AL MISMO NÚMERO DE AUMENTOS	29
TABLA 8. PORCENTAJE DE TIPOS CELULARES SEXUALES EN CADA UNO DE LOS PECES DEL TRATAMIENTO CON FSH Y LH	42
TABLA 9. COMPARACIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS DE PEÑARANDA ET AL (2018) Y LOS DEL PRESENTE ESTUDIO POR DOSIS DE GONADOTROPINAS RECOMBINANTES (FSH Y LH), TIEMPO DE TRATAMIENTO Y PORCENTAJE DE MACHOS ESPERMIANTES AL FINAL DE CADA TRATAMIENTO, EN ANGIULAS EUROPEAS (ANGUILLA ANGIULLA).	45

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA ANGUILA EUROPEA, GENERALIDADES

TAXONOMÍA	
Reino	Animalia
Subreino	Bilateria
Infrareino	Deuterostomia
Filo	Chordata
Subfilo	Vertebrata
Infracilo	Gnathostomata
Superclase	Actinopterygii
Clase	Teleostei
Superorden	Elopomorpha
Orden	Anguilliformes
Suborden	Anguilloidei
Familia	Anguillidae
Género	<i>Anguilla</i>
Especie	<i>Anguilla anguilla</i>

Tabla 1. Taxonomía de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Fuente: www.itis.gov

Estado de conservación (UICN 3.1):



La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie de pez teleosteo perteneciente a la familia Anguillidae. Habita en todos los ríos que desembocan en el Mediterráneo, así como en los ríos que desembocan en el Mar Negro y el Mar del Norte. De norte a sur (si incluimos los estuarios y zonas de agua marina), su área de distribución se extiende desde el Mar de Barents (Rusia) e Islandia hasta la cuenca media del Nilo (Egipto) y las costas del Sáhara Occidental. Se ha documentado la presencia de la especie en las costas iraníes y del noreste del Mar Caspio (Principado de Mónaco, 2014); (Holcik & Ali Razavi, 1991); (Jacoby & Gollock, 2014); (Firouz, 2005); (Jacoby & Gollock, 2014); (animalesextincion.es, 2009).



Figura 1. Fotografía de una anguila amarilla en la orilla de un río (izquierda) y de unas angulas en el estuario del río Shannon de Irlanda (derecha). Fuentes: jablib.cz y europeaneel.com.

Se trata de una especie **catádroma facultativa**: **catádroma** porque las anguilas nacen y se reproducen en el mar, pero crecen y maduran en las aguas dulces, salobres y costeras en zonas continentales; y **facultativa** porque el agua dulce no se considera esencial para la reproducción de la especie (Principado de Mónaco, 2014).

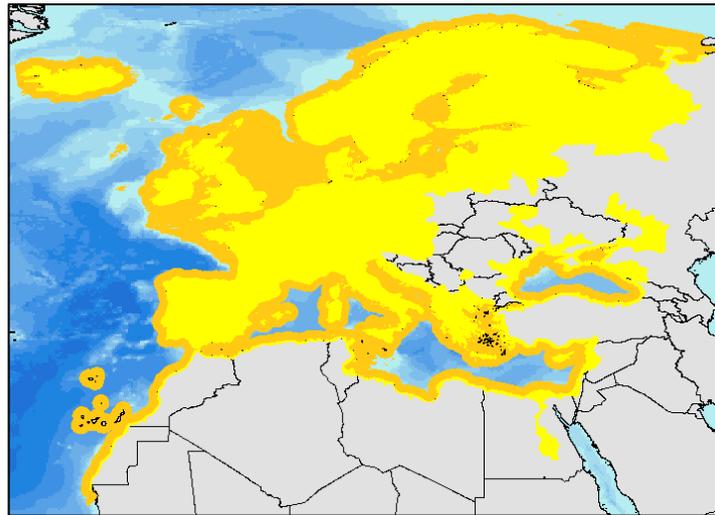


Figura 2. Distribución de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). En amarillo, las zonas continentales de agua dulce, y en naranja, los estuarios y zonas de agua marina. Fuente: Convention on Migratory Species (2014).

1.1.1 Descripción morfológica

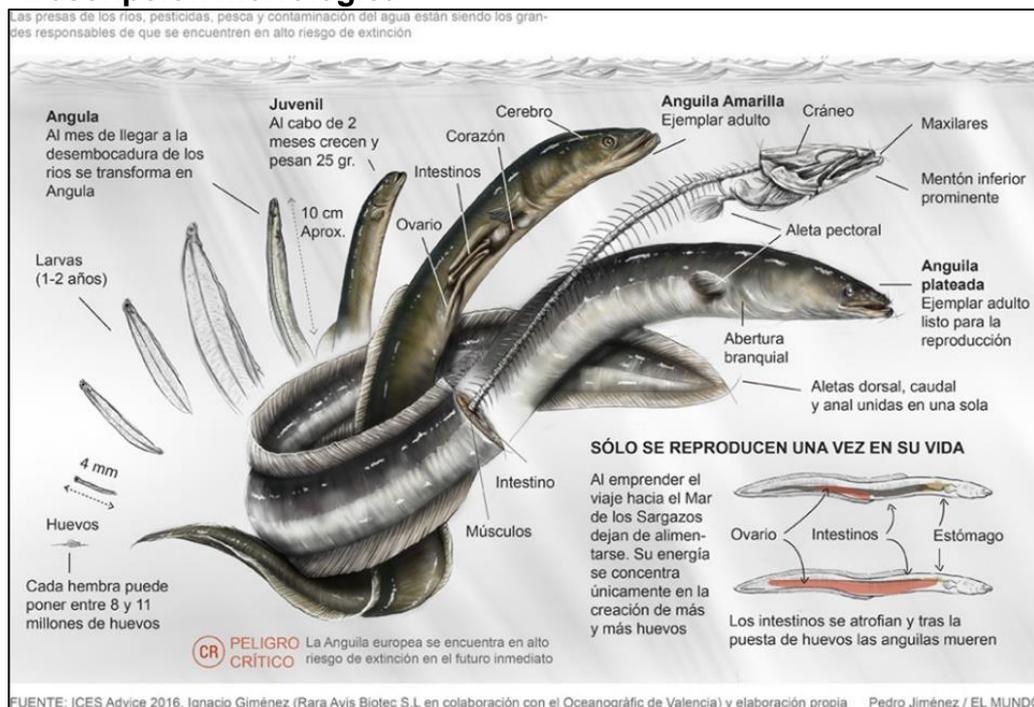


Figura 3. Etapas de la evolución de las anguilas, con varias características de la especie. Fuente: El Mundo.

La morfología de las anguilas va variando a lo largo de su vida:

- **Larva (o leptocéfalo):** Son transparentes, con forma de hoja de sauce, cabeza pequeña y cuerpo comprimido lateralmente. Debido a su aspecto tan diferente, se creyó que las larvas eran de una especie distinta, *Leptocephalus brevirostris*. Actualmente se les denomina únicamente "leptocéfalos".
- **Angula:** Su cuerpo ya presenta aspecto anguiliforme. Inicialmente transparente, a medida que crece va adquiriendo una tonalidad característica pardo-verdosa con la parte ventral blanca o amarilla y con puntos blancos o grises en los laterales. Puede crecer hasta los 80mm.
- **Anguila amarilla:** Presenta vientre amarillo y dorso de color negruzco, con la línea lateral visible. El cuerpo es anguiliforme, con la parte posterior más comprimida,

cabeza alargada, ojos redondos y mandíbula inferior prominente. Carece de aletas pelvianas, pero tiene aletas pectorales bien desarrolladas y las aletas dorsal, caudal y anal, unidas en una continua, que se redondea en la cola. La longitud media es de unos 40-50cm, siendo las hembras mayores que los machos.

- **Anguila plateada:** Los individuos alcanzan mayor tamaño y adquieren tonos plateados en los laterales y que se extienden desde la zona ventral hasta la cola. Posteriormente, tanto el dorso como los laterales se oscurecen (Lasheras García, 2010); (Ness & Beaulieu Fisheries Trust, 2010); (NatureGate - LuontoPortti, 2010).

1.1.2 Ciclo de vida

En otoño, cuando la anguila empieza su maduración (transformándose en anguila plateada) desciende de los ríos al mar. Realiza una migración atravesando el océano Atlántico hacia el Mar de los Sargazos, una zona ubicada en el Triángulo de las Bermudas, con grandes cantidades de algas (*Sargassum natans*). En el mes de febrero y en zonas isotermas a 17°C y a unos 200-400 metros de profundidad, tiene lugar supuestamente el desove (Sánchez Suárez, 1994). Las hembras, tras haber puesto entre 8 y 11 millones de huevos, mueren. Esta suposición es debida a que no se ha avistado anguilas adultas volviendo a los ríos. Como curiosidad, la anguila americana (*Anguilla rostrata*) realiza también el desove en el mar de los Sargazos, aunque en puntos diferentes a los de las anguilas europeas (AXENA, 2012); (van Ginneken & E Maes, 2005).

El estado larvario comienza con la eclosión del huevo en la superficie, pasadas 24 horas del desove. De él emerge una larva transparente denominada **leptocéfalo**, con unos 5mm de longitud y que vive a 500 metros de profundidad. Al cabo de dos meses, los leptocéfalos ascienden a la superficie para comenzar la migración oceánica, siendo arrastrados por las corrientes del Golfo de México (acompañado de natación activa) hacia las costas europeas y del norte de África, alimentándose de cápsulas mucilaginosas de apendiculariáceos y partículas fecales de zooplancton. Con el paso del tiempo, llegan a medir 75mm de longitud y 1,5 gramos (La Anguila del Mediterráneo, 2014); (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

Cuando llegan al talud continental, las larvas sufren una metamorfosis regresiva, en la cual disminuyen de 75 a 70mm de longitud y pierden peso desde 1,5 a 0,15 gramos. Se trata de las **anguilas sin pigmentar**, con un aspecto anguiliforme, y no están diferenciados sexualmente. Las mareas arrastran a esas anguilas vidriosas a los estuarios, donde viven durante 1-2,5 años, mientras crecen, adquieren pigmentación y después se convierten en **angulas**, con una longitud de 10-15cm (Salvador & Gómez-Juaristi, 2017).



Figura 4. Leptocéfalo (larva) de anguila europea. Fuente: thuenen.de

Las angulas sufren otra metamorfosis, transformándose en **anguilas amarillas**, entran en los ríos y ascienden por sus cauces. Los machos pasan 6-12 años y las hembras 9-20 años en agua dulce. También existen diferencias físicas entre sexos después de haber crecido: los machos miden 300-500mm de longitud total y 200g de peso; las hembras, 550-700mm de longitud total y 2000g de peso (Gómez-Juaristi & Salvador, 2011). Su permanencia en el

río finaliza en la fase de plateamiento (**anguilas plateadas**), que corresponde al inicio de su maduración sexual. Esa etapa también implica una serie de cambios morfológicos que sufren como preadaptación a la vida en la profundidad del océano (Salvador & Gómez-Juaristi, 2017); (animalesextincion.es, 2009).

Entonces, las anguilas descienden los ríos hasta el mar (a 700 metros de profundidad), y emprenden un viaje de 6500km, durante el cual no se alimentan, acumulan grasa (las anguilas plateadas tienen hasta un 28% de grasa corporal, frente al 11% en las anguilas amarillas), y acaban de madurar sexualmente. En este viaje, las anguilas pueden llegar a nadar hasta 20km al día hasta el Mar de los Sargazos, y se repite el ciclo (Principado de Mónaco, 2014); (Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011); (Sánchez Suárez, 1994).

1.1.3 Otras características

- **Hábitat:** Vive tanto en ríos como en mar, dependiendo de la edad, en aguas de temperaturas de 4-20°C. La anguila tolera bien las variaciones de salinidad (gracias a la osmorregulación) y temperatura. Se encuentra en las praderas de *Posidonia* en las costas, en lagunas salobres, estuarios y en todo tipo de cursos de agua dulce, tanto en **ambientes lóticos** (ambientes fluviales, como ríos, canales, acequias o alcantarillado urbano), como en **lénticos** (ambientes sin flujo de agua, como lagos, estanques y pozos). Es bentónica y tiene preferencias por los sustratos de fango y arena (Salvador & Gómez-Juaristi, 2017); (animalesextincion.es, 2009); (Anadón Álvarez, y otros, 2007).
- **Alimentación:** es una especie omnívora, alimentándose principalmente de gusanos (ya sean terrestres o acuáticos), moluscos, insectos y sus larvas, crustáceos, peces pequeños (vivos o muertos), incluso detritus o polluelos de aves. La alimentación varía en función de su distribución geográfica (Salvador & Gómez-Juaristi, 2017).
- **Actividad diaria:** son animales lucífugos, con mayor actividad durante la noche, y durante el día si éste está nublado o hay lluvia. Por lo general, durante el día, buscan refugio en sustratos de arena, fango y vegetación acuática densa, incluso en fondos duros. A veces, las anguilas hacen desplazamientos por tierra firme, pudiendo recorrer varios kilómetros gracias a la respiración cutánea (a través de los poros que hay en su piel) (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (Anadón Álvarez, y otros, 2007).
- **Esperanza de vida:** la vida media de las anguilas en estado salvaje suele ser de 12-22 años, aunque se ha llegado a dar el caso de una anguila que vivió 88 años en estado salvaje. La vida media en cautividad es mayor, de unos 55 años (animalesextincion.es, 2009); (Skupin, 2006); (Gómez-Juaristi & Salvador, 2011); (Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011).



Figura 5. Anguilas migrando río arriba en el río Teifi, en Gales. Fuente: gettyimages.co.uk

1.1.4 Situación actual de la especie

Según la Lista Roja de la UICN, en la evaluación realizada en 2013, la anguila europea se encuentra en **peligro crítico de extinción (CR)**. La clasificación de amenaza a las especies según la categoría se basa en una serie de criterios, según lo aprobado en la 51ª Reunión del Consejo de la UICN, el 9 de febrero del 2000, en Gland (Suiza), que son:

- Reducción del tamaño de la población, basado en otros varios parámetros.
- Distribución geográfica en la forma B1 (extensión de la presencia) o B2 (área de ocupación) o ambos casos.
- Tamaño de la población estimada (en referencia a ejemplares maduros).
- Probabilidad de extinción en estado silvestre, cualquiera que sea el período mayor (hasta un máximo de 100 años en el futuro) (Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN, 2012).



Figura 6. Categorías de la versión 2.3 de la Lista Roja de la UICN, vigente hasta hoy. Fuente: Wikipedia.

Según diversos estudios y medios, las causas por las que la población de la anguila europea siga declinando y se encuentre amenazada son las siguientes:

- **Cambios climáticos** que puedan alterar la Corriente del Golfo, por la cual las anguilas migran desde los Sargazos hasta Europa. Entre 1980 y 1999 los leptocéfalos abundaban en las costas de Europa Occidental (especialmente el Golfo de Vizcaya) y el Mediterráneo Occidental. Sin embargo, se prevé que entre 2080 y 2099 haya un número mucho menor de larvas de anguila, la mayor parte de ellas en el Mar del Norte y las Islas Británicas, a causa del cambio climático, tal como se puede ver en el siguiente mapa (Díaz, y otros, 2018):

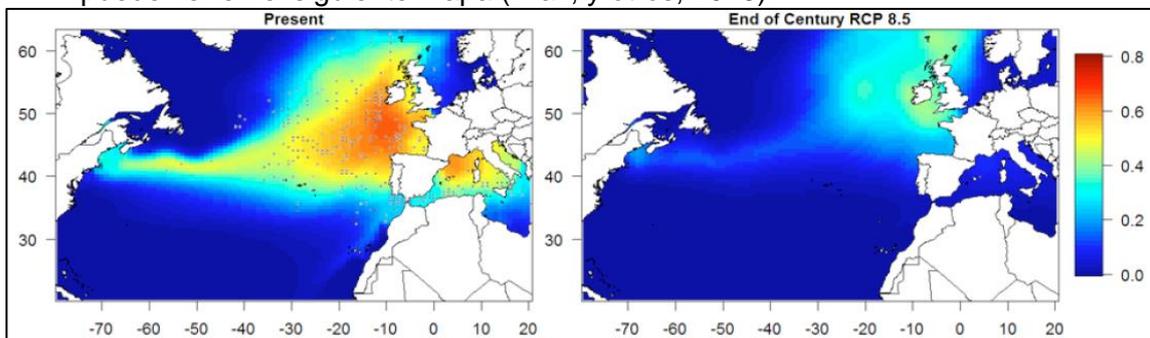


Figura 7. Modelo de distribución espacial de las larvas de anguila europea en fase tardía en 1980-1999 (izquierda) y en 2080-2099 (derecha). Autor: Díaz et al, Revista de Investigación Marina 25 (2) (2018) (pp.46-49).

- **Destrucción del hábitat continental**, debido a la drástica reducción de la extensión de ríos y estuarios donde pueden sobrevivir. Las principales acciones que contribuyen al problema en cuestión son:
 - **Extracción de grava y/o agua superficial y subterránea.**
 - **Construcción de barreras físicas** en la migración ascendente de estos peces, como son los diques (que sirven para controlar el nivel del agua), los cuales impiden la colonización de grandes áreas de las cuencas hidrográficas, además de disminuir la densidad de población aguas arriba y con ello la producción de grandes reproductores.
 - **Construcción de presas hidroeléctricas**, cuyas turbinas en movimiento pueden herir o incluso matar a las anguilas (Anadón Álvarez, y otros, 2007); (Principado de Mónaco, 2014); (Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, 2012); (Vílchez Olivencia, 2014); (Unidad de Investigación Marina

de AZTI-Tecnalia, EKOLUR Asesoría Ambiental y el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Universidad del País Vasco, 2008).



Figura 8. Fotografías de anguilas muertas a causa de las turbinas de las centrales hidroeléctricas. Fuente: ecofact.ie

- **Disminución de la calidad de los reproductores** (Vílchez Olivencia, 2014). Existe una serie de factores que contribuyen a que el número de adultos en edad reproductiva que llegan al mar de los Sargazos sea menor:
 - **Infecciones por el nemátodo exótico *Anguillicola crassus***, introducido en los años 80 en Europa por la importación, sin control sanitario previo, de anguilas japonesas (*Anguilla japonica*), las cuales tenían en la vejiga natatoria con el nemátodo, frente a la cual tenían desarrollado un sistema inmunitario, algo que las anguilas europeas no tienen. La migración de las larvas a lo largo de la vejiga puede provocar daños y fibrosis asociada al órgano, con una consecuente pérdida funcional que aumenta el gasto energético durante la migración pelágica. Además, se alimentan de sangre, haciendo metabólicamente más costosa la migración (Márquez Llano-Ponte, 2016).
 - La **contaminación de las aguas fluviales**, debido a la acumulación de pesticidas y toxinas lipófilas (como los PCBS) en las reservas lipídicas de las anguilas. Esto resulta negativo para la migración reproductiva porque hacen disminuir el consumo de energía y tienen efectos negativos en la fertilidad. Se ha detectado la presencia de pesticidas en las anguilas de Albufera de Valencia, mercurio en las de Cádiz o residuos organoclorados y metales pesados en las del Doñana (Gómez-Juaristi & Salvador, 2011).
 - **La enfermedad vírica EVEX** (Eel Virus Europe X), que se ha expandido por toda Europa. Las anguilas plateadas infectadas no son capaces de llegar al Mar de los Sargazos (Márquez Llano-Ponte, 2016).
- **La sobrepesca de las anguilas y la subida de precios.** Actualmente se pescan en toda su área de distribución a las anguilas en todas las etapas del ciclo biológico continental, siendo el más lucrativo el de anguilas sin pigmentar, utilizadas como stock inicial en las piscifactorías, así como en programas de repoblación en algunos casos. En 1960, se reclutaron 10825 toneladas de angulas en Europa, mientras que en 2015 se reclutaron apenas 440 toneladas, de las cuales se comerció ilegalmente con 8-100 toneladas (entre el 2% y el 29% del total), algo que afecta considerable a su reclutamiento y ha sido motivo de alarma para las autoridades (Sustainable Eel Group, 2018).

Por estas razones, en 2001, el ICES (International Council of the Exploration of the Sea), a la vez que alertó del peligro que corría la especie, propuso una serie de medidas para contribuir a su conservación:

- Limitar la explotación de las pesquerías mediante la prohibición de la pesca, control de capturas o cuotas admisibles totales, poner vedas a las épocas y/o áreas o control de las artes de pesca.

- Recreación del hábitat, asegurando la accesibilidad al mismo y la calidad de sus aguas, reduciendo la pérdida de dicho hábitat y asegurando la migración de retorno.
- Controlar la mortalidad no pesquera, por turbinado de las presas, depredación o enfermedades y contaminación.
- Refuerzo de la población, mediante el uso de angulas donde hay excedentes o usando angulas procedentes de acuicultura (concretamente **acuicultura de conservación**), si éstas proceden del medio silvestre (Anadón Álvarez, y otros, 2007).

