

**Trabajo de Fin de Grado en Biotecnología**

**Uso de diferentes tipos de gonadotropinas  
(purificadas vs recombinantes)  
para inducir la maduración sexual en  
machos de anguila europea**

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

Presentado por:

**Irene Pérez Albelo**

Dirigido por:

**Víctor Gallego Albiach**

**Juan F. Asturiano**

Curso académico: 2020/2021

Valencia, 20 de julio de 2021

**Título:** Uso de diferentes tipos de gonadotropinas (purificadas vs recombinantes) para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea

**Alumna:** Irene Pérez Albelo

**Tutor:** Dr. Víctor Gallego Albiach

**Cotutor:** Dr. Juan F. Asturiano

Valencia, 20 de julio de 2021

**Resumen:**

En las tres últimas décadas la anguila europea (*Anguilla anguilla*) ha experimentado una disminución de hasta un 99% en su captura en varias de las zonas que forman parte de su área de distribución geográfica, por lo que la cría en cautividad es considerada hoy en día una práctica clave para salvar a esta especie. En este sentido, obtener gametos de alta calidad es fundamental, así como avanzar en el estudio de nuevos tratamientos hormonales que tienen como finalidad mejorar los métodos actuales. Debido a esto, el objetivo de este estudio de investigación es, primero, evaluar el efecto de dos tratamientos hormonales (OVI, una  $\alpha$ -coriogonadotropina recombinante; y VET, una gonadotropina coriónica humana purificada de orín femenino) sobre el rendimiento reproductivo de los machos de anguila europea, y tras elegir la mejor hormona, comparar los efectos de tres dosis diferentes con el fin de reducir los costes de la maduración artificial.

Los resultados de este trabajo mostraron que el tipo de hormona utilizada (gonadotropina recombinante frente a purificada) afectó considerablemente a la evolución de la espermiación en los machos de anguila europea, y que la hormona recombinante (OVI) generó unos mejores resultados en términos de cantidad y calidad de esperma en la mayoría de las semanas de tratamiento, consiguiendo así un tratamiento efectivo para inducir la espermiación en esta especie. Por otro lado, en el experimento de dosis, los resultados indicaron que desde la dosis más baja hasta la más elevada (0,25 a 1,5 UI/g de pez) todos los tratamientos son capaces de inducir el proceso de espermiación completo. No obstante, fue necesaria una dosis semanal de 1,5 UI/g de pez de la hormona recombinante (OVI) para poder proporcionar una cantidad significativa (volumen y densidad) de muestras con una alta calidad (motilidad y velocidad) durante todo el tratamiento.

Finalmente, el análisis económico demostró que la hormona recombinante (OVI, 1,5 UI/g de pez) tuvo una mayor rentabilidad en comparación con los otros tratamientos, haciendo posible así obtener espermatozoides de alta calidad a un menor precio. Siguiendo esta línea, y teniendo en cuenta que en las primeras semanas de cualquier tratamiento hormonal no existe producción de espermatozoides de buena calidad, se hacen necesarias terapias hormonales a largo plazo que reduzcan el coste de los espermatozoides de alta calidad de la anguila europea.

**Palabras clave:** Anguila europea; Tratamientos hormonales; Hormona recombinante; Motilidad espermática

**Title:** Recombinant vs purified mammal gonadotropins as maturation hormonal treatments of European eel males

**Student:** Irene Pérez Albelo

**Supervisor:** Dr. Víctor Gallego Albiach

**Cosupervisor:** Dr. Juan F. Asturiano

Valencia, 20 July 2021

**Abstract:**

In the past three decades the European eel (*Anguilla Anguilla*) experienced up to 99% decline in recruitment in some parts of its distribution range, thus breeding in captivity is nowadays considered key to save this species. With this in mind, obtaining high quality gametes is fundamental, as is the ongoing study of new hormonal treatments in order to improve current methods. Therefore, the aim of this research study is to assess the effect of two hormonal treatments (OVI, a recombinant  $\alpha$ -choriogonadotropin; and VET, a human chorionic gonadotropin purified from female urine) on the reproductive performance of European eel males, and, after choosing the best hormone, to compare the effects of three different doses in order to cut the costs of artificial maturation.