En 2003, la Comisión de las Comunidades Europeas elaboró un Plan de Actuación con un conjunto de medidas de gestión:

- Un Plan de Recuperación de las angulas a través de sus estados miembros.
- Fijación de los objetivos locales de conservación y gestión, en los que respecta a la colonización (como la construcción de vías de paso en las presas para permitir su migración río arriba), a las poblaciones (como recuperación de las poblaciones a través de angulas de acuicultura) y al porcentaje de fuga (como la gestión de la fuga de las angulas plateadas hacia el mar).
- Recogida de datos de capturas por pesquería y zona fluvial o reclutamientos entrantes, entre otros datos.
- Apoyo a la gestión local en la normativa comunitaria.
- Apoyo técnico y científico a la gestión local.
- Dimensión internacional (Anadón Álvarez, y otros, 2007).

Las angulas, según el “Diccionario geográfico-estadístico-histórico de España de Pascual Madoz” (entre 1845 y 1850), ocupaban prácticamente todas las zonas fluviales de España. Pero debido a las causas mencionadas anteriormente, la Península Ibérica ha perdido más del 80% de su distribución original, limitándose ahora a regiones costeras en toda la península y zonas adyacentes (incluyendo la Albufera de Valencia, delta del Ebro, rías gallegas...), Baleares y Canarias.

Si se mejorase la conectividad de los ríos mediante una buena gestión de una veintena de embalses (una de las principales amenazas), las angulas podrían acceder hasta a un 60% de su distribución pasada. Eso significa que volverían a nadar por las cuencas del Tajo y Ebro en su totalidad, y también estarían presentes en media cuenca del Guadalquivir y Guadiana y en una pequeña parte de la cuenca de Duero (Clavero, 2015); (Gómez-Juaristi & Salvador, 2011).

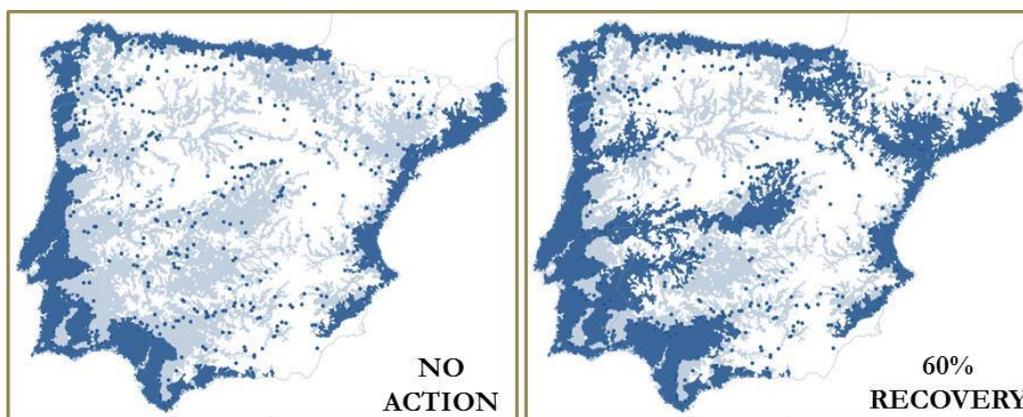


Figura 9. Zonas habitables por las angulas en azul oscuro y zonas en las que vivía en el siglo XIX en azul semi-transparente. A la izquierda, la distribución actual, y a la derecha la distribución con un 60% de recuperación. Fuente: CSIC.

1.2 LA ANGUILICULTURA

1.2.1 Características generales

La **anguilicultura** se trata de una rama de la acuicultura enfocada en la producción de peces de la familia Anguillidae, y tiene su origen en los primeros intentos de engorde artificial de anguilas en el año 1894 en Japón, donde además comenzaría la anguicultura comercial con la apertura de varias granjas en 1915 (Mas Álvarez & Barrera Orozco, 1989).

En el mundo existen 19 especies de la familia Anguillidae, las cuales tienen diferencias tanto genéticas como morfométricas. Sólo 4 de ellas son las más consumidas en el mundo y producidas en acuicultura:

- **Anguila europea** (*Anguilla anguilla*).
- **Anguila japonesa** (*Anguilla japonica*): presente en aguas continentales y marinas de Japón, China, Taiwán, península de Corea y norte de Filipinas.
- **Anguila americana** (*Anguilla rostrata*): se extienden (de norte a sur) desde el sur de Groenlandia hasta las costas de la Guyana, incluyendo prácticamente todo el Caribe.
- **Anguila australiana** (*Anguilla australis*): presente en las aguas del este de Australia y Nueva Zelanda, extendiéndose hasta Nueva Caledonia (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (M. Luna, 2016).

Existe una serie de factores que justifican la anguicultura:

- **Biológicos.** Debido a su capacidad de supervivencia (tolerancia a cambios de salinidad, hipoxia -condiciones de baja concentración de oxígeno disuelto en agua-, medios eutróficos, cambios en alimentación) y por una tasa de crecimiento aceptable.
- **Tecnológicos.** Por las pautas de cultivo bien establecidas por los japoneses.
- **Económicos.** La carne es muy apreciada, alcanzando importantes precios en el mercado (especialmente en Japón), y posee un interesante valor nutritivo (Malattera - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011).



Figura 10. Anguilas criadas en un sistema de recirculación en Holanda. Fuente: aquafarmingconsult.com

1.2.2 Cría de anguilas

Las anguilas sin pigmentar (de peso medio de 0,33 gramos cada una) son capturadas en las costas de Francia, Reino Unido, Portugal y España por diversos métodos.

Las angulas, a continuación, son llevadas a las granjas de cultivo, donde son mantenidas en tanques pequeños de 3-4 m² (con densidades de 10-15 kg/m³) en cuarentena, observando si los peces tienen alguna enfermedad y, en caso afirmativo, se procede al tratamiento. Los peces son destetados con huevos de bacalao, sustituyéndose progresivamente con alimentos secos de iniciación durante un periodo de 10-15 días.

Cuando alcanzan aproximadamente 5 gramos, son transferidas a una unidad de producción de juveniles con tanques más grandes (6-8 m²) y mayores densidades (50-75 kg/m³), y son alimentadas con pallets de 1mm de grosor (JACUMAR, 2007); (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

Como dato curioso, son necesarias 4 kilos de angulas (1kg contiene unas 3500 angulas) para poder producir una tonelada de anguilas de tamaño comercial (125-150 gramos) (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

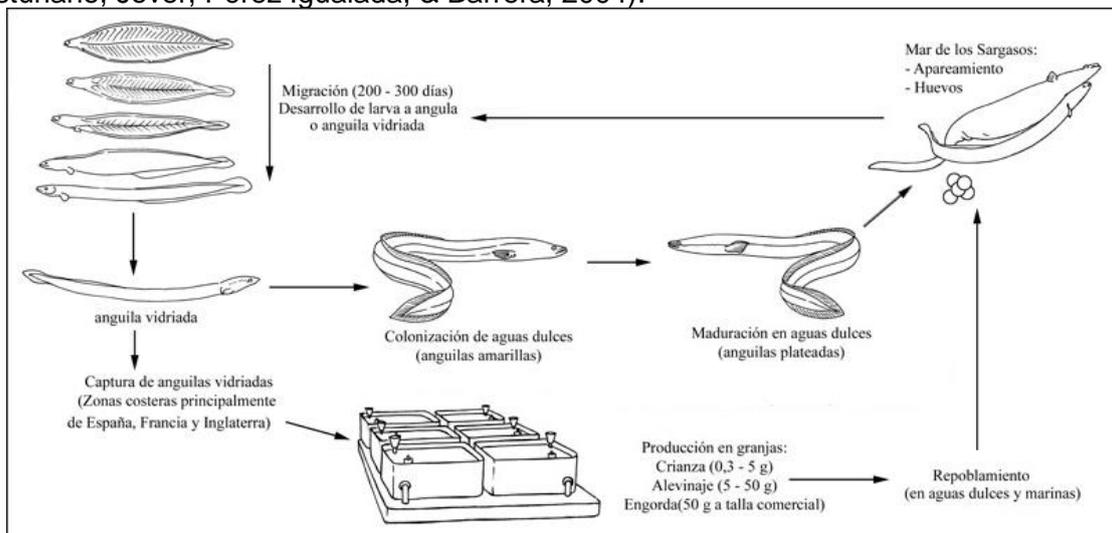


Figura 11. Ciclo de producción de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Fuente: Modificado a partir de la FAO.

Existen tres técnicas de engorde de anguilas en acuicultura, que son las siguientes:

- **Cultivo extensivo en estanques.** Es la forma tradicional de la cría de anguilas en Europa, cada vez más en desuso. Las anguilas en un principio se crían en estanques de superficies de 100-350m². Posteriormente, cuando alcanzan su tamaño comercial, los peces son transferidos a estanques, estáticos o de flujo abierto, de mayor tamaño (1000-1500 m²) y a temperaturas de entre 18-25°C.
- **Cultivo intensivo con sistema de recirculación (RAS).** Es la más empleada actualmente en Europa. Las anguilas son sembradas en tanques cuadrados o circulares (de cemento o fibra de vidrio) de 25-100 m², cuando éstas cuando tienen 50g, alcanzando densidades de 100-150 kg/m³. Son alimentadas con comederos automáticos con alimento seco extruido (1,5-3 mm) varias veces al día. Las tasas individuales de crecimiento son muy diferentes entre individuos, siendo necesario clasificarlos y separarlos cada seis semanas para poder alcanzar un alto rendimiento de crecimiento.
- **Cultivo valli o "vallicultura".** Las anguilas son cultivadas extensivamente en humedales litorales salobres, principalmente en el Adriático Norte (Italia). Se aprovecha las migraciones naturales para poder estabular a las angulas de 15-35 g en estanques a densidades de 400 gr/m². Los peces son alimentadas con pescado fresco, harinas o pasta húmeda (JACUMAR, 2007); (FAO, 2005); (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

La anguicultura, por otra parte, presenta varios problemas que impiden la producción, debidos a la biología de la especie:

- **Abastecimiento con anguilas del medio natural,** al no haber conseguido hasta ahora **cerrar el ciclo biológico**, que significa obtener puestas de huevos viables a partir de reproductores nacidos también en cautividad, algo que sí ha conseguido

recientemente el Instituto Español de Oceanografía en atunes rojos (*Thunnus thynnus*) (IEO, 2016).

- **Desigualdades en el crecimiento**, que llevan a separar a las anguilas por tallas para evitar canibalismo, suponiendo una mayor mano de obra y mayores gastos.
- **Exigencias térmicas**, pues las anguilas necesitan aguas con temperaturas superiores a 17°C, siendo la temperatura óptima de 23°C, traducido en un gasto adicional en electricidad y combustible.
- **La dieta**, debido a que existen diferencias en cuanto a necesidades nutritivas entre especies, además que las anguilas se adaptan con mayor dificultad a los piensos. También hay que tener en cuenta factores como el tamaño de partículas para evitar enfermedades o anoxia (Suz Conejos, 2014); (Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011).

1.2.3 Situación actual (mundial y nacional)

En 2017, según datos de la FAO, la industria anguicícola había producido **259390 toneladas** de anguilas y facturado **2042 millones de dólares** en todo el mundo. China el país líder en el sector, produciendo 217263 toneladas (el 84% de la producción global) y facturando 1086 millones de dólares (el 53% de los ingresos mundiales de la anguicultura). Mientras tanto, España es el quinto país de Europa y el décimo del planeta en producción anguicícola (331 toneladas) y noveno en facturación (3,7 millones de dólares). A continuación, se mostrará un conjunto de mapas sobre la anguicultura y la pesca a nivel mundial.

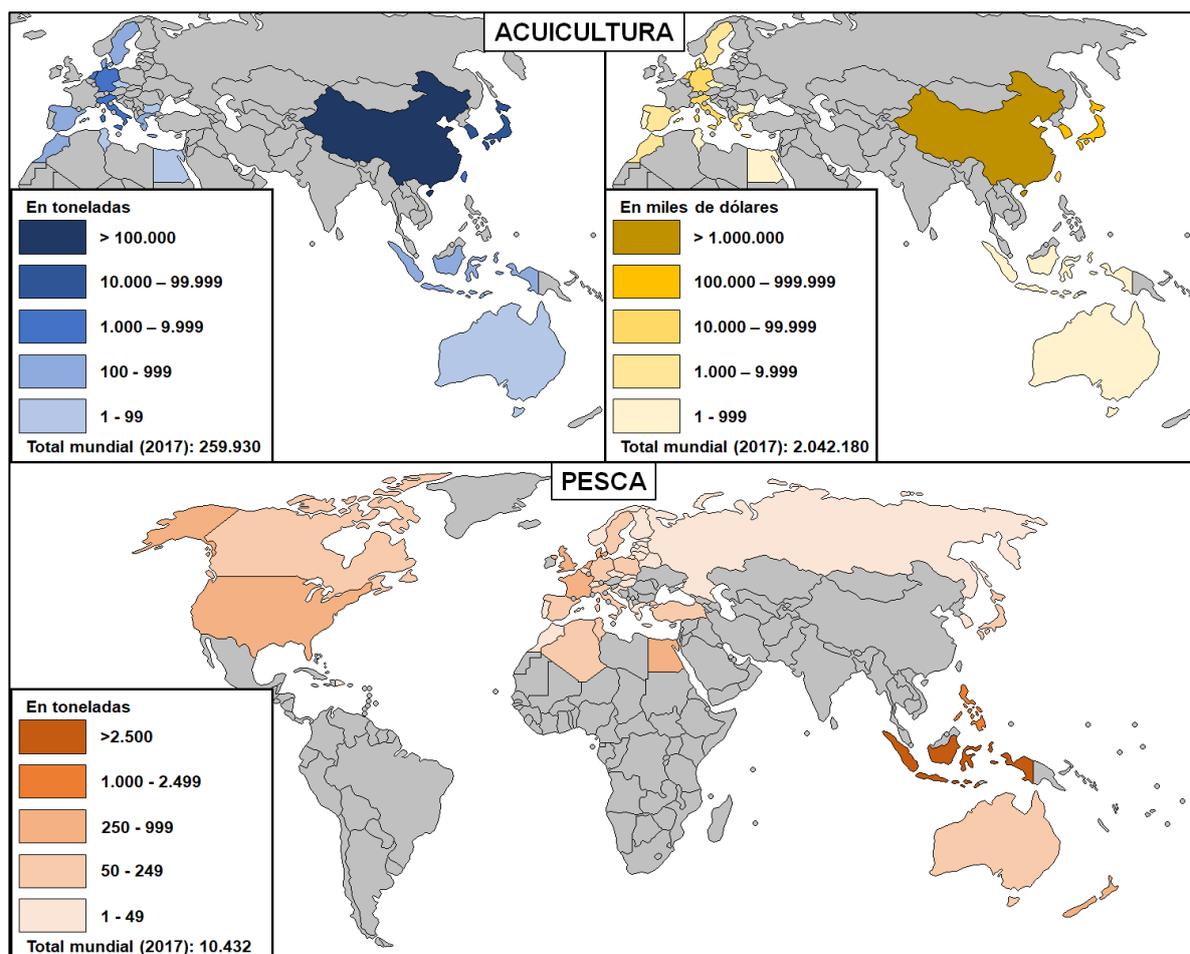


Figura 12. Producción mundial de acuicultura y pesca de anguilas (en toneladas) y valor económico de la acuicultura (en miles de dólares), en 2017. Fuente: Elaboración propia, FAO.

En 1950, a nivel mundial, se había pescado 17232 toneladas de anguilas, frente a las apenas 516 toneladas de anguilas por medio de la anguicultura (concentrada en Japón, Italia, Indonesia y Yugoslavia). Sin embargo, los países asiáticos fueron los que impulsaron, desde los años 50 hasta hoy, a la anguicultura mundial. En 2017, se pescaron 10432 toneladas de anguilas en todo el mundo, frente a las 259390 toneladas producidas por acuicultura.

Centrándonos en la anguila europea (*Anguilla anguilla*), en 1950 (según datos de la FAO) se había pescado unas 14095 toneladas (más del 80% de la pesca de anguilas a nivel mundial), mientras que se había producido apenas 160 toneladas en acuicultura. No obstante, a partir de los años 70, la acuicultura comenzó a crecer con fuerza. En 1998, superó temporalmente a la pesca de anguilas, y en el 2000, alcanzó su punto más alto, con 10761 toneladas cultivadas frente a las 8591 toneladas obtenidas mediante la pesca. Desde entonces, tanto la pesca como la producción de anguilas ha sufrido un periodo de altibajos.

En 2017, la acuicultura produjo unas 6215 toneladas de estos peces, mientras que se habían pescado 2991 toneladas de anguilas. Lo llamativo ha sido que los principales países en pesca de anguilas europeas en 1950, Holanda, Alemania y Dinamarca, son ahora los principales productores de anguilas en acuicultura en 2017. Las anguilas son los peces más producidos por acuicultura y que más beneficios generan en dos países: Holanda y Marruecos.

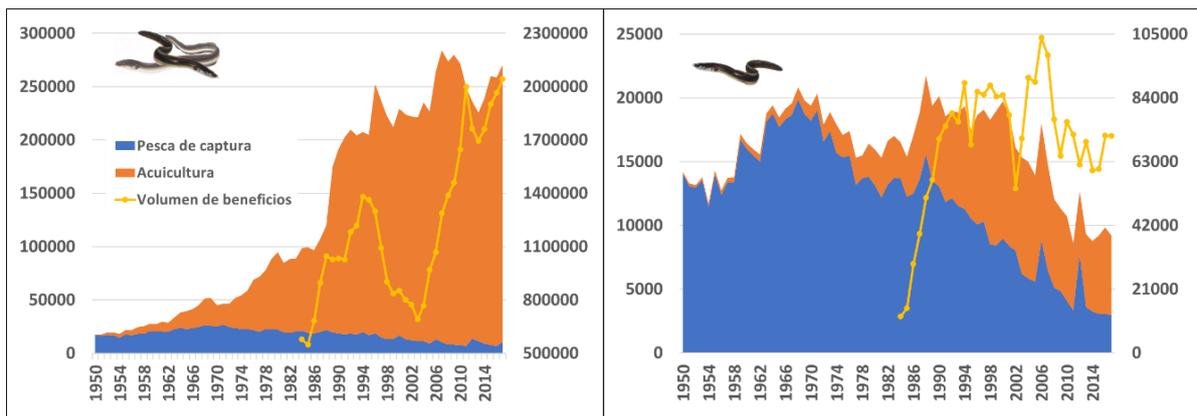


Figura 13. Evolución de la pesca y producción acuícola de anguilas entre 1950 y 2017 (en toneladas, eje izquierdo) y del volumen de beneficios de la anguicultura entre 1984 y 2017 (en miles de dólares, eje derecho). A la izquierda, a nivel mundial, mientras que a la derecha se centra en la anguila europea. Fuente: FAO.

La anguicultura genera grandes beneficios económicos, tanto a nivel regional como a nivel mundial, tal como se ha visto en la gráfica anterior. La anguila japonesa, de hecho, está entre las 15 especies de acuicultura que más beneficios generan del mundo, con 1970 millones de dólares. La anguila europea, por su parte, está entre las 10 especies de mayor beneficio generado en la Unión Europea, con 68,5 millones de dólares.

En 2017 (según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) había 12 instalaciones dedicadas a la cría de anguilas europeas (entre otros peces) en España. La mayoría de ellas se encontraba en las costas atlánticas de Andalucía (especialmente en Cádiz), mientras que había dos instalaciones en la provincia de Valencia y otra en Asturias. En el siguiente mapa (en la siguiente página), se muestra, la ubicación de todas las instalaciones dedicadas a la cría de anguilas, su finalidad, el tipo de acuicultura (marina o continental), el sistema de cultivo empleado en cada una de ellas, y las empresas propietarias de las mismas.