Results indicate that the type of hormone used (recombinant vs purified gonadotropins) significantly affects the progression of spermiation in European eel males, and that the recombinant hormone (OVI) produces better results in terms of sperm quantity and quality in most of the weeks of the treatment, remaining thus an effective treatment to induce spermiation in this species. On the other hand, in terms of the doses experiment, results show that from the lowest to the highest dose (0.25 to 1.5 IU/g fish) all the treatments are able to induce the whole spermiation process. However, a weekly dose of 1.5 IU/g fish of recombinant hormone (OVI) is necessary in order to provide a notable amount (volume and density) of high quality (motility and velocity) samples throughout the treatment.

Finally, the economic analysis demonstrates that the recombinant hormone (OVI, 1.5 IU/g fish) has a greater profitability than the other treatments, making it possible to obtain high-quality sperm for a lower price. In this context and considering the fact that in the first few weeks of any hormonal treatment there is no high-quality sperm production, long-term hormonal therapies are necessary in order to lessen the cost of high-quality European eel sperm.

**Key words:** European eel; Hormone treatments; Recombinant hormone; Sperm motility

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutor Víctor por su guía, consejos e inmensa paciencia durante la realización de este trabajo. Gracias también a mi cotutor Juan Asturiano por su ayuda, y a Iraida por ser mi orientadora en el laboratorio.

Por otra parte, quisiera agradecerle a mi familia el continuo apoyo aún a pesar de la distancia. También a Emma por su amistad y compañía.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Rentabilidad de los tratamientos hormonales del experimento 1 (OVI y VET; 1,5 UI/g de pez) y del experimento 2 (OVI<sub>1,5</sub>: 1,5 UI/g de pez; OVI<sub>0,75</sub>: 0,75 UI/g de pez; y OVI<sub>0,25</sub>: 0,25 UI/g pez) en relación a la inversión económica y la producción de esperma de alta calidad (Clase III)

## ÍNDICE DE FIGURAS

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

**Figura 2.** Ejemplo de inducción hormonal para la maduración de machos y hembras de anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Ohta *et al.*, 1997)

**Figura 3.** Inyección semanal de la gonadotropina coriónica humana recombinante (hCGrec)

**Figura 4.** Diagrama con las diferentes dosis de la hormona recombinante usadas en el 2do experimento

**Figura 5.** Clasificación de las muestras según el porcentaje de espermatozoides móviles

**Figura 6.** Parámetros de producción de esperma de los diferentes tratamientos

**Figura 7.** Parámetros de calidad espermática de los diferentes tratamientos

**Figura 8.** Porcentaje de volumen espermático de cada clase (I-III) en cada semana de los tratamientos con A) OVI y B) VET

**Figura 9.** Parámetros de producción de esperma según las diferentes dosis de OVI

**Figura 10.** Parámetros de calidad espermática de las diferentes dosis de OVI

**Figura 11.** Porcentaje de volumen espermático de cada clase (I-III) en cada semana según las diferentes dosis de OVI: A) OVI<sub>1.5</sub>, B) OVI<sub>0.75</sub> y C) OVI<sub>0.25</sub>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

hCG: Gonadotropina coriónica humana

hCGrec: Gonadotropina coriónica humana recombinante

OVI: Hormona  $\alpha$ -coriogonadotropina recombinante

VET: Hormona gonadotropina coriónica humana purificada

MOT: Motilidad total

pMOT: Motilidad progresiva

VCL: Velocidad curvilínea

VSL: Velocidad rectilínea

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ESPECIE.....	1
1.2 AMENAZAS, COMERCIO Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA .....	2
1.3 EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN EN CAUTIVIDAD.....	3
1.4 TRATAMIENTOS HORMONALES PARA INDUCIR LA MADURACIÓN SEXUAL .....	4
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>6</b>
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	6
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL .....	6
3.2.1 EXPERIMENTO 1: GONADOTROPINAS PURIFICADAS Y RECOMBINANTES .....	6
3.2.2 EXPERIMENTO 2: DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE .....	7
3.3 RECOLECCIÓN DE SEMEN Y MUESTREO .....	7
3.4 EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y PARÁMETROS CINÉTICOS .....	8
3.5 ANÁLISIS ECONÓMICO .....	8
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	8
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>9</b>
4.1 EXPERIMENTO 1: GONADOTROPINAS PURIFICADAS VS RECOMBINANTES .....	9
4.2 EXPERIMENTO 2: DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE .....	11
4.3 ANÁLISIS ECONÓMICO .....	14
<b>5 DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
5.1 GONADOTROPINAS PURIFICADAS Y RECOMBINANTES .....	15
5.2 DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE .....	17
5.3 ANÁLISIS ECONÓMICO .....	18
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>21</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie catádroma con un ciclo de vida bastante peculiar. Es una especie migratoria que vive en aguas dulces la mayor parte de su vida y se dirige al mar para reproducirse, por lo que a lo largo de su vida realiza una migración transoceánica de miles de kilómetros en la cual, durante su transcurso, pasa por una fase de crecimiento e incluso varias metamorfosis (Figura 1). Este curioso y complicado proceso reproductivo convierte a la especie en un interesante modelo para el estudio de mecanismos regulatorios implicados en la fisiología del animal y su reproducción (Asturiano, 2020).

Las 19 especies que conforman el género *Anguilla* se distribuyen en los Océanos Pacífico, Índico y Atlántico. En el caso de la anguila europea, su área de distribución se extiende por el Mar Mediterráneo y costas del Océano Atlántico que abarcan desde Marruecos a Noruega (Van Ginneken *et al.*, 2005). Es una especie capaz de colonizar cualquier ecosistema acuático siempre y cuando esté lógicamente conectado con el mar (lagos, ríos, arroyos, etc.).

La anguila europea comienza su vida en el Mar de los Sargazos. Gracias a la incubación en laboratorio de larvas tempranas adquiridas en esta zona, se ha conseguido observar las diferentes fases larvarias. Dichas larvas viajan por el Océano Atlántico hasta Europa impulsadas por la Corriente del Golfo. El tiempo que tardan en cruzar el océano es de unos meses, durante el que las larvas sufren un proceso de metamorfosis en el que obtienen la forma corporal característica de las anguilas. En este estadio de sus vidas las anguilas no tienen pigmentación, y se denominan angulas o “glass eels”. Éstas siguen su migración acercándose a las costas y estuarios mientras van ganando pigmentación. Posteriormente irán adoptando una pigmentación amarilla en su zona ventral, obteniendo el nombre de anguilas amarillas, y por entonces ya se habrán asentado en lagos o ríos empezando su etapa sedentaria y de crecimiento de un número variable de años según el sexo y la zona geográfica (Rozenfeld, 2019). Tras superar esta fase de crecimiento sufrirán una vez más un proceso de metamorfosis adquiriendo un color plateado, convirtiéndose en “silver eels”. Este cambio, llamado “silvering”, es un proceso relacionado con la maduración sexual que prepara a las anguilas para la migración oceánica hacia el Mar de los Sargazos (Aroua *et al.*, 2005). En esta preparación los ojos aumentarán de tamaño y el tracto digestivo degenerará puesto que durante la migración las anguilas no se alimentan. La migración que emprenderán está considerada una de las más largas del reino animal, llegando a los 5000 km si se considera la ruta más directa.



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

Esta especie es vulnerable a un gran número de amenazas durante su complejo ciclo de vida. La modificación de su hábitat debido al impacto humano, como la construcción de barreras a lo largo de su ruta migratoria, los cambios en las condiciones de los océanos, etc. No obstante, el mayor peligro al que se enfrenta son sus capturas masivas. La captura y engorde en piscifactorías constituye el 90% de la producción de esta industria y se basa mayoritariamente en la captura de anguilas salvajes en el estadio de “glass-eel” (Richards *et al.*, 2020).

## 1.2 AMENAZAS, COMERCIO Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA

La anguila europea es una especie considerada muy importante para la Acuicultura europea, y es sumamente apreciada tanto en el mercado europeo como en el asiático. Su consumo en la gastronomía local se extiende a países como Holanda, Dinamarca y Suecia, así como a países del Mediterráneo como Italia, Francia o España, y en gran parte a países asiáticos, donde es además un producto muy demandado.

No obstante, su actual producción aún consiste en el engorde de anguilas capturadas en el medio natural debido al hecho de que todavía no es posible reproducir anguilas en cautiverio. Esto supone un gran problema, ya que esta especie se reproduce solamente una vez en su vida. Asimismo, en la actualidad su hábitat natural se ha visto bastante deteriorado debido a la contaminación y construcciones humanas que le impiden acceder a ciertos ambientes de agua dulce. Estos factores junto a prácticas como la sobrepesca, o simplemente cambios en las condiciones de los océanos, han producido un gran descenso poblacional (Asturiano, 2020). Y es que en las últimas décadas se ha observado una alarmante disminución en el número de anguilas europeas salvajes que realizan su migración desde Europa y norte de África al Océano Atlántico para su desove. Esto ha llevado a la especie a ser incluida en la lista roja de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) en nivel de peligro crítico.