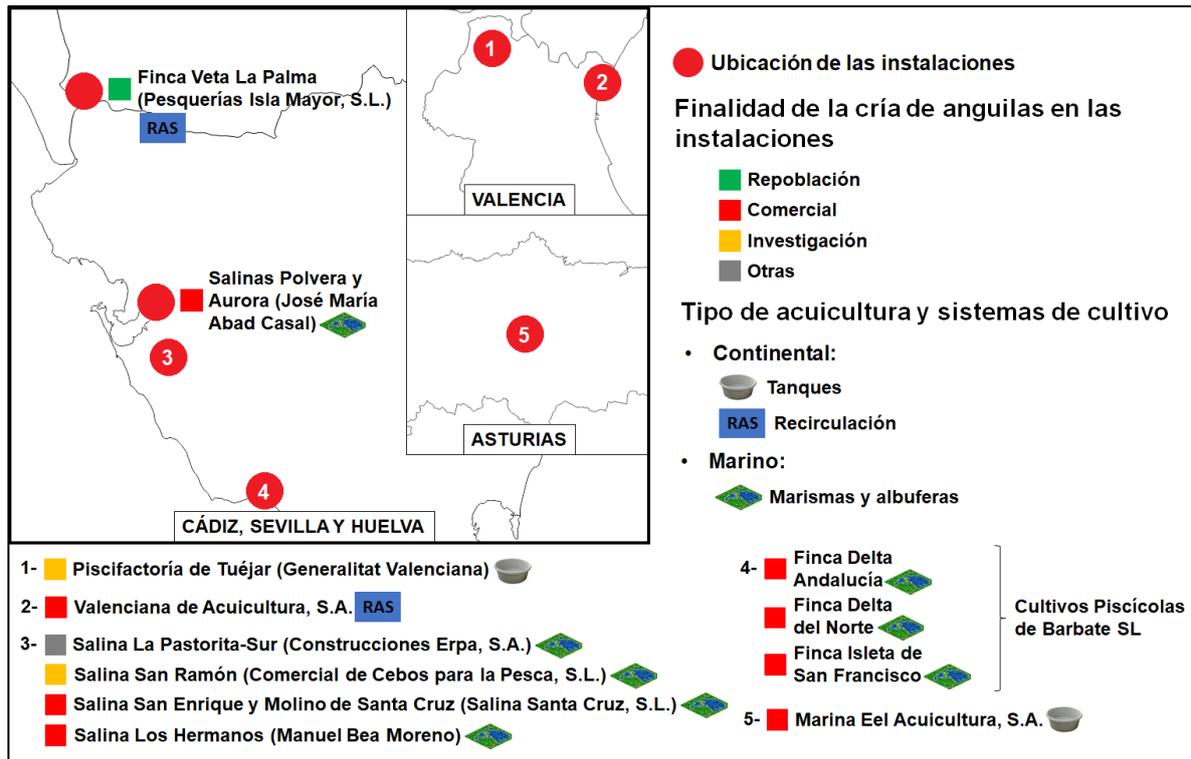


Figura 14. Mapa con la ubicación de las diferentes instalaciones dedicadas a la cría de anguilas, su finalidad, el tipo de acuicultura y sistemas de cultivo, en España en 2017. Fuente: Elaboración propia, a partir de AcuiVisor y MAPA.

Si hablamos de las angulas (los alevines de anguilas, los únicos permitidos por las leyes), el kilo puede costar mínimo 600€, considerándose un plato selecto para grandes celebraciones (APROMAR, 2017); (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 2018); (OCU, 2018).

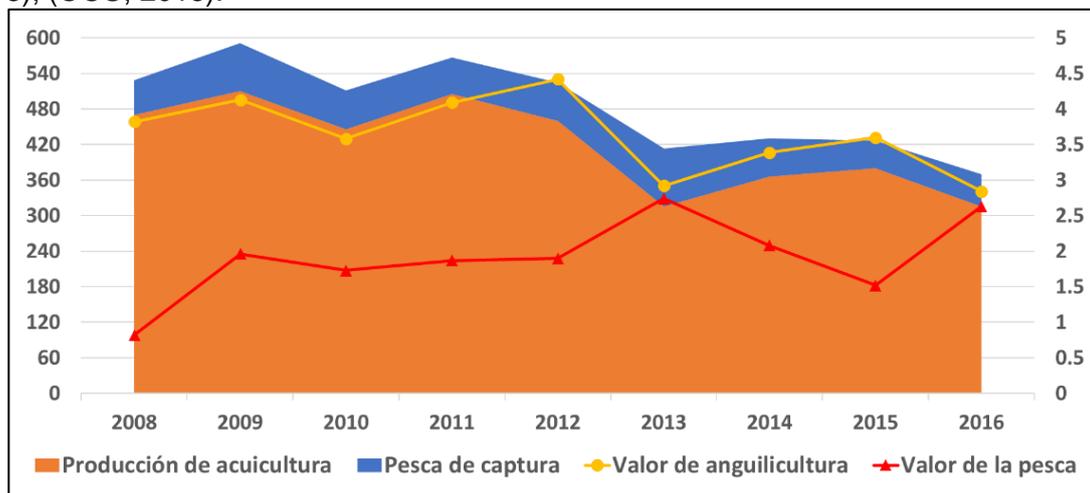


Figura 15. Evolución en la pesca de captura y producción de anguilas en acuicultura (en toneladas, eje izquierdo) y del valor económico (en millones de euros, eje derecho) en España entre 2008 y 2016. Fuentes: APROMAR y MAPAMA.

1.2.4 Condiciones ambientales para la cría de anguilas

En la siguiente tabla se muestra los parámetros ambientales adecuados para el engorde de anguilas:

	Valores óptimos	Rango
Temperatura (°C)	26-28	0-30
O ₂ disuelto (mg/L)	4-5	2,5-7
pH	7-8	6-9
Amonio/Amoniaco (mg/L)	0,5-3	0,5-6
Nitritos (mg/L)	0	1-5

Tabla 2. Parámetros ambientales adecuados para el engorde de la anguila. Fuente: Revista AquaTIC.

Las necesidades ambientales de las anguilas son:

- **Temperatura.** La temperatura corporal de los peces depende de las variaciones de la temperatura del medio acuático, pues los peces son seres poiquilotermos. De esta forma, la temperatura del agua afecta a la actividad, comportamiento, alimentación, crecimiento y reproducción de todas las especies de peces. Las anguilas europeas, especie de agua caliente, necesitan una temperatura óptima para el crecimiento de entre 26 y 28°C. Por debajo de 12-16°C, dejan de alimentarse y, por tanto, pierden peso. Eso no les impide tolerar temperaturas de entre 0 y 30°C (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (Gutiérrez Estrada, 2003).
- **Concentración de O₂ disuelto.** Es un parámetro importante en acuicultura, por su gran influencia sobre el consumo de alimento, tasa metabólica y gasto energético. La solubilidad del oxígeno en agua se ve influenciada por la temperatura, presión y la salinidad. Las anguilas son capaces de vivir en condiciones de anoxia, tolerando hasta concentraciones mínimas de 2-2,5mg/L, mientras que a valores superiores a 7-8mg/L, pueden causarles trastornos como el GBD (*gas bubble disease* o enfermedad de las burbujas de gas). A niveles inferiores de oxígeno, el crecimiento puede verse afectado. El consumo de oxígeno varía en función de:
 - a) **Tamaño de los peces** (a temperatura constante de 25°C): en anguilas de 10g, 340 mg/kg/h; en anguilas de 150g, 200 mg/kg/h.
 - b) **Temperatura del agua:** 100-200 mg/kg/h a 20°C, y 200-400 mg/kg/h a 30°C.
 - c) **Otros parámetros**, como estrés o la alimentación (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (Gutiérrez Estrada, 2003).
- **Alcalinidad y pH:** La anguila puede tolerar valores de pH acuático entre 6-9, debiendo mantenerse en valores de 7-8 para un correcto funcionamiento del sistema de recirculación. La alcalinidad es la capacidad de las aguas para neutralizar la capacidad tampón pH del agua, dependiente del sistema bicarbonato/carbonato. Si el agua carece de suficiente capacidad tampón, la actividad bacteriana tenderá a disminuir el pH por la producción continua de CO₂ en la oxidación de la materia orgánica y por la actividad de las bacterias nitrificantes. Es de importancia controlar los niveles de amonio y nitritos mediante el uso de filtros para controlar también los niveles pH. Se pueden dar cambios bruscos en el pH debajo de los 1,5 mmol/L de alcalinidad (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011).
- **Amonio/amoniaco.** El amonio existente en las aguas de piscifactoría se debe a la excreción de los peces por el metabolismo proteico y por vía branquial, además de la descomposición de la materia orgánica, como restos de heces o pienso. El amonio en el agua se disocia en amoníaco, y la proporción relativa de estos compuestos, que son tóxicos para los peces (aunque más tóxico es el amoníaco), depende de la temperatura y del pH (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).
- **Nitritos.** Constituyen el primer producto de la oxidación del amonio, realizada por bacterias nitrificantes *Nitrosomonas*, presentes en el sedimento de los estanques de

tierra, y en los biofiltros empleados en los sistemas de recirculación de agua. Los nitritos también presentan un carácter marcadamente tóxico para los peces, debido a su entrada en la sangre vía branquial, donde originan la ferrihemoglobina, incapaz de combinar oxígeno, de modo que el pez sufre hipoxia y muere (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

- **Nitratos.** Originados a partir de los nitritos por bacterias del género *Nitrobacter*, presentan escasa toxicidad para los peces, y presentan valores elevados tanto en aguas naturales como en aguas de piscifactorías. En sistemas intensivos de anguila son frecuentes valores de 500-1000 mg/L, las cuales sirven de indicador de que los procesos de nitrificación se están desarrollando de forma normal en los filtros biológicos (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).
- **Luminosidad.** Las anguilas son lucífugas, por lo que necesitan un entorno de semioscuridad, la cual es proporcionada por la turbidez del agua de cultivo o cubriendo los estanques o tanques con malla de rafia negra (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004).

	pH / Alcalinidad	Amonio / Amoniaco	Nitritos
Nivel normal	3-5 mmol/L	0,5-3 mg/L TAN (N-NH ₃ + N-NH ₄ ⁺)	1-5 mg/L
Nivel de observación	2-3 mmol/L	3-6 mg/L TAN (N-NH ₃ + N-NH ₄ ⁺)	5-10 mg/L
Nivel de actuación	1,5-2 mmol/L	> 6 mg/L TAN (N-NH ₃ + N-NH ₄ ⁺)	> 10 mg/L
Nivel letal/peligroso	< 1,5 mmol/L	> 0,5 mg/L NH ₃	> 50 mg/L NO ₂ > 15 mg/L N-NO ₂ ⁻

Tabla 3. Niveles recomendados de alcalinidad, amonio/amoniaco y nitritos para la anguila europea. Fuente: Revista AquaTIC.

1.2.5 La anguila como alimento



Figura 16. Fotografías de anguilas en un puesto del Mercado Central de Valencia (izquierda) y en la pescadería de Mercadona en L'Eliana, Valencia (derecha). Fotografías pertenecientes al autor de este trabajo: Juan Ignacio Marí Herguido.

La anguila, en cuanto su valoración nutricional, es una fuente de ácidos grasos monoinsaturados cardiosaludables (siendo el 64% del total de las grasas presentes en el pez). También es una fuente de proteínas de alto valor biológico, con aminoácidos esenciales como metionina, cisteína, treonina, lisina (para el crecimiento de los niños) y triptófano (para la formación de la sangre).

En lo que se refiere a minerales, es rica en selenio (mineral que destaca sobre los demás en este alimento), fósforo, zinc (siendo el pez con mayor contenido en dicho mineral) y hierro.

Si nos referimos a las vitaminas, las anguilas (y angulas) tienen un destacado contenido en vitaminas liposolubles A y D (son los pescados más ricos en dichas vitaminas), debido a su condición de pescado graso, localizándose la grasa y las vitaminas en hígado y músculos. En cuanto a la vitamina E (otra liposoluble), se encuentra en mayor cantidad en la angula (5,6mg/100gr) que en la anguila adulta (4,1mg). Por otra parte, en cuanto a las vitaminas hidrosolubles, destacan las vitaminas B12, niacina y riboflavina.

La porción comestible de la anguila es de 75 gramos por cada 100 de producto fresco, frente a los 100 gramos por cada 100 de producto fresco de la angula (Ávila Torres, y otros, 2009). A continuación, se muestra una tabla de la composición nutricional de las anguilas (y angulas) por cada 100 gramos, incluyendo el porcentaje con respecto a la CDR para vitaminas y minerales, según el Real Decreto 1669/2009 (Ministerio de la Presidencia, 2009).

COMPONENTE	POR 100 GRAMOS
Energía (kcal)	205
Proteínas (g)	16.3
Lípidos totales (g), de los cuales:	15.5
---- AG saturados (g)	3.15
---- AG monoinsaturados (g)	9.94
---- AG poliinsaturados (g)	1.48
---- Colesterol (mg/1000kcal)	50
Hidratos de carbono (g)	0
Fibra (g)	0
Agua (g)	68.2
MINERALES	
Calcio (mg)	30 (4%)
Hierro (mg)	1 (7%)
Yodo (µg)	10 (7%)
Magnesio (mg)	19 (5%)
Zinc (mg)	1.8 (18%)
Sodio (mg)	89
Potasio (mg)	270 (14%)
Fósforo (mg)	170 (24%)
Selenio (µg)	30 (55%)
VITAMINAS	
Tiamina (mg)	0.17 (14%)
Riboflavina (mg)	0.32 (23%)
Equivalentes de niacina (mg)	5.5 (34%)
Vitamina B6 (mg)	0.3 (21%)
Folatos (µg)	13 (13%)
Vitamina B12 (µg)	1 (50%)
Vitamina C (mg)	Trazas
Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	1000 (100%)
Vitamina D (µg)	110 (2200%)
Vitamina E (mg)	4.1 (34%) / 5.6 (47%)

Tabla 4. Tabla de la composición nutricional de la anguila por cada 100 gramos de parte comestible. Fuente: Fundación Española de la Nutrición.

Las especies de la familia Anguillidae, como otras especies anguiliformes como el congrio, son utilizadas como alimento y, además, forman parte de la gastronomía local en numerosas partes del mundo. Las principales formas de comercio de las anguilas son en forma de:

- **Anguilas/angulas vivas.** Los peces se transportan en camiones cisterna equipados con tanques aislados térmicamente y con oxigenación.

- **En fresco o refrigeradas.**
- **Congeladas.** Las anguilas, enteras o evisceradas, se congelan cuando deben ser importadas a países lejanos. El proceso de secado es similar al que se realiza con cualquier pez.
- **Ahumadas.** La anguila se limpia y eviscera, se hace la salazón (mezclar peces con cierta porción de sal para reducir la proporción de pérdidas de humedad) y se seca.
- **En conserva.** Pudiendo ser en aceite o en gelatina.

Varios ejemplos de platos con anguilas son el kabayaki (muy consumido en Asia) y el all-i-pebre en Valencia. Por último, no sólo la carne se puede aprovechar de la anguila, ya que también están las grasas (utilizadas en cosmética), las espinas (en dietética) y la piel curtida (para hacer cinturones...) (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004), (Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela, 2011).



Anguilas ahumadas



All-i-pebre



Kabayaki



Angulas

Tabla 5. Imágenes de algunos platos hechos con anguilas. Fuentes: Wikipedia, bbqgenootschap.nl, denia.com y Academia Vasca de gastronomía.

1.3 LA REPRODUCCIÓN DE LA ANGUILA

1.3.1 Anatomía del testículo

El testículo de los teleósteos (como la anguila) es un órgano pareado, alargado y que se encuentra a los lados por debajo de la vejiga natatoria, unido a la pared dorsal de la cavidad celómica y recubierto por la túnica albugínea. El color de esta gónada indica el estado de madurez, siendo el blanco lechoso el color habitual que representa la máxima maduración. En la siguiente imagen se muestra la evolución del aspecto del testículo de la anguila en el transcurso del período de la madurez sexual.

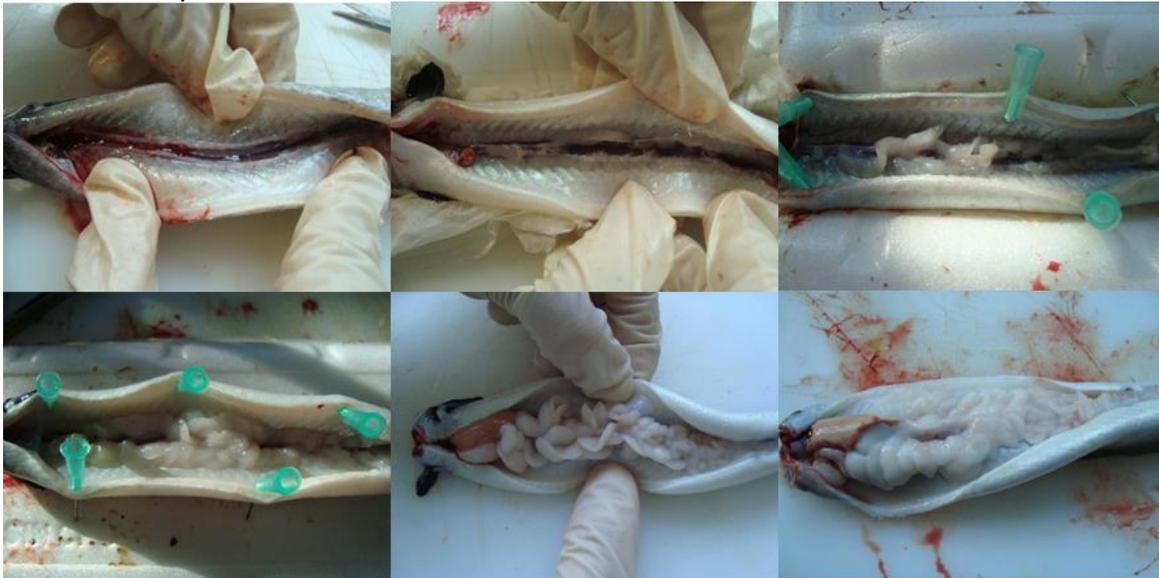


Figura 17. Evolución del aspecto del testículo de la anguila a lo largo de la madurez sexual.

La estructura del testículo en anguilas es **lobular no restringido**, como la mayoría de teleósteos. En este caso, el testículo está integrado por lóbulos separados por tejido conjuntivo, que se extiende desde la envoltura testicular, formando estructuras lobulares irregulares delimitadas por un epitelio que contiene a las espermatogonias (células germinales). Esos lóbulos están rodeados a su vez por una membrana basal continua que divide el testículo en un compartimento interlobular y otro intralobular. La gónada presenta tubos ciegos orientados desde la periferia a una cavidad central en la que se liberan los espermatozoides.

Las espermatogonias en la mayoría de teleósteos aparecen tanto en el ápice como en todo el lóbulo, a diferencia de del testículo de tipo lobular, donde sólo se ven espermatogonias en el ápice. Dentro de los túbulos, las espermatogonias primarias experimentan divisiones mitóticas quedando envueltas por las células de Sertoli, constituyendo los espermatocistos. Durante la espermatogénesis, esos cistos de células germinales se desplazan ligeramente hacia el centro del lóbulo, y tras acabar ese proceso la pared del ciste se abre para liberar los espermatozoides al sistema enfrente que varía según la especie. Los lóbulos seminíferos van a converger ventralmente hacia el espermiducto, vía por donde la cual el esperma es expulsado al exterior (Pinillos Bueno , 2003); (Cano, Albors, & Florenciano, 2009); (Fernández Fipa, 2011).

1.3.2 La espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso altamente organizado que incluye células mitóticas, meióticas y post-meióticas que lidera la formación de los espermatozoides. Las células madre espermatogónicas (SCC por sus siglas en inglés) son las fundamentales en la espermatogénesis y son cruciales para transmitir la información genética a las generaciones

venideras. Además, éstas son las únicas células madre que pueden reconvertirse a células totipotentes con la capacidad de diferenciarse en tejido somático (Lacerda, Costa, & de França, 2014).

La espermatogénesis en peces presenta tres fases, según se ha descrito en peces cebra (*Danio rerio*), una especie de ciprínidos:

- La **fase proliferativa**, con diferentes generaciones de espermatogonias, que sufren una serie de divisiones celulares mitóticas para aumentar su número.
- La **fase meiótica**, con espermatocitos primarios y secundarios. El proceso de división celular en las espermatogonias cambia de mitosis a meiosis. En la meiosis I se generan los espermatocitos primarios, los cuales entran en meiosis II para la generación de los espermatocitos secundarios, haploides que originan las espermátidas. Durante esta fase de desarrollo, los espermatocitos pierden el 80-90% de su volumen celular, la cromatina se condensa, el nucleoplasma se incorpora al citoplasma y el material celular es fagocitado. Las mitocondrias se concentran en el cuello de la célula y el flagelo crece.
- La **fase espermiogénica**, en la cual las espermátidas haploides se diferencian en espermatozoides, con un cabeza y flagelo bien diferenciados. La fase empieza al finalizar las divisiones celulares y, en un proceso llamado espermiación, se rompen las paredes del cisto espermático y se liberan los espermatozoides ya formados hacia los conductos eferentes, donde sufren un proceso de maduración e hidratación (W. Schulz, y otros, 2010); (Fernández Fipa, 2011).

A continuación, se muestra la evolución de la espermatogénesis en peces cebra, a través de las fases ya mencionadas anteriormente.

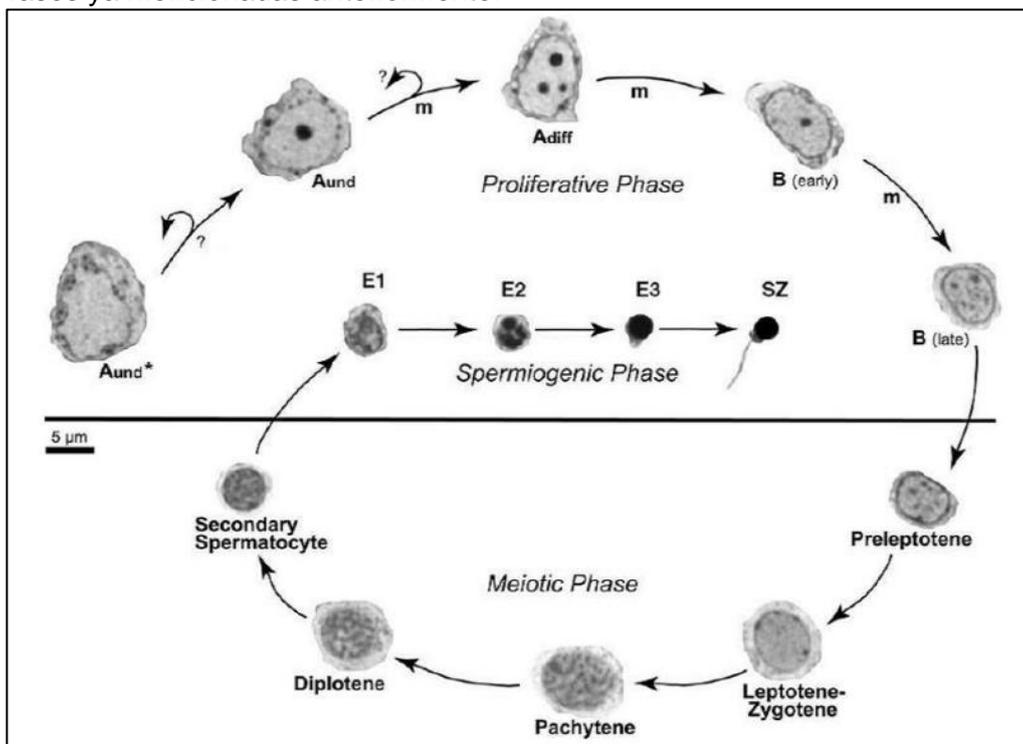


Figura 18. Evolución paso a paso de la espermatogénesis en pez cebra (*Danio rerio*), a través de sus tres fases, desde las espermatogonias a los espermatozoides. Autor: Schulz et al, General and Comparative Endocrinology 165 (2010) (pp.390–411)

Tras liberar los espermatozoides al lumen, las células de Sertoli, que entre sus funciones están la secreción de sustancias nutritivas al lumen y la esteroidogénesis testicular, forman

la barrera testicular, por la cual no hay contacto directo entre los espermatozoides y el torrente sanguíneo, y que mantiene un microambiente favorable para la supervivencia de éstos (Pinillos Bueno , 2003).

A continuación, se detallan las características morfológicas (junto a fotografías microscópicas) de las distintas generaciones de espermatogonias en tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*), (Lacerda, Costa, & de França, 2014).

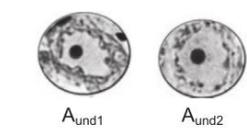
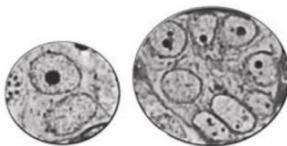
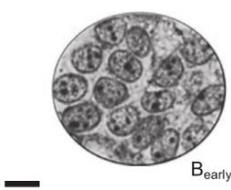
Espermatogonia indiferenciada de tipo A: Además de ser aisladas, son las células germinales más grandes del testículo de los peces.	
 <p>A_{und1} A_{und2}</p>	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Núcleo grande con 1 o 2 núcleos sobresalientes.
	- Bajo contenido en heterocromatina nuclear - Abundante contenido de nube perinuclear (con ribonucleoproteínas y ARN)
	- Alta densidad de mitocondrias cercanas al núcleo. Las mitocondrias están rodeadas por el retículo endoplasmático liso.
Espermatogonia diferenciada de tipo A: Se encuentran en quistes con entre 2 y 8 células con puentes citoplasmáticos incompletos tras la mitosis.	
 <p>A_{diff} (2 cells) A_{diff} (8 cells)</p>	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Núcleo con uno o más nucléolos.
	- Pequeña cantidad de heterocromatina. - Núcleo de forma redonda a ovalada con envoltura regular.
	- Gran volumen del citoplasma, con muy poca o nada de nube perinuclear.
Espermatogonia inicial de tipo B: Se encuentran en quistes con 16 células o más, dependiendo del número de ciclos celulares mitóticos.	
 <p>B_{early}</p>	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- El volumen nuclear y el tamaño de la célula es menor.
	- Núcleo con uno o más nucleolos. - Alto contenido en heterocromatina.
	- Núcleo de forma redonda a ovalada. - Menos volumen en el citoplasma que en las otras células
Espermatogonia posterior de tipo B: Representan las últimas generaciones antes de la formación de los espermatoцитos primarios	
 <p>B_{late}</p>	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Núcleos normalmente redondos que son más pequeños que la espermatogonia inicial de tipo B.
	- Heterocromatina llega a su máxima densidad. - Menos volumen en el citoplasma que en las otras células

Tabla 6. Las distintas generaciones de las espermatogonias durante la fase proliferativa de la espermatogénesis en peces, incluyendo información sobre sus principales características morfológicas y fotografías microscópicas al mismo número de aumentos. La barra negra equivale a 5µm. Autor: Lacerda et al, General and Comparative Endocrinology 207 (2014) (pp.56-65).

En la siguiente tabla, se detallan las características morfológicas (y fotografías microscópicas) de las distintas generaciones las células meióticas (espermatoцитos) en peces cebra (*Danio rerio*), (Nóbrega, y otros, 2014).

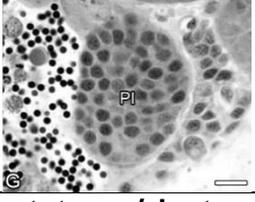
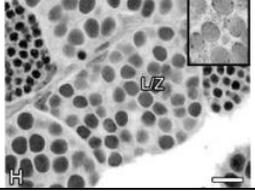
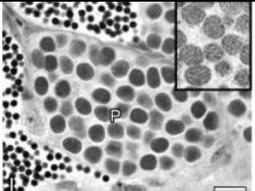
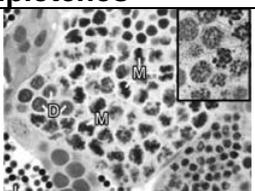
Preleptoteno	
	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Es un poco más pequeña que las espermatogonias posteriores de tipo B - El núcleo es más denso y contiene cromosomas como líneas gruesas desde la periferia hasta la parte central del núcleo.
Leptotenos/zigotenos	
	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Núcleo más grande y redondeado que el de las espermatogonias posteriores de tipo B. - Se muestra una cromatina transparente con pequeñas manchas de heterocromatina que bordean la envoltura nuclear.
Paquitenos	
	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Son las células más grandes de entre los espermatoцитos. - Su núcleo es más denso y contiene los cromosomas como líneas gruesas de la periferia hacia la parte central del núcleo.
Diplotenos	
	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
	- Siempre aparecen junto a figuras metafásicas de la primera metafase. - El cromosoma se encuentra en su máximo grado de condensación.

Tabla 7. Las distintas generaciones de los espermatoцитos, con información sobre sus principales características morfológicas y fotografías microscópicas al mismo número de aumentos. La barra blanca equivale a 10µm. Autor: Nóbrega, Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish (2014) (pp.29-62).

1.3.3 El eje Cerebro-Hipófisis-Gónada

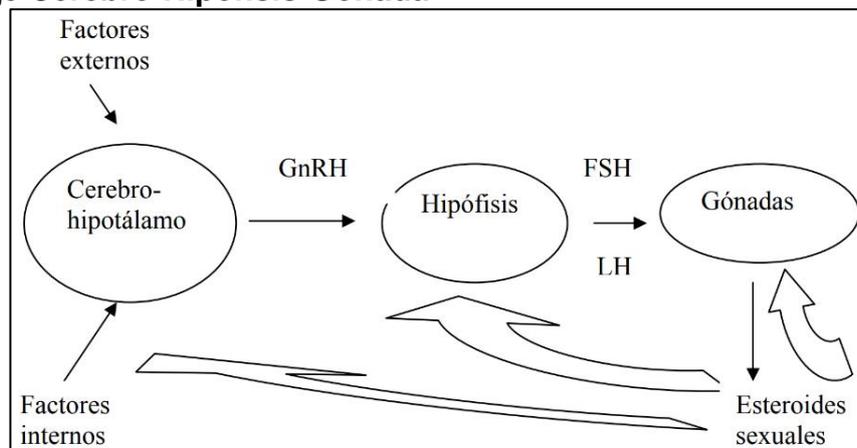


Figura 19. Esquema del eje cerebro-hipófisis-gónada. Fuente: Universidad de Oviedo.

Los procesos reproductivos en peces, incluyendo la diferenciación sexual, la pubertad y la maduración final/puesta, están controlados por el eje cerebro-hipófisis-gónada. En el hipotálamo se produce y se libera la GnRH (hormona liberadora de gonadotropina),

influenciada por **factores externos** (temperatura, luminosidad, salinidad, nutrientes) e **internos** (reloj biológico, estatus gonadal). A su vez, la GnRH produce la síntesis y liberación de gonadotropinas (LH y FSH) desde la hipófisis al torrente sanguíneo, donde alcanzarán las gónadas y regularán su maduración: la **LH**, que regula la maduración del ovocito, así como la ovulación y la espermiación; y la **FSH**, que controla los primeros estadios de la gametogénesis. Ambas hormonas son de la familia de las glicoproteínas pituitarias, y son heterodímeros, cada uno constituido por una subunidad α común y otra subunidad β específica de la hormona. Las gonadotropinas actúan sobre la gónada, donde estimulan la síntesis de andrógenos, estrógenos y progestágenos, todos ellos los últimos responsables del desarrollo gonadal, y de la modulación del desarrollo de las células germinales (Grupo de investigación "Fisiología y patología en acuicultura", 2016); (Rasines Pérez, 2013); (Cueto, 2016).

Las vías señalizadoras que conforman este eje se encuentran altamente interconectadas siendo necesario su adecuado balance y sincronización, que resulta crucial en acuicultura por las pérdidas que pueden suponer en la producción. Esto se debe a que algún desequilibrio puede causar pérdidas en producción debido a las disfunciones causadas en los procesos a controlar, como son el bloqueo y/o las alteraciones en el desarrollo y maduración de los gametos, de la puesta, o del comportamiento reproductivo, el adelanto prematuro de la pubertad, y el desequilibrio en la proporción de sexos (Grupo de investigación "Fisiología y patología en acuicultura", 2016).

Dependiendo de las especies de peces, la FSH o la LH tienen mayor o menor efecto en la espermatogénesis y en la espermiogénesis. Según un estudio de Swanson (1991), en **salmónidos** se determinó que la FSH era abundante en la espermatogénesis, mientras que la LH lo era en la fase previa a la espermiogénesis, deduciendo así la importancia de cada hormona durante el desarrollo gonadal, al igual que se ha visto posteriormente en otras muchas especies de peces, estando entre ellas:

- **Bagre africano** (*Clarias gariepinus*), según Schulz et al (1997)
- **Lubina europea** (*Dicentrarchus labrax*), según Zanuy et al (2011)
- **Jurel rabo amarillo** (*Atule mate*), según Rahman et al (2003)
- **Caballa del Pacífico** (*Scomber japonicus*), según Nyuji et al (2012)
- **Fúndulo** (*Fundulus heteroclitus*), según Shimizu (2014)
- **Lubina rayada atlántica** (*Morone saxatilis*), según Hassin et al (2000)
- **Esturión blanco** (*Acipenser trasantanus*), según Moberg et al (1995)
- **Pez espada** (*Xiphias gladius*), según Minniti et al (2009)
- **Merluza europea** (*Merluccius merluccius*), según Candelma et al (2018)
- **Anguila moteada gigante** (*Anguilla marmorata*), según Huang et al (2009)
- **Ayu** (*Plecoglossus altivelis*), según Yoshida et al (2001)
- **Buri** (*Seriola quinqueradiata*), según Higuchi et al (2017)
- **Bacalao del Atlántico** (*Gadus morhua*), según de Almeida et al (2011)

Por el contrario, según un estudio de Gen et al (2003), se pudo determinar en **pargo japonés** (*Pagrus major*) que la LH era la hormona involucrada en la espermatogénesis, mientras que la FSH estaba involucrada en la espermiogénesis (Gen, y otros, 2003); (Rey-Vázquez, 2012); (Schulz, y otros, 1997); (Zanuy, Carrillo, Rocha, Espigares, & Molés, 2011); (Rahman, y otros, 2003); (Nyuji, Selvaraj, Kitano, & Shiraishi, 2012); (Shimizu, 2014); (Hassin, Claire, Holland, & Zohar, 2000); (Moberg, Watson, Doroshov, Papkoff, & Pavlick, 1995); (Minniti, Maisano, Giannetto, Mauceri, & Fasulo, 2009); (Candelma, Valle, Colella, Santojanni, & Cernevali, 2018); (Huang, y otros, 2009); (Yoshida, Nagae, Ito, & Soyano, 2001); (Higuchi, y otros, 2017); (Miura & Miura, 2011); (de Almeida, y otros, 2011).

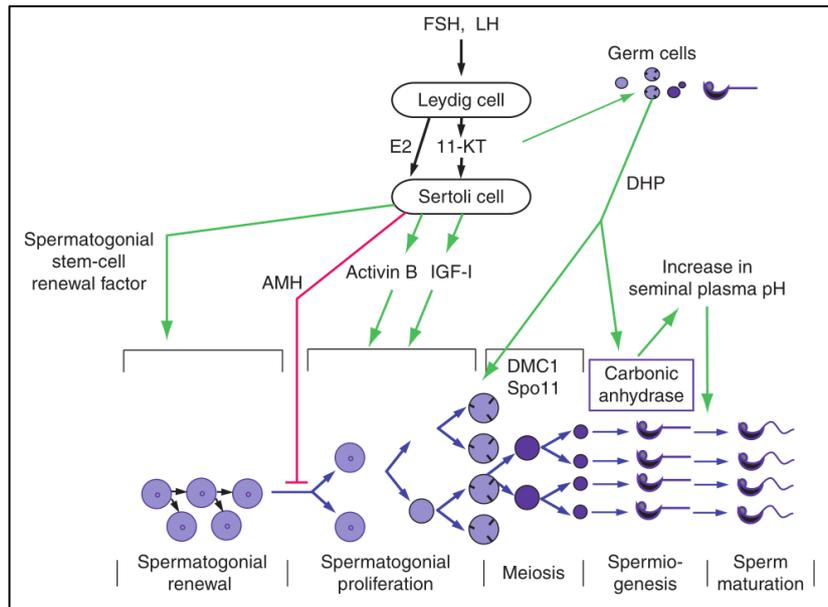


Figura 20. Mecanismos endocrinos de regulación de la espermatogénesis en anguila japonesa (*Anguilla japonica*). Autores: Yaron y Levavi-Sivan, Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment (2011) (pp.1500-1508).

1.4 LA REPRODUCCIÓN ARTIFICIAL COMO ALTERNATIVA: ESTUDIOS SOBRE LA INDUCCIÓN DE ESPERMATOGÉNESIS EN ANGUILAS EUROPEAS

El principal problema para poder producir cualquier especie de pez en acuicultura es el abastecimiento de alevines de forma regular y sostenible en el tiempo, tratando de romper con la estacionalidad de las puestas y controlar la reproducción de estos. La reproducción artificial, que busca resolver ese problema, se ha conseguido, exitosamente, con la **manipulación de la temperatura** y del **fotoperiodo** con diversas especies de teleósteos de latitudes templadas, como doradas y lubinas, entre otras.

Como se ha mencionado anteriormente, todavía **no se ha podido cerrar el ciclo reproductivo de las anguilas europeas**. Por ello, aún se recurre a la captura de angulas, que además son más escasas (por tanto, son más caras), para abastecerse de alevines para acuicultura. Es por todo eso que **se está estudiando la reproducción de las anguilas**, tanto en machos (**espermatogénesis**) como en hembras (**oogénesis**), **para poder obtener angulas en cautividad en vez de capturarlas del medio natural**, al tratarse de una especie en peligro grave de extinción (peligro crítico, según la UICN).

En cuanto a los estudios con machos de anguila europea, se ha utilizado una serie de tratamientos “ambientales”, tales como el sometimiento de los reproductores a altas presiones (Sébert et al 2009) o simulación de migración reproductiva bajo condiciones fototérmicas (Palstra et al 2016), los cuales han logrado tanto la inducción de cierto desarrollo gonadal como ciertas variaciones en los niveles hormonales. En la actualidad, esos tratamientos están todavía en fase de experimentación, y ya se trabajan en combinación con tratamientos hormonales, ya sean previos o posteriores (Sébert, Vettier, Amérand, & Moisan, 2009); (Palstra, Mes, & Dirks, 2016).

Los **tratamientos hormonales**, hoy en día, son la **base de la línea de investigación más desarrollada para la maduración de anguilas**. Esos tratamientos están basados en un método desarrollado por Ohta et al (1997) en anguilas japonesas, con **inyecciones de hCG (gonadotropina coriónica humana) en machos** y **SPE (extracto de pituitaria de salmón) y DHP en hembras**. En la fig. 21 puede verse el protocolo de tratamiento hormonal publicado por Ohta et al (1997), empleado en la actualidad para madurar machos y hembras de la especie (Asturiano, Jover, Pérez Igualada, & Barrera, 2004); (Vílchez Olivencia, 2014).

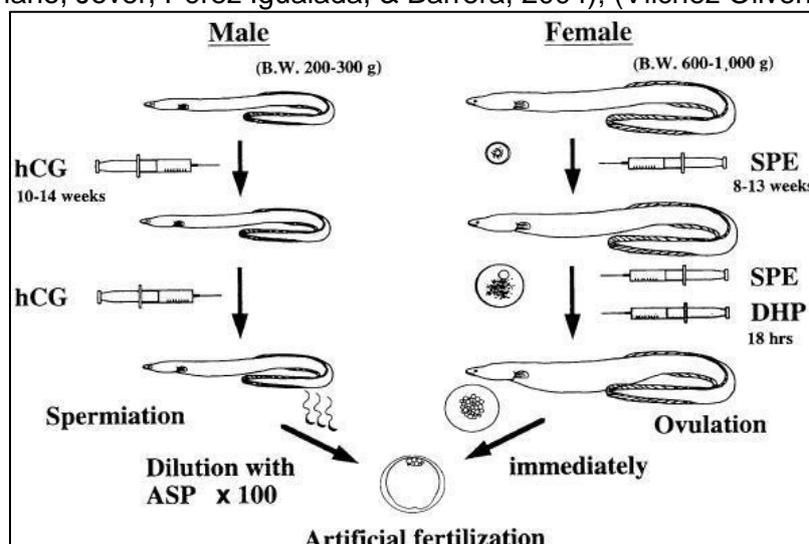


Figura 21. Resumen gráfico de la inducción artificial de maduración y fertilización en anguilas japonesas, según Ohta et al. (1997).

Esta línea de investigación con la anguila japonesa ha avanzado mucho desde entonces. De hecho, Tanaka et al (2003) lograron obtener las primeras anguilas sin pigmentar en cautividad. Más tarde, en 2010, científicos de la Agencia de Investigación Pesquera de Yokohama produjeron la segunda generación de anguilas sin pigmentar en cautividad, además con excelentes tasas de supervivencia y crecimiento, logrando así cerrar el ciclo biológico en esta especie tras más de 20 años de investigación (Kagawa, Tanaka, Ohta, Unuma, & Nomura, 2005); (Tanaka, Kagawa, Ohta, Unuma, & Nomura, 2003); (Tanaka H. , 2015).