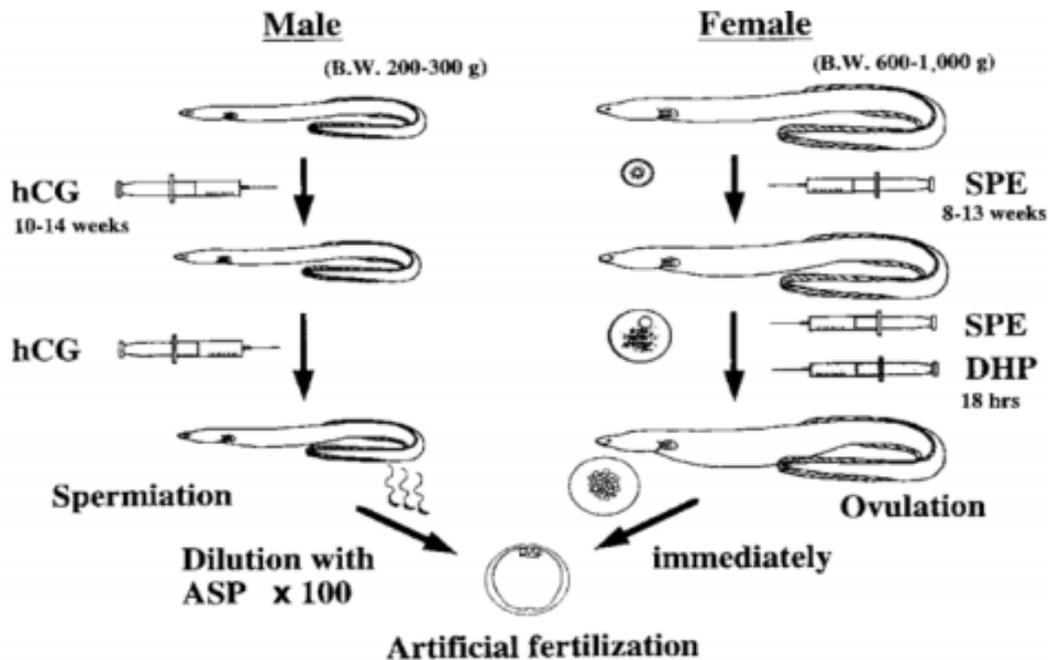
A pesar de este declive poblacional, la población de anguilas salvajes todavía es el principal sustento de la industria acuícola, la cual se basa en la captura de angulas durante los meses de otoño e invierno, y las cuales posteriormente son engordadas hasta alcanzar el tamaño comercial (Politis *et al.*, 2017). La problemática reside en que este recurso natural es limitado y su captura ha caído drásticamente durante estos últimos años, y presentando la necesidad de regular seriamente las capturas si se quiere proteger a la especie. La captura de angulas ha pasado a convertirse en un sistema no sostenible y es necesario reducir la extrema dependencia de la industria de la población salvaje. Es por esto por lo que se hace sumamente necesario explorar nuevos protocolos y técnicas que permitan reproducir esta especie en cautividad.

### **1.3 EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN EN CAUTIVIDAD**

Como se ha comentado en el anterior apartado, la reproducción y cría en cautiverio se postula como una prometedora alternativa a la captura de anguilas silvestres. Su desarrollo y puesta en práctica facilitaría el suministro a las piscifactorías de anguilas, e incluso podría ayudar a repoblar zonas donde esta especie tenía su hábitat en el pasado. No obstante, es bastante común que en especies comúnmente comercializadas existan disfunciones reproductivas que dificulten la correcta producción de óvulos fertilizados, o que deriven una insuficiente producción de volumen de esperma, etc. Siguiendo esta línea, también es frecuente que en especies de peces donde los machos completan su espermatogénesis y espermiación en cautividad, el volumen de esperma de calidad sea reducido. Es entonces cuando los tratamientos hormonales que utilizan hormonas exógenas a las especies a tratar entran en juego con el fin de paliar estas carencias reproductivas (Mylonas *et al.*, 2017).