1.4.1 Estudios sobre el efecto de las gonadotropinas recombinantes en la inducción de la espermatogénesis en peces

Dentro de esta línea de investigación de tratamientos hormonales, también se ha estudiado, a través de diversos trabajos recientes, el efecto de las gonadotropinas recombinantes en la inducción de espermatogénesis de la anguila japonesa, pero con conclusiones diferentes:

- **Ohta et al (2008)**. En este estudio se determinó el efecto de las gonadotropinas recombinantes de carpa dorada (*Carassius auratus*), scLH y scFSH, en la espermatogénesis y en el tamaño de los testículos de las anguilas japonesas. Se realizaron 5 tratamientos: el primero, control, sin tratamiento hormonal; el segundo, con scFSH (3 μ L/g BW); el tercero con scLH (3 μ L/g BW); el cuarto, con tres inyecciones de scFSH (3 μ L/g BW) y otras cinco de scLH (3 μ L/g BW) (scFSH-scLH); y la última, con hCG, 1,5 unidades/3 μ L/g BW. Centrándonos en el efecto de la espermatogénesis, el grupo control inicial presentaba únicamente espermatogonias de tipo A (SPGA); el grupo control y el tratado con scFSH presentaba espermatogonias A y B; en los últimos tres tratamientos se llegó a presenciar espermatogonias (A y B), espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides. De este modo, se podía decir que el LH recombinante de carpa dorada tenía mayor efecto en la espermatogénesis y espermiogénesis que la FSH recombinante (Hotta, Kaki, Nagaya, & Hayakawa, 2008).
- **Kobayashi et al (2010)**. Este otro trabajo hablaba sobre el efecto de gonadotropinas recombinantes (reFSH y reLH) de anguila japonesa producidas por baculovirus en larvas de gusano de seda. Para el experimento relacionado con la inducción de la espermatogénesis, se realizaron cuatro tratamientos distintos: el primero, control, sin hormonas; el segundo, con reFSH (2 μ L/g BW); el tercero con reLH (2 μ L/g BW); el cuarto, con tres inyecciones de reFSH (2 μ L/g BW) y otras cinco de reLH (2 μ L/g BW) (reFSH-scLH); y la última, con hCG, 1,5 UI/g BW. Tanto el control inicial como el control mostraban únicamente espermatogonias, mientras que los otros tratamientos mostraban incluso espermatozoides. El mejor de ese tratamiento era el de hCG (el 100% de los machos mostraba espermatozoides), y en el resto, menos del 50% de los machos mostraba espermatozoides. La conclusión que se sacó fue que estos tratamientos (reFSH, reLH, reFSH-reLH) logran inducir completamente la espermatogénesis *in vivo* en anguilas japonesas sexualmente inmaduras, aunque con peores resultados que con hCG (Kobayashi, y otros, 2010).
- **Kazeto et al (2008)**. Este estudio trata de la producción de gonadotropinas (recFSH y recLH) recombinantes de anguila japonesa por células de *Drosophila* S2 (mosca de la fruta). 20 anguilas fueron sometidas a cuatro tratamientos hormonales diferentes: el primero, con una sola inyección de hCG (5000UI/kg BW); el segundo, con dosis de recFSH (5 mg/kg-BW); el tercero con dosis de recLH (5 mg/kg-BW); y el último, con solución Ringer de anguilas. A los 18 días del comienzo de los tratamientos, se sacrificaron a las anguilas y se obtuvo las gónadas para su estudio. Los testículos de las anguilas tratadas con recFSH mostraban células SPGB avanzadas, mientras que en los testículos de anguilas tratadas con recLH y las controles sólo se mostraba células germinales previas a la proliferación de espermatogonias. El tratamiento con hCG indujo la espermatogénesis de forma

completa, con todos los tipos celulares presentes. La conclusión fue que las gonadotropinas recombinantes en cuestión sólo podían inducir las fases iniciales de la espermatogénesis, a diferencia de los otros experimentos mencionados anteriormente (Kazeto, y otros, 2008)

También se ha estudiado el efecto de las gonadotropinas recombinantes en otras especies de peces:

- **Lenguado senegalés** (*Solea senegalensis*): Mediante el uso de gonadotropinas recombinantes de lenguado (rFsh y rLh). En el primer experimento (de dos que se hicieron), se quiso determinar el efecto sobre la espermatogénesis de un tratamiento consistente en dosis crecientes de rFsh con dosis baja de rLH durante 9 semanas y altas dosis de rLh en las últimas 24 horas antes del sacrificio de los peces. Las conclusiones que se sacaron fueron que rFsh y rLH son muy estables en la circulación en machos de lenguado, y que el tratamiento con rFsh es efectivo para estimular el crecimiento del testículo, la espermatogénesis y la diferenciación de espermatozoides (Cerdà, Chauvigné, González, Duncan, & Giménez, 2017).
- **Escatófago manchado** (*Scatophagus argus*): Se hizo un primer experimento, en el cual se les administró a peces con desarrollo gonadal avanzado (y previamente en un tratamiento con agua salada en condiciones ambientales) una inyección con gonadotropinas recombinantes de escatófago manchado (2µg r-SaFSH y 2µg r-SaLH, en ambos casos por gramo de peso de pez). Se recogieron, entre otras cosas, testículos de los peces a los 0 días post-transferencia (dpt), 7 dpt y 14 dpt. Otro experimento que se hizo fue el suministro de pienso que contenía proteínas recombinantes, en una proporción de 1,5µg r-SaFSH y 1,5µg r-SaLH por gramo de pienso. Se obtuvo gónadas de los peces del tratamiento a los 10 días de comenzar la alimentación de los peces (dpf), 30 dpf y 60 dpf para análisis histológico. La conclusión fue que las inyecciones mejoraron la gametogénesis y el desarrollo gonadal en los peces (al poder detectarse espermatozoides), y los piensos con gonadotropinas recombinantes podían usarse para acelerar la madurez sexual en la reproducción artificial de esta especie (Zhang, Wang, Su, & Zhang, 2018).
- **Jurel de Castilla** (*Seriola lalandi*): En trabajo se determinó la actividad *in vivo* y *ex vivo* de FSH recombinante de jurel de Castilla (rytkFSH) producida en la levadura *Pichia pastoris*. En el experimento centrado en el ensayo *in vivo* de los peces, se le inyectó únicamente solución salina a un grupo de peces control, mientras que a otro grupo se le inyectó una dosis de rytkFSH liofilizada (a razón de 10-20 µg/kg de peso). Dichas inyecciones se repitieron 6 veces con un intervalo de 10 días. Las fases 1 (inmadurez) y 2 (en desarrollo) pudieron apreciarse en los testículos de los peces sometidos a tratamiento y los que no fueron sometidos a tratamiento. La fase 3 (madurez sexual, en la que se incluye espermatozoides en el lumen de los lóbulos), en cambio, sólo se pudo ver en los peces sometidos a tratamiento. De esta manera, se concluyó que la FSH recombinante podía inducir la última fase de la espermatogénesis en machos de jurel de Castilla (Sanchís-Benlloch, y otros, 2017).



Figura 22. Lenguado senegalés (*Solea senegalensis*, izquierda), escatófago manchado (*Scatophagus argus*, centro) y jurel de Castilla (*Seriola lalandi*, derecha). Fuentes: Wikipedia y Sandrine Ruitton (Flickr.com).

También ha habido un trabajo centrado en la anguila europea en este aspecto. El grupo de investigación en el que he realizado el presente trabajo ya realizó previamente otro estudio, publicado en la revista *Theriogenology* en febrero de 2018 (Peñaranda et al., 2018), que trataba sobre el **uso de gonadotropinas recombinantes específicas de anguila (aarGTHs)** y su efecto **en la inducción de la maduración de los machos**.

En un **primer experimento**, para determinar la influencia de las gonadotropinas recombinantes juntas y por separado en la espermatogénesis, se sometieron a los peces a cinco tratamientos hormonales distintos: **Grupo F**, con **dosis constante de FSH recombinante (aarFSH, 4µg/pez)**; **Grupo L**, con **dosis constante de LH recombinante (aarLH, 2µg/pez)**; **Grupo F/L**, con dosis constante de FSH recombinante (aarFSH, 4µg/pez) seguidas de dosis constante de LH recombinante (aarLH, 2µg/pez); y el resto con **dosis variables de ambas hormonas (F/LI y FD/LI)**, tal como se puede ver en el siguiente gráfico:

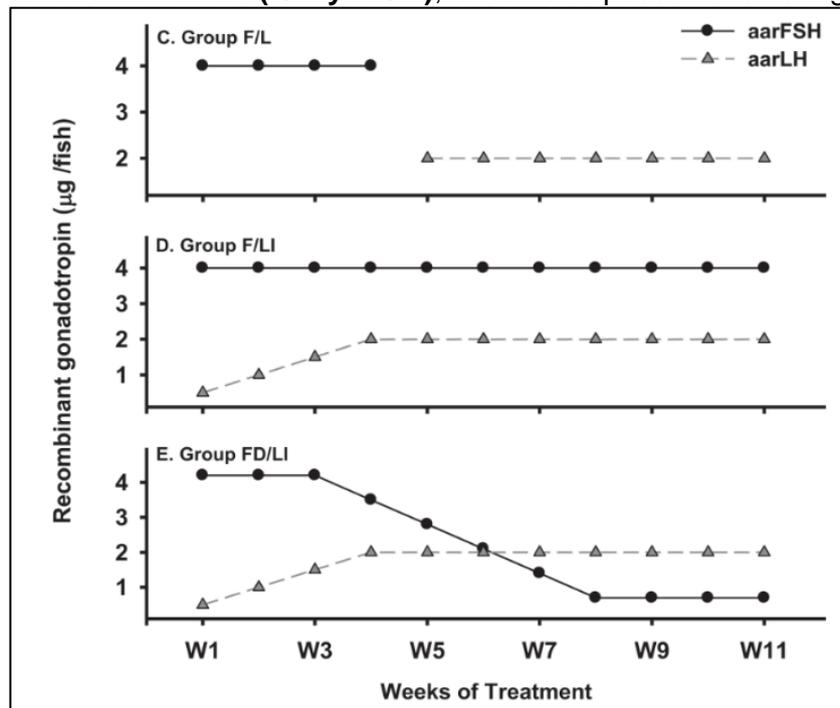


Figura 23. Variación de las dosis de gonadotropinas recombinantes a lo largo del tiempo en los tres tratamientos con dosis variables del experimento 1 (F/L, F/LI y FD/LI). Autor: Peñaranda et al (2018)

Por un lado, evaluando los porcentajes relativos de cada tipo celular de la espermatogénesis, el tratamiento F/LI (con dosis constante de FSH y creciente de LH) fue el que mejor indujo la espermatogénesis, pues en el $\pm 87,5\%$ de los machos del tratamiento se detectó la presencia de espermatozoides, mientras que el resto era SPD. Lo seguía el tratamiento FD/LI (con dosis creciente de LH y decreciente de FSH), con un $\pm 87,5\%$ de los machos con espermatozoides, mientras que en el resto se observó SPG2 (fase tardía de espermatogénesis). El tratamiento sólo con FSH indujo espermiogénesis en el $37,5\%$ de los machos, mientras que el F/L (con dosis constante de FSH recombinante seguidas de dosis constante de LH recombinante) lo hizo apenas en el $\pm 10\%$ de los machos. El tratamiento solo con LH indujo fase tardía de espermatogénesis en todos los machos.

Por otro lado, de todos esos tratamientos, el F/LI (dosis constante de FSH y dosis crecientes de LH) fue la que tenía mayor porcentaje de células motiles (20%), pese a que las anguilas eran inmaduras al inicio del experimento. Ese mismo tratamiento ha sido el que logró el mayor número de machos que alcanzaron la espermiación (100% entre las semanas 10 y 11) y la motilidad tanto total como progresiva (20% y 2%, respectivamente, en la semana 8).

De este primer experimento se concluyó que las gonadotropinas recombinantes producidas por un sistema CHO son biológicamente activas y que la vida media de las mismas era lo suficientemente larga como para inducir espermatogénesis *in vivo*.

Un **segundo experimento se realizó para mejorar la calidad del espermia**, mediante el cual se sometió a anguilas inmaduras a tres tratamientos diferentes, cada uno con dosis constantes de FSH recombinante (2,8, 1,4 y 0,7µg/pez), y otro con dosis crecientes de LH recombinante cada 3 semanas (1, 2 y 6µg/pez). Aunque todos los tratamientos indujeron espermiación, el mejor tratamiento era el de mayor dosis de FSH recombinante, observándose más del 50% de células motiles en las anguilas macho.

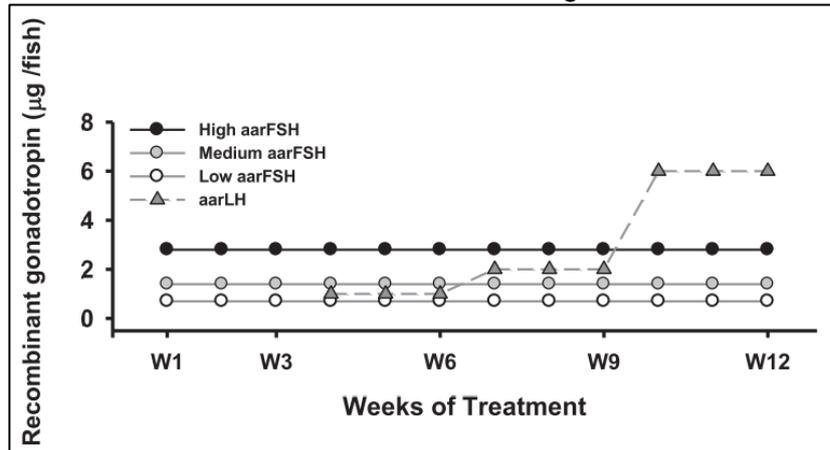


Figura 24. Variación de las dosis de gonadotropinas recombinantes a lo largo del tiempo en los tres tratamientos con dosis variables constantes de FSH y variable de LH del experimento 2. Autor: Peñaranda et al (2018)

Evaluando la progresión del desarrollo gonadal, en los tratamientos con dosis media de FSH (1,4µg/pez) y alta (2,8) se destacó a la meiosis como proceso dominante, con un 33% de los peces llegando a la fase SPC2 a las 6 semanas después de empezar los tratamientos. El tratamiento de dosis bajas de FSH (0,7µg/pez) no indujo desarrollo testicular hasta las 9 semanas desde el comienzo del tratamiento, cuando se observaron lúmenes y espermatogonias B. En la semana 12, en todos los tratamientos se logró alcanzar la espermiogénesis (SPZ1 y SPZ2), aunque el tratamiento con dosis altas logró que el 100% de los machos llegaran a la espermiación, mientras que los dos tratamientos indujeron la espermiación en porcentajes inferiores al 60% de los machos. De este modo, los valores de desarrollo gonadal mostraban valores similares a los del experimento 1. En cuanto a los parámetros de motilidad total y progresiva, el tratamiento hormonal de dosis alta dio los valores más altos de cada parámetro (60% y 30%, respectivamente, en la semana 10), aunque en las siguientes semanas fueron bajando progresivamente dichos valores, aun así, muy superiores a los obtenidos en el experimento 1. Los otros dos tratamientos no alcanzaron valores del 50% en ninguna semana del experimento.

De este segundo experimento se concluyó que la administración de ambas gonadotropinas recombinantes es esencial para inducir la maduración sexual en anguilas en cautividad, poniendo además de manifiesto que la administración rFSH era importante en el avance de la espermatogénesis.

La conclusión global que se sacó del trabajo es que las hormonas recombinantes inducen espermatogénesis y espermiación en las anguilas europeas (Peñaranda, y otros, 2018).

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este estudio es evaluar la influencia del tratamiento con FSH y LH recombinantes en la espermatogénesis de la anguila europea, a través del análisis de los cortes histológicos de los testículos de las anguilas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcanzar el objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Observación de los diferentes tipos celulares de la espermatogénesis en los cortes histológicos, y posterior análisis de imagen mediante software especializado.
- Cuantificación y correlación de los tipos celulares por macho y tratamiento y, a partir de los resultados (porcentajes de machos espermiantes y de espermatozoides sobre el total de tipos celulares en los testículos), determinación de la influencia de cada hormona recombinante en la espermatogénesis.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

Se experimentó con un total de 90 machos anguilas con un peso medio de $102,23 \pm 6,75g$, procedentes de piscifactoría, concretamente de la empresa “Valenciana de Acuicultura S.A.” (Puzol, Valencia).

Los peces fueron estabulados en 3 tanques de 150 litros con agua dulce, en las instalaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. Posteriormente, se aclimataron a agua marina a 20°C (mantenida la temperatura con termostatos/enfriadores) durante 1 semana, y luego se mantuvieron en agua marina.

Una vez por semana, cada grupo de anguilas (30 por grupo) se inyectó con su correspondiente tratamiento:

- FSH recombinante: 6µg/pez/semana
- LH recombinante: 6µg/pez/semana
- Control: sin tratamiento

Las hormonas recombinantes fueron proporcionadas por la empresa Rara Avis SL.

Se sacrificaron 9 peces al inicio del experimento (S0, 1 semana tras aclimatación a agua marina) y 8 peces/grupo al final del experimento, tras 4 semanas de tratamiento. Se anotaron los datos biométricos, y se tomaron muestras de sangre (para el análisis posterior de esteroides) y muestras de gónadas (histología, expresión génica).

3.1 HISTOLOGÍA

Las muestras de testículo se fijaron en formalina al 4% y se deshidrataron según el protocolo de alcoholes crecientes:

- Etanol 70% 1h
- Etanol 80% 1h 30'
- Etanol 96% 1h 30'
- Etanol 96/Technovit (50/50) 1h 30'
- Technovit 2: toda la noche, a temperatura ambiente.

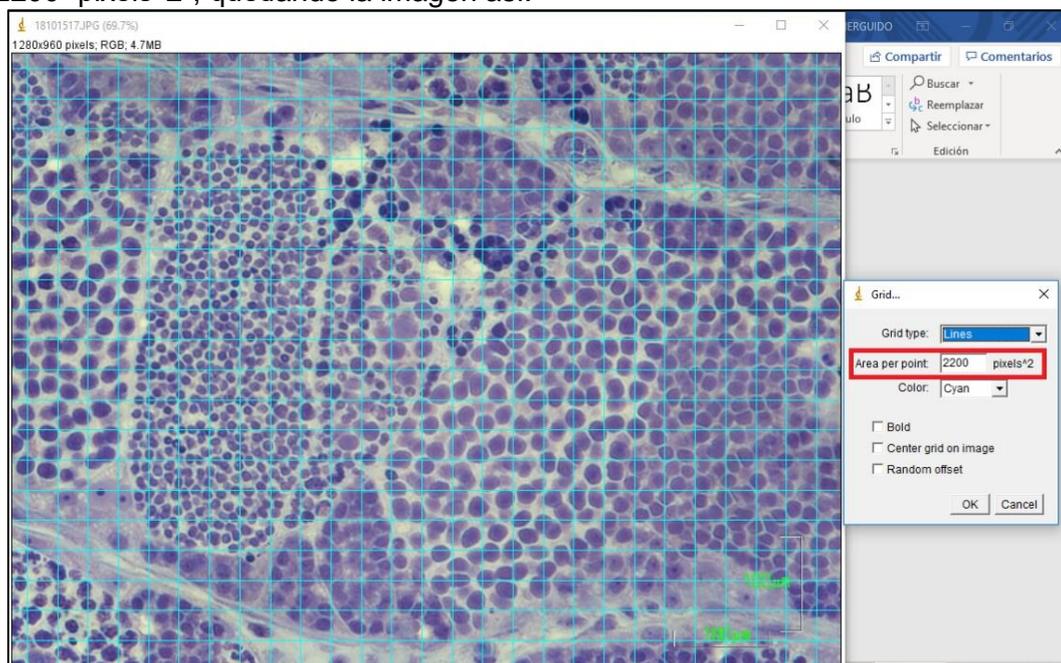
Posteriormente se incluyeron en resina Tecnovit 7100 en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (Cabanes, Castellón). Tras realizar cortes histológicos a 5 μ m en las mismas instalaciones, los cortes se tiñeron con azul de toluidina al 0,5% preparado de la siguiente forma:

- Azul toluidina O (C.I. 52040): 0,5g
- Tetraborato sódico anhidro ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$): 1g
- Agua destilada: 100mL

3.2 ANÁLISIS DE IMAGEN

Las láminas se observaron en un microscopio Nikon Eclipse, y se tomaron 10 fotografías de las gónadas de cada pez a un aumento de 40x. Posteriormente las imágenes se analizaron por medio del programa de software libre **ImageJ** junto a una extensión que se tuvo que descargar para realizar el conteo por diferentes tipos, en este caso, sobre las fotos de los cortes histológicos.

Al abrir la imagen, se mueve el ratón sobre la barra de menú hasta situarse encima de la pestaña de “Analyze”. Entonces se despliega una serie de comandos, se selecciona “Tools”, con otros comandos, entre los cuales está “Grid” (cuadrícula), el cual se escoge y aparece un cuadro. En él, se cambia el valor predeterminado de “Areas per point” de 15170 “pixels²” por 2200 “pixels²”, quedando la imagen así:

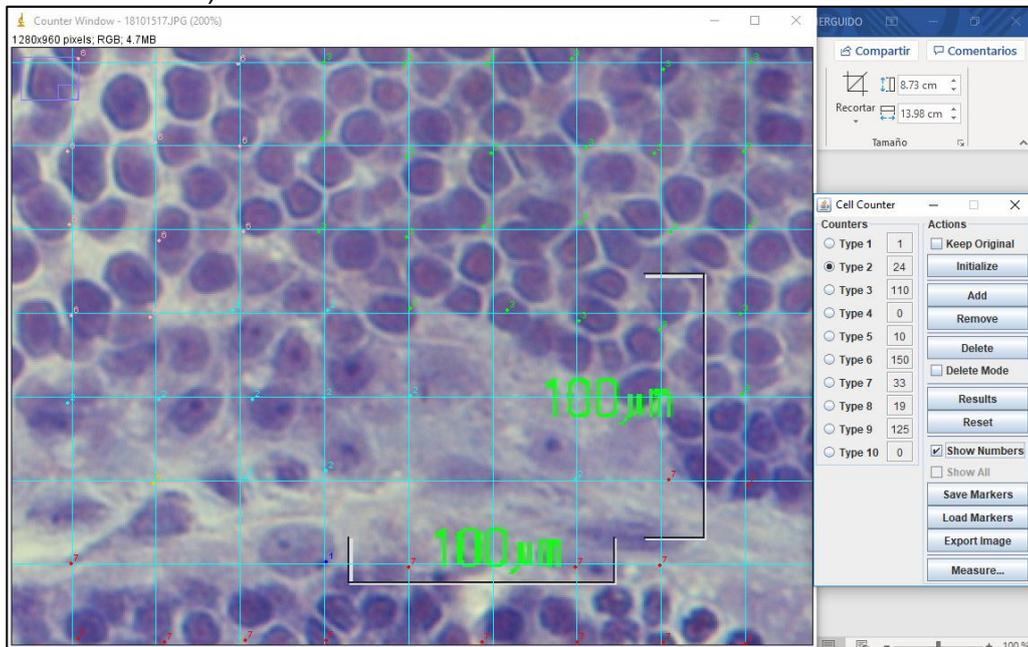


A continuación, sobre la barra del menú, se mueve a la pestaña de “Plugins”, con una serie de comandos, de los cuales se selecciona “Tools”. Dentro de ese comando hay otros comandos, y se escoge “Cell Counter” (que es la extensión que se tuvo que descargar previamente). Sale un cuadro con una serie de opciones, como adicionar o eliminar tipos (“Add” o “Remove”). Se aprieta sobre “Add” hasta tener, en el apartado de “Counters”, 10 tipos (“types”). Pulsamos sobre “Inizialize” y se procede al conteo de tipos celulares. Primero se selecciona el tipo que se desea para el conteo, y se pulsa con el ratón en las esquinas de los cuadros. Cada tipo celular tiene asociado un “Counter” (número) en este orden:

Counters	Tipo celular	Counters	Tipo celular
Type 1	Aund	Type 6	L/Z
Type 2	Adiff	Type 7	Paquiteno
Type 3	B	Type 8	Diploteno
Type 4	Lumen	Type 9	SPD
Type 5	Preleptóteno	Type 10	SPZ

Aund son las espermatogonias A indiferenciadas; Adiff, las espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; L/Z, leptoteno/zigoteno; SPD, espermátidas; y SPZ, espermatozoides. Las células apoptóticas y el tejido conjuntivo fueron excluidas del conteo.

En el conteo, cada "Type" aparece con su número correspondiente de un color diferente para evitar confusiones entre marcadores. Además, en "Counters", aparece al lado de cada tipo el número de veces que aparece a lo largo de la imagen. Todo lo que se acaba de mencionar aparece en la siguiente captura de pantalla (con la imagen ampliada a un 200% para ver mejor los marcadores):



Una vez obtenidos los resultados, se aprieta sobre "Results" para poder copiar la información obtenida en ese corte y exportarla a Excel. Con tal de facilitar la separación entre peces en este estudio, se ha creado documentos de Excel, cada uno asociado a un muestreo y su correspondiente tratamiento. Por ejemplo, hay un Excel exclusivamente dedicado a los peces del muestreo 4 y tratamiento hormonal de FSH, **S4 FSH**. En este caso, cada hoja corresponde a un pez de ese mismo muestreo (S4 FSH1, S4 FSH2...). Entonces, con los datos copiados del conteo que se ha realizado, se abre el Excel correspondiente al muestreo y, en la hoja correspondiente al pez, y se pegan en la fila correspondiente a la foto sobre la que se ha trabajado. De esta forma, y aplicando las fórmulas correspondientes, se consigue la suma de todos los tipos celulares en el pez y los porcentajes de cada uno de ellos.

Picture	A und	A diff	B	Lumen	Preleptóteno	L/Z	P	D	SPD	SPZ	Others	
18101517	1	24	172	0	10	128	0	0	125	0	205	460
18101559	0	9	238	0	1	154	0	0	50	0	138	452
18101651	0	73	77	0	2	120	0	10	179	0	268	461
18101740	5	17	158	2	0	91	0	8	12	0	267	293
18101933	0	24	220	0	1	58	0	4	27	0	237	334
18102028	3	18	140	0	91	129	0	6	29	0	159	416
18102112	3	17	204	0	11	64	0	4	202	0	241	505
18102204	1	18	187	1	54	79	0	48	59	0	200	447
18102248	0	33	136	0	0	190	0	15	107	0	181	481
11192606	0	27	120	2	163	95	0	0	67	0	133	474
Total	13	260	1652	5	333	1108	0	95	857	0	2029	4323
%	0.30	6.01	38.21	0.12	7.70	25.63	0.00	2.20	19.82	0.00		

4 RESULTADOS

Las anguilas que se sometieron a cuatro inyecciones de FSH (S4 FSH) alcanzaron mayor desarrollo gonadal que aquellas anguilas sometidas cuatro inyecciones de LH (S4 LH), tal como se puede ver en las siguientes tablas:

	SPGA _{Und}	SPGA _{diff}	SPGB	Lumen	Prelep	L/Z	P	D	SPD	SPZ
S4 FSH1	0.15	1.12	6.79	0.21	7.15	16.87	0.00	4.53	30.13	33.06
S4 FSH2	0.53	4.86	18.36	0.08	4.71	14.07	0.00	0.21	9.69	47.50
S4 FSH3	0.00	7.89	43.04	0.71	25.17	11.19	1.15	1.55	2.33	6.98
S4 FSH4	0.21	1.54	16.21	0.34	1.73	10.73	1.63	3.38	25.27	38.97
S4 FSH5	0.30	6.01	38.21	0.12	7.70	25.63	0.00	2.20	19.82	0.00
S4 FSH7	0.20	2.14	12.84	0.04	7.47	18.68	6.37	6.23	25.73	20.31
S4 FSH8	0.00	0.92	19.08	0.00	5.23	20.29	0.81	4.80	34.03	14.83
MEDIA	0.20	3.50	22.08	0.21	8.45	16.78	1.42	3.27	21.00	23.09

	SPGA _{Und}	SPGA _{diff}	SPGB	Lumen	Prelep	L/Z	P	D	SPD	SPZ
S4 LH1	0.23	71.73	13.84	8.91	0.00	1.42	0.13	0.00	0.87	2.87
S4 LH2	0.97	50.90	45.17	2.64	0.00	0.00	0.03	0.24	0.03	0.00
S4 LH3	2.13	79.71	15.16	2.35	0.00	0.00	0.34	0.31	0.00	0.00
S4 LH4	1.22	79.93	18.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.00	0.15
S4 LH5	1.82	76.24	20.22	0.00	0.00	0.00	1.64	0.07	0.00	0.00
S4 LH6	1.62	61.92	28.48	1.98	0.00	0.97	0.29	2.69	1.27	0.78
S4 LH7	2.77	72.64	19.67	4.22	0.00	0.26	0.26	0.17	0.00	0.00
S4 LH8	1.74	62.66	31.10	3.71	0.00	0.00	0.43	0.36	0.00	0.00
MEDIA	1.56	69.47	24.04	2.98	0.00	0.33	0.39	0.49	0.27	0.48

Tabla 8. Porcentaje de tipos celulares sexuales en cada uno de los peces del tratamiento con FSH (tabla superior) y LH (tabla inferior). Leyenda: SPGA_{Und} = Espermatogonias A indiferenciadas; SPGA_{diff} = Espermatogonias A diferenciadas; SPGB = Espermatogonias B; Lumen; Prelep = Preleptóteno; L/Z = Leptóteno/Zigoteno; P = Paquiteno; D = Diploteno; SPD = Espermátidas; SPZ = Espermatozoides.

Concretamente (tal y como se puede ver en la tabla anterior), la FSH logró inducir la espermatogénesis en todos los machos, llegando en varios casos a la espermiogénesis. Se observó prácticamente todos los tipos celulares, siendo los más abundantes (en este orden) los espermatozoides (SPZ), las espermatogonias tipo B (SPGB) y las espermátidas (SPD). Se llegó a detectar la presencia de SPZ en seis de siete machos del tratamiento (86%), siendo el grupo celular más abundante en tres de ellos (más del 33% de las células totales). Aparecieron SPD en todos los peces, siendo el grupo más abundante en dos machos, y con valores destacables en otros tres (en todos los casos, entre 19%-34% de las células totales). SPGB, presente también en todos los peces, fue el más abundante en los dos machos restantes del tratamiento. De este modo, se pudo deducir que el efecto de la FSH, a pesar del moderadamente alto porcentaje de SPGB, podía inducir meiosis y espermiogénesis.

El tratamiento de LH logró inducir la proliferación de SPGB en algunos casos, pero apenas indujo meiosis y espermiogénesis. De hecho, el tipo celular más abundante fue el SPGA_{diff}, y detrás se encontraba el SPGB, a bastante distancia. El primero se encontraba en porcentajes de entre 50%-80% de las células, mientras que el SPGB constituía el 13%-46% de las células. Se detectó la presencia de células meióticas en todos los peces, pero con un porcentaje inferior al 4% de todas las células sexuales. En cambio, sólo se pudo ver SPZ en tres machos, con un porcentaje muy bajo (debajo del 3% de todas las células). Con estos datos, se pudo deducir que la LH era incapaz de inducir meiosis y espermiogénesis o lo hacía, pero de modo muy residual.

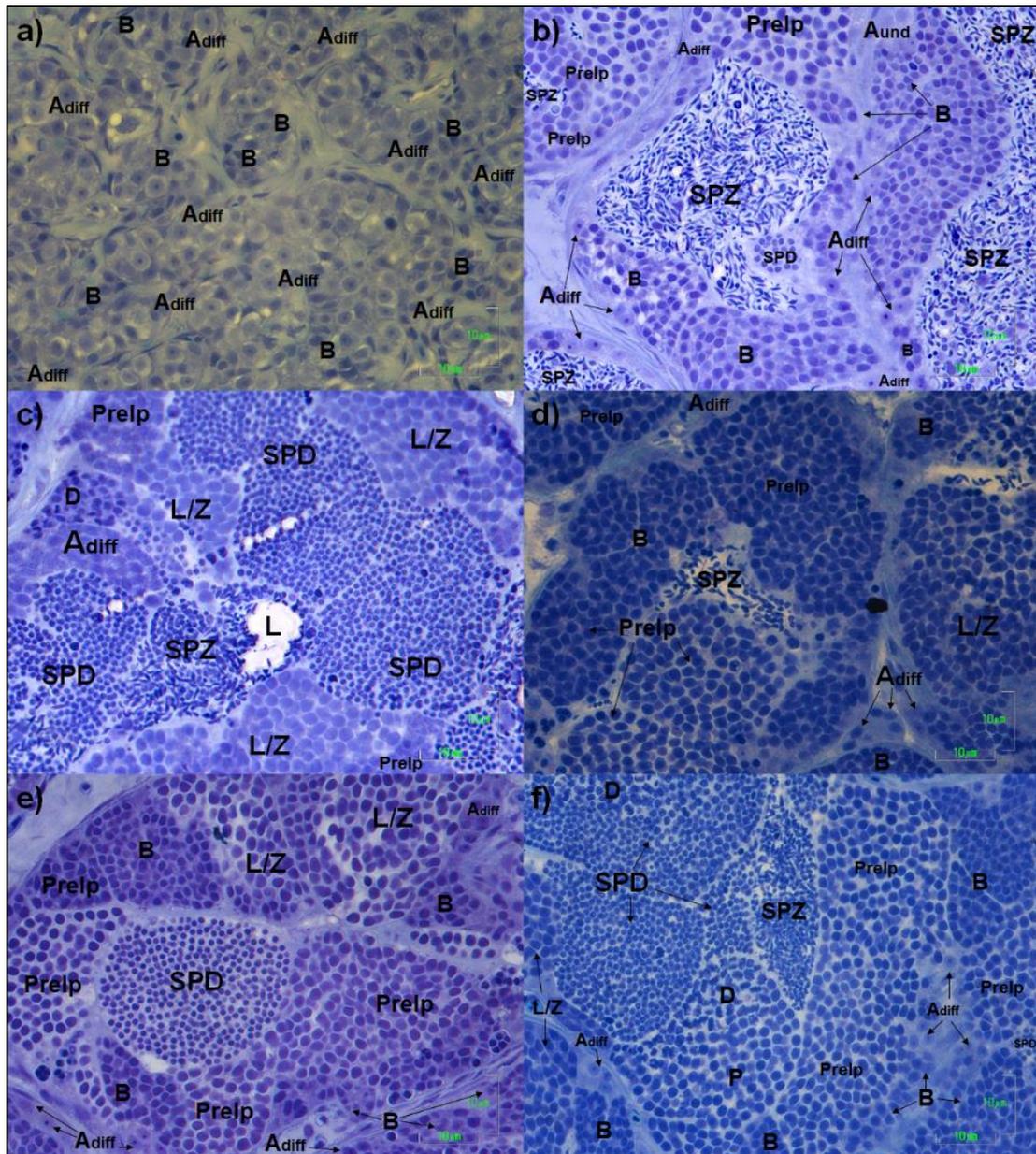


Figura 25. Cortes histológicos de los testículos de uno de los peces no tratados con hormonas (S0, foto a) y de peces tratados con FSH (de la b a la f). Leyenda: SPGA_{und} = Espermatozonias A indiferenciadas; SPGA_{diff} = Espermatozonias A diferenciadas; SPGB = Espermatozonias B; L = Lumen; Prelep = Preleptoteno; L/Z = Leptoteno/Zigoteno; P = Paquitenos; D = Diploteno; SPD = Espermátidas; SPZ = Espermatozoides.

En los testículos de las anguilas tratadas con FSH (Fig. 25B-25F) se pudo observar todas las fases celulares de la espermatogénesis, desde SPGA hasta SPZ. Pero, en rasgos globales, la FSH logró un buen desarrollo de las fases iniciales y avanzadas de la espermatogénesis, de manifiesto por un porcentaje destacable de SPGB, y también de espermátidas y espermatozoides, los cuales se encuentran en gran proporción, aunque en algún pez dicha proporción es baja (tal como se puede ver en la Fig. 27A y en la tabla 8).

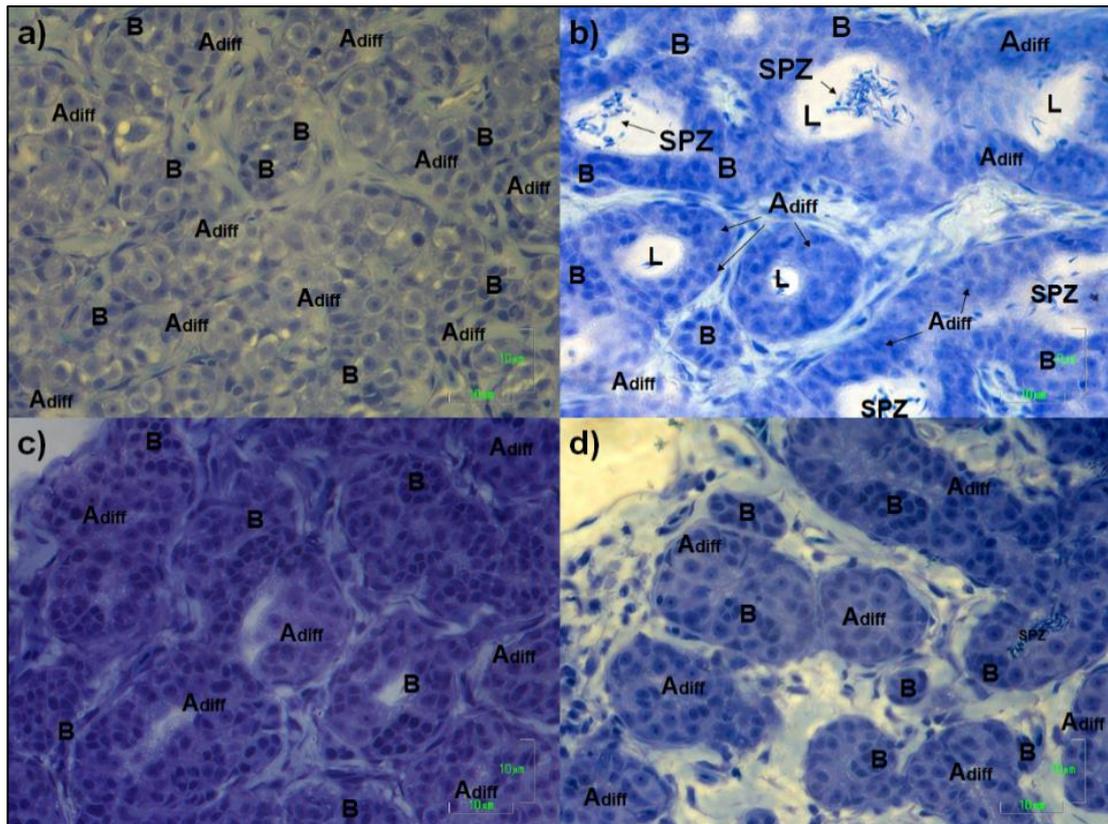


Figura 26. Cortes histológicos de los testículos de uno de los peces control (foto a, la misma que en la figura anterior) y de peces tratados con LH (de la b a la d).

El tratamiento de LH, por el contrario, ha logrado inducir únicamente las fases iniciales de la espermatogénesis (SPGA y SPGB), mientras que ha inducido de forma limitada la meiosis y espermiogénesis. Hay un porcentaje moderado de lumen, que en la mayor parte de individuos es superior a la suma de las células meióticas, SPD y SPZ juntos (Fig. 27B).

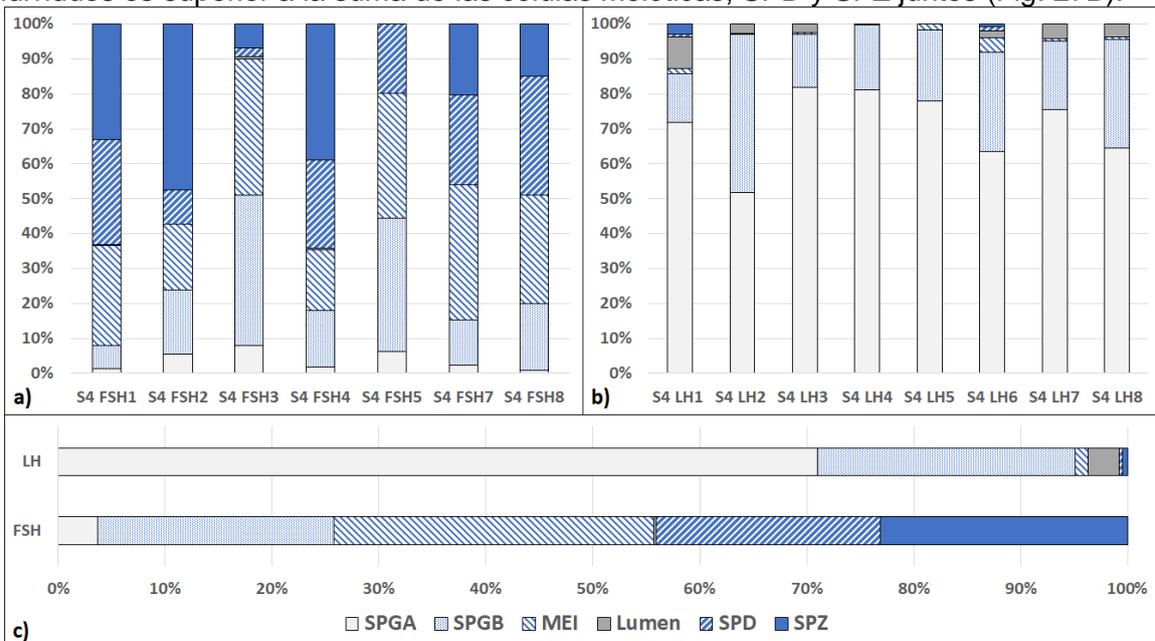


Figura 27. Porcentajes relativos de las fases de desarrollo de los testículos de las anguila tratadas con FSH (gráfica a) y con LH (gráfica b), y los valores medios de los porcentajes relativos de ambos tratamientos (gráfica c). SPGA = Espermatogonias A = SPGA_{und} + SPG_{diff}; SPGB = Espermatogonias B; MEI = Células meióticas = Prelep + L/Z + P + D; Lumen; SPD = Espermátidas; SPZ = Espermatozoides.

			DOSIS (µg/pez/semana)		TIEMPO (Semanas)	MACHOS CON SPZ (% del total)
			FSH	LH		
Peñaranda et al (2018)	EXP. 1	F	4 (cte)	----	9	37.5
		L	----	4 (cte)		0
		F/L	4 (W1-W4)	2 (W5-W11)	11	10
		F/LI	4 (W1-W11)	1 a 2 (W1-W4) 2 (W5-W11)		87.5
		FD/LI	4 (W1-W3) 4 a 1 (W4-W8) 1 (W9-W11)	1 a 2 (W1-W4) 2 (W5-W11)		87.5
	EXP. 2	Bajo	0.7 (cte)	1 (W4-W6)	12	42
		Medio	1.4 (cte)	2 (W7-W9)		57
		Alto	2.8 (cte)	6 (W10-W12)		100
	TFM	S4 FSH	6 (cte)	----	4	85.7
S4 LH		----	6 (cte)	37.5		

Tabla 9. Comparación entre los tratamientos de Peñaranda et al (2018) y los del presente estudio (TFM) por dosis de gonadotropinas recombinantes (FSH y LH), tiempo de tratamiento y porcentaje de machos espermiantes (que han alcanzado la espermiación) al final de cada tratamiento, en anguilas europeas (*Anguilla anguilla*).

5 DISCUSIÓN

La espermatogénesis en las anguilas, al igual que en otros vertebrados, es controlada endocrinológicamente. En los peces siempre se ha considerado que la FSH es inductor de la espermatogénesis, mientras que la LH lo es de la espermiogénesis, como en los salmónidos, según Swanson (1991). No obstante, tal y como se ha visto en el presente estudio, las gonadotropinas recombinantes han actuado de forma diferente, pues la FSH indujo todas las etapas de la espermatogénesis, mientras que la LH solo indujo la proliferación de espermatogonias, algo que se ha visto en pargo japonés (*Pagrus major*), según Gen et al (2003).

En los testículos de las anguilas tratadas con FSH recombinante se pudo observar todos los tipos celulares, desde las SPGA hasta SPZ (Fig. 25). Sin embargo, el efecto de dicha hormona en el desarrollo testicular varía en función de los individuos del tratamiento, ya que, si bien es cierto que la mayoría se llegó a inducir espermiogénesis, en algunos peces las células meióticas (desde los preleptotenos a diplotenos) y las SPGB eran más abundantes que SPZ y SPD. No obstante, este tratamiento logró que el 86% de los machos tuvieran espermatozoides en sus testículos, frente al 30% de machos de anguilas japonesas por tratamiento con FSH recombinante producida por un sistema baculovirus-larva de gusano de seda, según Kobayashi et al (2010).

La LH recombinante, en cambio, sólo llegó a inducir las fases iniciales de la espermatogénesis, con un elevado porcentaje de SPGA y SPGB (Fig. 26B-26D). Pudo inducir débilmente las fases posteriores de desarrollo gonadal, como SPZ (Fig. 26B), en algunos peces. También se detectó una presencia no menos importante de lumen (Fig. 26B), generalmente mayor que los tipos celulares posteriores a SPGB. Comparado con el estudio de Kobayashi et al (2010), mencionado en el anterior párrafo, la LH recombinante de este estudio induce un menor desarrollo de la espermatogénesis.

El estudio de Peñaranda et al (2018) fue realizado por el mismo grupo de investigación que el del presente estudio. Si, comparando ambos estudios (en los que se había empleado machos de anguila europea), se observa a los tratamientos con hormonas recombinantes por separado (tabla 9), los del presente estudio lograron inducir mayor número de machos de anguila europea con mayores dosis y menor tiempo (6µg/pez/semana durante 4 semanas) que en los del estudio de Peñaranda et al, con menores dosis durante más tiempo (4µg/pez/semana durante 9 semanas), pues la FSH indujo espermiación en el 37,5% de los machos y la LH no lo hizo en ningún macho. En el resto de los tratamientos de Peñaranda et al (con dosis variables tanto de FSH y LH, como se puede ver en la tabla 9), los resultados son muy variables, con 10-100% de machos espermiantes al final de sus respectivos tratamientos que, en todos los casos, se alcanzaron mucho más tarde (11-12 semanas) que en los tratamientos de nuestro estudio (4 semanas).

Aunque los porcentajes de machos espermiantes del presente estudio son buenas tanto en ambos tratamientos hormonales, hay que tener en cuenta (tal como se ha mencionado en el segundo párrafo de este apartado) el porcentaje de espermatozoides en los individuos sometidos a cada tratamiento (Fig. 27 y tabla 8): en el tratamiento con FSH, el porcentaje de espermatozoides (SPZ) en los testículos de los seis machos espermiantes oscila entre 7% y 47% sobre los tipos celulares de la espermatogénesis (desde SPGA_{und} hasta SPZ); en el tratamiento con LH, ese porcentaje en los testículos de sólo tres machos espermiantes era entre 0,15% y 2,9%. Por lo tanto, si se trata de obtener un mayor número de machos espermiantes y con mayor presencia de SPZ en sus testículos, sería conveniente tener en mente dos opciones: a dosis constante, más tiempo (en semanas de tratamiento); o manteniendo el tiempo de tratamiento, más dosis por inyección.

El anterior estudio de Ohta et al (2008), en el cual se usaron gonadotropinas recombinantes de carpa dorada (*Carassius auratus*) para determinar la influencia en la espermatogénesis de anguila japonesa, puso de manifiesto que la FSH recombinante (scFSH), por sí sola, pudo inducir la fase inicial de la espermatogénesis (sólo se mostraba SPGA y SPGB), mientras que la LH recombinante (scLH) llegó a inducir completamente la espermatogénesis (desde SPGA a SPZ). Es decir, las gonadotropinas recombinantes de ese estudio actúan en las mismas fases de desarrollo gonadal que en salmónidos, pero en diferentes fases con respecto a las hormonas empleadas en este estudio.

Existe una manera de determinar la función de FSH y la LH en la espermatogénesis en peces, como dice Miura y Miura (2011), la cual consiste en fijarse en las diferencias en los patrones de expresión de los receptores (LHr y FSHr) o las subunidades (FSH β mRNA y LH β mRNA) de las gonadotropinas a lo largo del desarrollo gonadal. En merluza europea (Candelma et al, 2018), los niveles de LHr eran más altos en la espermiogénesis, considerando así que la LH era la que inducía la espermiogénesis. En pargo japonés (Gen et al, 2003), los niveles de FSH β mRNA eran altos en la espermiogénesis, mientras que los niveles de LH β mRNA eran altos en las fases iniciales de la espermatogénesis, de modo que se definió la importancia de la FSH en la espermiogénesis y de la LH en la espermatogénesis. Los resultados del presente estudio contradicen los estudios anteriores, ya que la FSH parece crucial en la espermatogénesis, pero no lo fue así la LH.

6 AGRADECIMIENTOS

El autor de este estudio agradece a la tutora, Luz Pérez, su ayuda para poder llevar a cabo el desarrollo del estudio.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Anadón Álvarez, N., García-Rovés González, P., Mortera Piorno, H., Nores Quesada, C., Ocharan Larrondo, F. J., Segura González, A., . . . Torralba Burrial, A. (2007). Peces. En N. Anadón Álvarez, P. García-Rovés González, H. Mortera Piorno, C. Nores Quesada, F. Ocharan Larrondo, A. Segura González, . . . A. Torralba Burrial, *Libro Rojo de la Fauna del Principado de Asturias* (págs. 129-154). Oviedo: Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructuras (Gobierno de Asturias) y la Obra Social "la Caixa". Recuperado el 28 de Febrero de 2018, de <https://www.asturias.es/medioambiente/publicaciones/ficheros/Libro%20Rojo%20de%20la%20Fauna%20de%20Asturias.pdf>
- animalesextincion.es. (26 de Agosto de 2009). Recuperado el 15 de Febrero de 2018, de [animalesextincion.es](http://www.animalesextincion.es): [http://www.animalesextincion.es/articulo.php?id_noticia=000279&titulo=Anguila_comun_\(Anguilla_anguilla\)](http://www.animalesextincion.es/articulo.php?id_noticia=000279&titulo=Anguila_comun_(Anguilla_anguilla))
- Aoyama, J., Watanabe, S., Miller, M., Mochioka, N., Otake, T., Yoshinaga, T., & Tsukamoto, K. (Febrero de 2014). Spawning Sites of the Japanese Eel in Relation to Oceanographic Structure and the West Mariana Ridge. *PLoS ONE*, 9(2), 1-10. Recuperado el 11 de Diciembre de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/260254772_Spawning_Sites_of_the_Japanese_Eel_in_Relation_to_Oceanographic_Structure_and_the_West_Mariana_Ridge
- APROMAR. (2017). *La Acuicultura en España 2017*. Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). Recuperado el 28 de Febrero de 2018, de http://www.apromar.es/sites/default/files/2017/informe/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2017.pdf
- APROMAR. (2018). Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de http://www.apromar.es/sites/default/files/2018/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2018.pdf
- Asturiano, J., Jover, M., Pérez Igualada, L., & Barrera, R. (2004). Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. (I. Jauralde García, Ed.) *AquaTIC*(20), 51-78. Recuperado el 1 de Marzo de 2018, de http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/20_07.pdf
- Ávila Torres, J. M., Beltrán de Miguel, B., Cuadrado Vives, C., del Pozo de la Calle, S., Rodríguez Castilla, M. d., & Ruiz Moreno, E. (2009). Anguila. En V. de Santiago (Ed.), *La alimentación española características nutricionales de los principales alimentos de nuestra dieta* (1 (reimprimida) ed., Vol. 1, págs. 421-422). Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Recuperado el 1 de Marzo de 2018, de http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/anguila_tcm7-315685.pdf

- AXENA. (30 de Octubre de 2012). *El increíble viaje de la anguila europea*. Recuperado el 28 de Febrero de 2018, de AXENA: <http://blogueiros.axena.org/2012/10/30/el-increible-viaje-de-la-anguila-europea/>
- AZTI-Tecnalia, EKOLUR y el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal (UPV-EHU). (2008). *Plan de Gestión para la Recuperación de la Anguila Europea en la CAPV*. Gobierno Vasco, Diputación Foral de Bizkaia y Diputación Foral de Gipuzkoa, San Sebastián. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de http://www.euskadi.eus/contenidos/proyecto/plan_anguila/eu_def/adjuntos/Plan_anguila.pdf
- Baeza Ariño, R. (2015). *Roles of lipids and fatty acids through the spermatogenesis of European eel (Anguilla anguilla)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 18 de Julio de 2018, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/49988/Baeza%20-%20Roles%20of%20lipids%20and%20fatty%20acids%20through%20the%20spermatogenesis%20of%20European%20eel%20%28Anguilla%20ang....pdf?sequence=1>
- Candelma, M., Valle, L. D., Colella, S., Santojanni, A., & Cernevali, O. (Febrero de 2018). Cloning, characterization, and molecular expression of gonadotropin receptors in European hake (*Merluccius merluccius*), a multiple-spawning species. *Fish Physiol Biochem*, 44(3), 895-910. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10695-018-0479-z.pdf>
- Cano, F. G., Albors, O. L., & Florenciano, M. A. (8 de Agosto de 2009). *GÓNADAS, VEJIGA NATATORIA Y RIÑONES DE LOS PECES*. Recuperado el 21 de Marzo de 2018, de Universidad de Murcia - Facultad de Veterinaria: <http://www.um.es/anatvet/Documentos/Curso-Peces/pdfs/Gonadas-peces.pdf>
- Castelló Orvay, F. (1993). *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción* (Primera ed.). Barcelona: Publicacions Universitat de Barcelona. Recuperado el 10 de Marzo de 2018, de <https://books.google.es/books?id=hjwMNMgh1cQC&pg=PA133&lpg=PA133&dq=síncrono+desarrollo+gonadal&source=bl&ots=3ndls8OA5I&sig=sj2AkeS7rdgr9gaRi44RJLxQKGo&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjQu7CLtOLZAhUHOxQKHSVKDMUQ6AEILDAA#v=onepage&q=s%C3%ADncrono%20desarrollo%20gona>
- Cerdà, J., Chauvigné, F., González, W., Duncan, N., & Giménez, I. (2017). *Métodos combinados de administración de gonadotropinas para inducir la producción de esperma en machos de lenguado Senegalés*. Presentación PowerPoint, CSIC, IRTA-Institut de Ciències del Mar. Recuperado el 16 de Febrero de 2019, de <https://ptepa.es/wp-content/uploads/2017/08/2017-Jornada-PTEPA.pdf>
- Chaverri, G., J. Schneider, C., & H. Kunz, T. (16 de Diciembre de 2008). Mating System of the Tent-Making Bat *Artibeus watsoni* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Journal of Mammalogy*, 89(6), 1361-1371. Recuperado el 11 de Marzo de 2018, de http://www.upacificosur.org/Docentes/gchaverri/PDF/Chaverrietal2008_Matingsystem.pdf
- Clavero, M. (26 de Mayo de 2015). *Where the eel was: applying historical data to plan a species recovery*. Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de THE APPLIED ECOLOGIST'S BLOG:

<https://jappliedecologyblog.wordpress.com/2015/05/27/where-the-eel-was-applying-historical-data-to-plan-a-species-recovery/>

- Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. (2012). *Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN (Versión 3.1)* (Segunda ed.). Gland, Suiza: Servicio de Publicaciones de la UICN. Recuperado el 28 de Febrero de 2018, de <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-2001-001-2nd-Es.pdf>
- Cueto, J. M. (2016). *Control Hormonal de la Reproducción en Peces*. Universidad de Cádiz, Departamento de Biología (Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales). Recuperado el 8 de Febrero de 2019, de https://www.academia.edu/22364352/CONTROL_HORMONAL_DE_LA_REPRODUCCION_HORMONAL_EN_PECES
- de Almeida, F. L., Andersson, E., Mittelholzer, C., Karlsen, Ø., Taranger, G. L., & Schulz, R. W. (Agosto de 2011). Pituitary gonadotropin and testicular gonadotropin receptor expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during the first reproductive season: Effects of photoperiod modulation. *General and Comparative Endocrinology*, 173, 111-119. Recuperado el 15 de Marzo de 2019, de <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37475/1/pituitary.pdf>
- Díaz, E., Korta, M., Pórtoles, J., Monjo, R., Gaitán, E., Ribalaygua, J., . . . Chust, G. (Marzo de 2018). Eels of southern Europe under future climate change. (J. Franco, Ed.) *Revista de Investigación Marina*, 25(2), 46-49. Recuperado el 15 de Octubre de 2018, de https://www.azti.es/rim/wp-content/uploads/2018/03/RIM_25_2_baja.pdf
- FAO. (30 de Agosto de 2003). *Acuicultura: principales conceptos y definiciones*. Recuperado el 27 de Marzo de 2018, de FAO: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/aquaculture-defs.htm>
- FAO. (10 de Marzo de 2005). *Anguilla anguilla (Linnaeus, 1758)*. Recuperado el 14 de Diciembre de 2018, de FAO: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Anguilla_anguilla/en
- FAO. (21 de Noviembre de 2013). *Acuicultura*. Recuperado el 27 de Marzo de 2018, de FAO: <http://www.fao.org/aquaculture/es/>
- FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos*. Roma. Recuperado el 29 de Marzo de 2018, de FAO: <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>
- FAO e ICES. (2003). Report of the Thirteenth session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. Copenhagen, Denmark, 28-31 August 2001. *EIFAC Occasional Paper*(36), 62. Recuperado el 29 de Noviembre de 2018, de <http://www.fao.org/docrep/pdf/006/y4676e/y4676e00.pdf>
- Fernández Fipa, M. (Julio de 2011). *Características de la reproducción en peces*. Recuperado el 19 de Marzo de 2018, de Universidad Nacional de Callao: https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Julio_2011/IF_MARILUZ_FERNANDEZ_FIPA/CAP%20I%20Y%20II.PDF
- Firouz, E. (2005). Freshwater Fishes of Iran. En E. Firouz, & M. Briggs (Ed.), *The Complete Fauna of Iran* (págs. 257-290). Londres: I.B. Tauris & Co Ltd. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de <https://books.google.es/books?id=t2EZCScFXIoC>

- Fundación Observatorio Español de Acuicultura (FOESA). (2013). *Estrategia para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Española (EDSAE)*. Madrid. Recuperado el 21 de Julio de 2018, de http://www.mapama.gob.es/es/pesca/temas/acuicultura/estrategia_desarrollo_sostenible_marcadores_tcm30-77602.pdf
- Gen, K., Yamaguchi, S., Okuzawa, K., Kumakura, N., Tanaka, H., & Kagawa, H. (Marzo de 2003). Physiological roles of FSH and LH in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 77-80. Recuperado el 16 de Febrero de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1023/B%3AFISH.0000030480.97947.ba>
- GEOMAR. (26 de Diciembre de 2013). *The Fate of Eels*. Recuperado el 27 de Febrero de 2018, de GEOMAR: <https://www.geomar.de/en/news/article/aale/>
- Gómez-Juaristi, M., & Salvador, A. (21 de Diciembre de 2011). Obtenido de CSIC: http://digital.csic.es/bitstream/10261/107792/1/angang_v5.pdf
- Grupo de investigación "Fisiología y patología en acuicultura". (2016). *Control neuroendocrino de la diferenciación sexual, la pubertad y la reproducción en peces de interés en acuicultura: Implicaciones e interacciones entre los sistemas activina/inhibina y GnIH*. Memoria de actividades, Universidad de Cádiz, Vicerrectorado de Investigación, Cádiz. Recuperado el 23 de Marzo de 2018, de http://www.uca.es/recursos/doc/Investigacion/plan_propio/plan_propio_2016_2017/memoria_act_grupos_anp/1702674_1992016125520.pdf
- Gutiérrez Estrada, J. C. (2003). *Desarrollo y evaluación de modelos para la toma de decisiones: caracterización de la producción de anguilas (Anguilla anguilla L.) en sistemas intensivos*. Universidad de Córdoba, Departamento de Producción Animal. Córdoba: Universidad de Córdoba. Recuperado el 10 de Diciembre de 2018, de <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/356/22.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- Hassin, S., Claire, M., Holland, H., & Zohar, Y. (Diciembre de 2000). Early Maturity in the Male Striped Bass, *Morone saxatilis*: Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone Gene Expression and Their Regulation by Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue and Testosterone. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1691-1697. Recuperado el 21 de Febrero de 2019, de <https://academic.oup.com/biolreprod/article/63/6/1691/2723248>
- Higuchi, K., Gen, K., Izumida, D., Kazeto, Y., Hotta, T., Takashi, T., . . . Soyano, K. (Enero de 2017). Changes in plasma steroid levels and gene expression of pituitary gonadotropins, testicular steroidogenesis-related proteins and insulin-like growth factors during spermatogenesis of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 83(1), 35-46. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1007/s12562-016-1035-3>
- Holcik, J., & Ali Razavi, B. (1991). *New species of freshwater fish from the Iranian coast of the Caspian Sea*. FAO, Roma. Recuperado el 27 de Noviembre de 2018, de <http://www.fao.org/docrep/006/AD191E/AD191E01.htm>
- Hotta, K., Kaki, H., Nagaya, H., & Hayakawa, Y. (Febrero de 2008). Induction of spermatogenesis in Japanese eel by recombinant goldfish gonadotropins. *Fisheries Science*, 75(1), 137-144. doi:10.1007/s12562-008-0007-7

- Huang, H., Zhang, Y., Huang, W. R., Li, S. S., Zhu, P., Liu, Y., . . . Lin, H. R. (Junio de 2009). Molecular characterization of marbled eel (*Anguilla marmorata*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during artificially induced gonadal development. *General and Comparative Endocrinology*, 162(2), 192-202. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de <http://or.nsfc.gov.cn/bitstream/00001903-5/34951/1/1000001617571.pdf>
- IEO. (18 de Julio de 2016). *El IEO logra cerrar el ciclo biológico del atún rojo en cautividad por primera vez a nivel mundial*. Recuperado el 11 de Marzo de 2018, de Instituto Español de Oceanografía: http://www.ieo.es/documents/10640/38594/NP_180716_cicloatunrojo.pdf/a1296ccfd187-4738-8a69-adac43dbf601
- Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura. (2001). Principales enfermedades de los peces de cultivo. En H. Rodríguez Gómez, C. Vásquez Díaz, M. Villanueva Soto, H. Rodríguez Gómez, P. Victoria Daza, & M. Carrillo Avila (Edits.), *Fundamentos de acuicultura continental* (págs. 147-188). Bogotá, Distrito Capital de Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Recuperado el 22 de Septiembre de 2018, de http://digitool.gsl.com.mx:1801/webclient/StreamGate?folder_id=0&dvs=1537606190862~201
- Jacoby, D., & Gollock, M. (26 de Junio de 2014). *European Eel*. doi:10.2305
- JACUMAR. (2007). *Anguila Europea*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (ahora Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). Recuperado el 23 de Junio de 2018, de http://www.mapama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Anguila_Europea.pdf
- Kagawa, H., Tanaka, H., Ohta, H., Unuma, T., & Nomura, K. (Abril de 2005). The first success of glass eel production in the world: basic biology on fish reproduction advances new applied technology in aquaculture. *Fish Physiol Biochem*, 193-199. Recuperado el 10 de Octubre de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3233899>
- Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J., . . . Yamauchi, K. (Noviembre de 2008). Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by Drosophila S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology. *Biology of Reproduction*, 79(5), 938-946. Recuperado el 7 de Marzo de 2019, de <https://academic.oup.com/biolreprod/article/79/5/938/2557669>
- Kobayashi, M., Hayakawa, Y., Park, W., Banba, A., Yoshizaki, C., Kumamaru, K., . . . Sohn, Y. C. (Julio de 2010). Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), 379-386. Recuperado el 20 de Febrero de 2019, de <https://kundoc.com/pdf-production-of-recombinant-japanese-eel-gonadotropins-by-baculovirus-in-silkworm-.html>

- La Anguila del Mediterráneo. (20 de Mayo de 2014). *La Anguila*. Recuperado el 15 de Febrero de 2018, de La Anguila del Mediterráneo:
<http://www.laanguiladelmediterraneo.com/content/6-la-anguila>
- Lacerda, S. d., Costa, G. M., & de França, L. R. (1 de Octubre de 2014). Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 56-65. Recuperado el 15 de Marzo de 2018, de
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648014002512?via%3Dihub>
- Lasheras García, R. (5 de Noviembre de 2010). *Anguila Europea (Anguilla anguilla)*. Recuperado el 15 de Febrero de 2018, de Una ventana al Delta del Llobregat:
<http://unaventanaaldelta.blogspot.com.es/2010/11/anguila-europea-anguilla-anguilla.html>
- M. Luna, S. (20 de Julio de 2016). Recuperado el 1 de Marzo de 2018, de Fishbase:
<http://www.fishbase.org/>
- Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela. (28 de Marzo de 2011). *III.- Biología Aplicada: IV Ciclo Universitario - Tema 7: Anguicultura*. Recuperado el 25 de Febrero de 2018, de Malaterra - Grupo de Malacología Terrestre Aplicada - Universidad de Santiago de Compostela:
http://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/investigacion/grupos/malaterra/publicaciones/IV_Ciclo/Tema_7_Anguicultura.pdf
- Márquez Llano-Ponte, I. (2016). La Anguila (*Anguilla anguilla*): Estudio de los principales patógenos en poblaciones salvajes de los ríos de Asturias. *Tecnología Agroalimentaria. Boletín informativo del SERIDA*(18), 42-52. Recuperado el 2 de Marzo de 2018, de <http://www.serida.org/pdfs/6733.pdf>
- Mas Álvarez, B., & Barrera Orozco, R. (1989). *Producción de anguilas*. Madrid, España: DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION Y CAPACITACION AGRARIAS - MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION. Recuperado el 26 de Febrero de 2018, de
http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1989_14.pdf
- Mes, D., P. Dirks, R., & P. Palstra, A. (1 de Febrero de 2016). Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture*, 452, 367-372. Recuperado el 11 de Octubre de 2018, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848615302489>
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2018). *Estadísticas pesqueras*. Recuperado el 9 de Marzo de 2018, de Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente:
<http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-pesqueras/>
- Ministerio de la Presidencia. (7 de Noviembre de 2009). *Real Decreto 1669/2009*. Recuperado el 02 de Marzo de 2018, de Boletín Oficial del Estado:
<https://www.boe.es/boe/dias/2009/11/07/pdfs/BOE-A-2009-17652.pdf>
- Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino. (2012). *Plan de gestión de la anguila europea en España*. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, Secretaría General del Mar y Dirección General de Recursos Pesqueros y Acuicultura. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de

- https://www.mapa.gob.es/es/pesca/temas/planes-de-gestion-y-recuperacion-de-especies/plan%20de%20gesti%C3%B3n%20anguila_Espa%C3%B1a_tcm30-282062.pdf
- Minniti, F., Maisano, M., Giannetto, A., Mauceri, A., & Fasulo, S. (Septiembre de 2009). GTH I and GTH II in the pituitary gland of swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Italian Journal of Zoology*, 76(3), 269-278. doi:10.1080/11250000802110530
- Miura, C., & Miura, T. (Diciembre de 2011). Analysis of Spermatogenesis Using an Eel Model. *Aqua-BioScience Monographs*, 4(4), 105-129. Recuperado el 28 de Febrero de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/279413817_Analysis_of_Spermatogenesis_Using_an_Eel_Model
- Moberg, G., Watson, J., Doroshov, S., Papkoff, H., & Pavlick, R. (Octubre de 1995). Physiological evidence for two sturgeon gonadotrophins in *Acipenser transmontanus*. *Aquaculture*, 135, 27-39. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/223574547_Physiological_evidence_for_two_sturgeon_gonadotropins_in_Acipenser_transmontanus
- NatureGate - LuontoPortti. (27 de Noviembre de 2010). Obtenido de NatureGate - LuontoPortti: <http://www.luontoportti.com/suomi/es/kalat/anguila-comun>
- Ness & Beaulieu Fisheries Trust. (16 de Abril de 2010). *European Eel*. Recuperado el 14 de Marzo de 2018, de Ness & Beaulieu Fisheries Trust: <http://www.nessandbeaulieu.org.uk/european-eel/>
- Nóbrega, R., Leal, M., Cardoso, E., Batlouni, S., Bogerd, J., França, L., & Schulz, S. (2014). Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. En R. Nóbrega, *Spermatogonial stem cells and their endocrine and paracrine regulation in zebrafish* (págs. 29-62). Utrecht: Utrecht University. Recuperado el 15 de Febrero de 2019
- nuestromar. (6 de Enero de 2014). *Un poco de luz sobre la vida misteriosa de las anguilas*. Recuperado el 28 de Febrero de 2018, de [nuestromar.org](http://www.nuestromar.org/noticias/categorias/08-01-14/un-poco-luz-vida-misteriosa-anguilas):
- Nyuji, M., Selvaraj, S., Kitano, H., & Shiraishi, T. (Septiembre de 2012). Immunoreactivity of Gonadotrophs (FSH and LH Cells) and Gonadotropin Subunit Gene Expression in the Male Chub Mackerel *Scomber japonicus* Pituitary during the Reproductive Cycle. *Zoological Science*, 29(9), 623-629. doi:10.2108/zsj.29.623
- OCU. (21 de Diciembre de 2018). *Evolución de precios desde la Navidad de 2015*. Recuperado el 5 de Abril de 2019, de OCU: <https://www.ocu.org/alimentacion/alimentos/informe/navidad-precio-alimentos/evolucion-precios-desde-navidades-2015>
- Olivotto, I., Leu, M.-Y., & Blázquez, M. (2017). Life Cycles in Marine Ornamental Species - Fishes as a Case Study. En R. Calado, I. Olivotto, M. Planas Oliver, & G. Joan Holt (Edits.), *Marine Ornamental Species Aquaculture* (págs. 23-40). John Wiley & Sons.

- Recuperado el 28 de Octubre de 2018, de
https://books.google.es/books?id=V_ljDgAAQBAJ
- Ortiz, S. (9 de Junio de 2017). *Reproduction of Anguilla anguilla*. Recuperado el 18 de Octubre de 2018, de Fishbase:
<https://www.fishbase.de/Reproduction/FishReproSummary.php?ID=35&GenusName=Anguilla&SpeciesName=anguilla&fc=49&StockCode=45>
- Palstra, A., Mes, D., & Dirks, R. (Febrero de 2016). Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla Anguilla*). *Aquaculture*, 452, 367-372. Recuperado el 11 de Octubre de 2018, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848615302489>
- Peñaranda, D., Gallego, V., Rozenfeld, C., Herranz-Jusado, J., Pérez, L., Gómez, A., . . . Asturiano, J. (Febrero de 2018). Using specific recombinant gonadotropins to induce spermatogenesis and spermiation in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Theriogenology*, 107, 6-20. Recuperado el 18 de Julio de 2018, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17305368?via%3Dihub>
- Pesca. (Noviembre de 2017). Acuicultura marina. *Pesca*(196), 12-15. Recuperado el 18 de Septiembre de 2018, de http://www.revistapescaperu.org/images/revistas/2017/REVISTA_PESCA_NOVIEMBRE_2017.pdf
- Pinillos Bueno , M. (2003). *Esteroides sexuales en ciprínidos. Ciclo estacional, dinámica de liberación al agua, afinidad por las proteínas plasmáticas y sensibilidad olfatoria en la Tenca ("Tinca tinca", L.)*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Recuperado el 21 de Marzo de 2018, de <http://eprints.ucm.es/7304/1/T26960.pdf>
- Principado de Mónaco. (12 de Septiembre de 2014). *Propuestas para la inclusión de la anguila europea (Anguilla anguilla) en el Apéndice II de la CMS*. Recuperado el 14 de Febrero de 2018, de Convention on Migratory Species:
http://www.cms.int/sites/default/files/document/COP11_Doc_24_1_18_Rev.1_PropII_12_Anguilla_anguilla_%28Anguilla_europea%29_MCO_S.pdf
- Rahman, M., Ohta, K., Yamaguchi, A., Chuda, H., Hirai, T., & Matsuyama, M. (Marzo de 2003). Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1573-5168), 81-83. Recuperado el 19 de Febrero de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1023/B:FISH.0000030481.94719.a0>
- Rasines Pérez, I. (2013). *Reproducción en cautividad del lenguado senegalés (Solea senegalensis): inducción hormonal a la ovulación y obtención de huevos para la fecundación artificial*. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas, Oviedo. Recuperado el 22 de Marzo de 2018, de http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/21685/2/TD_inmaculadarasinespere z.pdf
- Rey-Vázquez, G. (2012). *Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol*. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Departamento de Biodiversidad y Biología

- Experimental, Buenos Aires. Recuperado el 8 de Febrero de 2019, de https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5165_ReyVazquez.pdf
- Ruiz, I., Fernández, A. B., & de Blas, I. (2003). El sistema inmune de los teleosteos (IV): Principales factores que afectan a la respuesta inmune. *AquaTIC*(19), 1-7. Recuperado el 22 de Septiembre de 2018, de https://www.researchgate.net/profile/Ignacio_De_Blas/publication/28148574_El_sistema_inmune_de_los_teleosteos_IV_Principales_factores_que_afectan_a_la_respuesta_inmune/links/5720caee08aefa6488a0494f/El-sistema-inmune-de-los-teleosteos-IV-Principales-facto
- Saborido-Rey, F., & Murua, H. (25 de Marzo de 2003). Female Reproductive Strategies of Marine Fish Species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33, 23-31. Recuperado el 11 de Marzo de 2018, de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/26868/1/murua.pdf>
- Salvador, A., & Gómez-Juaristi, M. (10 de Junio de 2017). *Anguila – Anguilla anguilla*. Recuperado el 19 de Febrero de 2018, de Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles: <http://www.vertebradosibericos.org/peces/comportamiento/angangco.html>
- Sánchez Suárez, I. (1994). Revisión Bibliográfica - Revisión Bibliográfica del Hospedador. En *Contribución al conocimiento de la parasitofauna de la anguila europea* (págs. 12-27). Madrid: Universidad Complutense de Madrid - Departamentos de Parasitología y Biología Animal. Recuperado el 7 de Marzo de 2018, de Universidad Complutense de Madrid: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/X/3/X3036201.pdf>
- Sanchís-Benlloch, P., Nocillado, J., Ladisa, C., Aizen, J., Miller, A., Shpilman, M., . . . Elizur, A. (Enero de 2017). In-vitro and in-vivo biological activity of recombinant yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) follicle stimulating hormone. *General and Comparative Endocrinology*, 241, 41-49. Recuperado el 21 de Febrero de 2019, de http://departments.agri.huji.ac.il/animal/staff/faculty_staff/sivan_berta/publications/Sanchis-Benlloch-2017-GCE-GTH-kingfish.pdf
- Schulz, R. W., Zandbergen, M. A., Peute, J., Bogerd, J., van Dijk, W., & Goos, H. J. (Julio de 1997). Pituitary Gonadotrophs are Strongly Activated at the Beginning of Spermatogenesis in African Catfish, *Clarias Gariepinus*. *Biology of Reproduction*, 57(1), 139-147. Recuperado el 18 de Febrero de 2019, de https://watermark.silverchair.com/biolreprod0139.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooa_n9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485ysgAAAlowggJWBgkqhkiG9w0BBwagggJHM_IICQwIBADCCAjwGCSqGSib3DQEHATAeBgIghkgBZQMEAS4wEQQMNJewQ174I_VP_M1HuAgEQgIICDatoENUG-VUfzWhFf4-C8yRd0VDhrUUX3C0fuROY
- Sébert, P., Vettier, A., Amérand, A., & Moisan, C. (2009). High Pressure Resistance and Adaptation of European Eels. En G. van der Thillart, S. Dufour, & J. C. Rankin, *Spawning Migration of the European Eel (Fish & Fisheries Series)* (Vol. 30, págs. 99-128). Springer Science + Business Media B.V. Recuperado el 12 de Marzo de 2019, de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4020-9095-0.pdf#page=105>
- Shimizu, A. (Septiembre de 2014). Reproductive Physiology of the Mummichog *Fundulus heteroclitus*—An Excellent Experimental Fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 7(3),

- 79-116. Recuperado el 21 de Febrero de 2019, de <http://www.terrapub.co.jp/onlinemonographs/absm/pdf/07/0703.pdf>
- Skupin, M. (20 de Marzo de 2006). *ADW: Anguilla anguilla*. Recuperado el Marzo de 2018, de Animal Diversity Web - University of Michigan: https://animaldiversity.org/accounts/Anguilla_anguilla
- Subdirección General de Medios de Producción Ganaderos. (2018). *Estimación de Precios de piensos: Noviembre 2018 (Semanas 45 a 48)*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Madrid. Recuperado el 21 de Diciembre de 2018, de https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/alimentacion-animal/informeestimacionpreciospiensossgmpgnoviembre2018_tcm30-499478.pdf
- Sustainable Eel Group. (Enero de 2018). *Quantifying the illegal trade in European glass eels (Anguilla anguilla): Evidences and Indicators*. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de Sustainable Eel Group: <https://www.sustainableeelgroup.org/wp-content/uploads/2018/02/SEG-Report-2018-1-V1-1.pdf>
- Suz Conejos, S. (2014). *Formulación de piensos sostenibles para la producción de *Seriola dumerili**. Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 7 de Marzo de 2018, de https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/45131/TFG_Sara%20Suz%20Conejos.pdf
- Tanaka, H. (Enero de 2015). Progression in artificial seedling production of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 81(1), 11-19. Recuperado el 15 de Marzo de 2019, de <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs12562-014-0821-z.pdf>
- Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Unuma, T., & Nomura, K. (Marzo de 2003). The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 493-497. Recuperado el 12 de Marzo de 2019, de <https://link.springer.com/article/10.1023/B:FISH.0000030638.56031.ed>
- Tejedor, J. L. (2011). Diversificación y sostenibilidad en la nutrición acuícola. En S. G. Mar, *Diversificación en acuicultura: Una herramienta para la sostenibilidad* (págs. 73-80). Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino (España). Recuperado el 17 de Septiembre de 2018, de https://www.mapama.gob.es/app/jacumar/recursos_informacion/Documentos/Publicaciones/270_guia_diversificacion_es.pdf
- Torres, A. (1 de Febrero de 2001). *The Reproduction Table*. Recuperado el 18 de Octubre de 2018, de Fishbase: https://www.fishbase.de/manual/fishbasethe_reproduction_table.htm
- Unidad de Investigación Marina de AZTI-Tecnalia, EKOLUR Asesoría Ambiental y el Departamento de Zoología y Biología Celular Animal de la Universidad del País Vasco. (2008). *Plan de Gestión para la Recuperación de la Anguilla Europea en la CAPV*. Gobierno Vasco, Diputación Foral de Bizkaia y Diputación Foral de Gipuzkoa, San Sebastián. Recuperado el 17 de Octubre de 2018, de

http://www.euskadi.eus/contenidos/proyecto/plan_anguila/eu_def/adjuntos/Plan_anguila.pdf

- Valdebenito, I. (2008). Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Archivos de medicina veterinaria*, 40(2), 115-123. Recuperado el 7 de Febrero de 2019, de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/amv/v40n2/art02.pdf>
- Vallejo, S. V., & González-Posada, J. O. (2007). *Acuicultura: La Revolución Azul*. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, OESA. Recuperado el 6 de Febrero de 2019, de http://www.industriaacuicola.com/biblioteca/Revolucion_azul/revolucion_azul.pdf
- Valverde, D. (5 de Noviembre de 2008). *La fecundación*. Recuperado el 11 de Marzo de 2018, de Pontificia Universidad Católica de Argentina: http://blog.uca.edu.ar/uca/common/grupo20/files/Fecundacion_y_Desarrollo_embionario.doc
- van Ginneken, V., & E Maes, G. (Noviembre de 2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction: A Literature Review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(4), 367-398. doi:10.1007/s11160-006-0005-8
- Vílchez Olivencia, M. (2014). *Efecto del régimen térmico en el desarrollo sexual de machos de anguila europea (Anguilla anguilla)*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado el 11 de Marzo de 2018, de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/35849/TESINA.pdf?sequence=1>
- W. Schulz, R., de França, L., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Henrique Nobrega, R., & Miura, T. (Febrero de 2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 390-411. Recuperado el 19 de Marzo de 2018, de https://www.researchgate.net/publication/24259875_Spermatogenesis_in_fish
- Waite, R., Beveridge, M., Brummett, R., Castine, S., Chaiyawannakarn, N., Kaushik, S., . . . Phillips, M. (Junio de 2014). *Improving productivity and environmental performance of aquaculture*. Obtenido de World Resources Institute: http://www.wri.org/sites/default/files/wrr_installment_5_improving_productivity_environmental_performance_aquaculture.pdf
- Yoshida, D., Nagae, M., Ito, F., & Soyano, K. (Septiembre de 2001). Molecular Cloning of cDNAs Encoding Pituitary Glycoprotein Hormone α , FSH β and LH β Subunits in Ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Zoological Science*, 18(7), 929-936. Recuperado el 22 de Febrero de 2019, de <https://bioone.org/journals/Zoological-Science/volume-18/issue-7/zsj.18.929/Molecular-Cloning-of-cDNAs-Encoding-Pituitary-Glycoprotein-Hormone-%CE%B1-FSH/10.2108/zsj.18.929.full>
- Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Espigares, F., & Molés, G. (Agosto de 2011). FSH Plasma Levels during Testicular Recrudescence of Precocious and Non Precocious Male European Sea Bass Using a Newly Developed Species Specific Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Elisa). *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 58-59. Recuperado el 18 de Febrero de 2019, de https://www.researchgate.net/publication/272163475_FSH_Plasma_Levels_during_Testicular_Recrudescence_of_Precocious_and_Non_Precocious_Male_European_Sea_Bass_Using_a_Newly_Developed_Species_Specific_Enzyme-linked_Immunsorbent_Assay_Elisa

Zhang, G., Wang, W., Su, M., & Zhang, J. (Enero de 2018). Effects of recombinant gonadotropin hormones on the gonadal maturation in the spotted scat, *Scatophagus argus*. *Aquaculture*, 483, 263-272. Recuperado el 20 de Febrero de 2019, de <https://kundoc.com/pdf-effects-of-recombinant-gonadotropin-hormones-on-the-gonadal-maturation-in-the-sp.html>