Aunque en algunas especies de peces la reproducción en cautividad puede ser controlada exclusivamente por factores ambientales, existen ocasiones en las que es imposible simular las condiciones ambientales en las que ocurre la maduración sexual (es decir, imitar la profundidad, presión, temperatura, migración, etc.), por lo que en este caso el uso de hormonas exógenas es la única forma eficaz de inducir la reproducción (revisado por Mylonas *et al.*, 2010, 2017). Este es el caso de la anguila, ya que no es capaz de madurar sexualmente en cautiverio de forma espontánea, y por tanto la maduración de machos y de hembras debe ser inducida mediante tratamientos hormonales (Asturiano *et al.*, 2005; Lokman *et al.*, 2016; Ohta *et al.*, 1997; Sorensen y Winn, 1984) (Figura 2).

Dentro de esta misma línea, cabe destacar que el tipo de hormonas utilizadas, los protocolos de administración y los procedimientos de adquisición de gametos lógicamente pueden variar dependiendo de la biología de la reproducción de cada especie. Asimismo, es de especial importancia comprender el control endocrino de la gametogénesis, la maduración y el desove del animal para asegurar un óptimo tratamiento en la especie (Mylonas *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Ejemplo de inducción hormonal para la maduración de machos y hembras de anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Ohta *et al.*, 1997)

#### 1.4 TRATAMIENTOS HORMONALES PARA INDUCIR LA MADURACIÓN SEXUAL

En el caso de los machos de anguila europea, la gonadotropina coriónica humana (hCG) ha sido la hormona más utilizada para lograr la espermiación, habiendo sido administrada a los animales incluso en varios formatos (Gallego *et al.*, 2012). La hCG es una hormona glicoproteica presente en mamíferos y que ha sido ampliamente utilizada como herramienta en numerosas investigaciones sobre procesos biológicos en peces. Cuenta con una serie de rasgos que la hacen atractiva como su larga vida media, su gran afinidad por receptores, su buena disponibilidad en el mercado, precio asequible, etc. Esta hormona ha demostrado tener prometedores efectos en la manipulación reproductiva en peces que llegan hasta la inducción del desove (Zhong *et al.*, 2014).

No obstante, en los primeros estudios sobre la maduración sexual en anguila, que se remontan a la mitad del siglo XX, esta buscada maduración gonadal en machos solía ser inducida por inyecciones intraperitoneales de orina de mujeres embarazadas (Fontaine, 1936). Fue a finales de siglo cuando varias empresas consiguieron aislar la hCG de la orina femenina, por lo que la inducción de la espermiación en esta especie se convirtió en un proceso mucho más simple y estandarizado (Dollerup y Graver, 1985; Khan *et al.*, 1987; Pérez *et al.*, 2000).

Los siguientes estudios, ya de principios del siglo XXI, sirvieron para desarrollar y perfeccionar estos tratamientos hormonales basados en hCG purificada. Se buscaba optimizar la producción y la calidad del esperma mediante inyecciones en la zona intraperitoneal de la anguila con una frecuencia semanal (1,5 UI/g de pez) (Asturiano *et*

*al.*, 2006). Sin embargo, el problema de disponibilidad de hCG en su forma purificada en el mercado y la dificultad añadida de la limitada duración del periodo de espermiación en anguilas, se tradujo en la necesidad de desarrollar nuevos estudios que abordaran el uso de hormonas alternativas (revisado por Asturiano *et al.*, 2020).

En este contexto, las gonadotropinas recombinantes humanas (hCGrec, producidas por tecnología de ADN recombinante) se convirtieron en una alternativa eficaz que en los últimos años ha dado buenos resultados en cuanto a volumen de esperma, densidad, motilidad y parámetros cinéticos (Gallego *et al.*, 2012). Ahora bien, cabe destacar que la efectividad de los tratamientos que se basan en hCGrec puede depender del lote de hormonas utilizado. Es por ello por lo que a veces es posible encontrar grupos de animales en los que mientras la maduración gonadal sí que ocurre, los parámetros relacionados con la calidad del esperma (como pueden ser motilidad y velocidad) no son lo suficientemente buenos para propósitos referidos a la acuicultura.

Siguiendo esta línea, recientemente han visto la luz nuevos estudios en los que se utilizan gonadotropinas recombinantes, pero esta vez nativas de la anguila europea, aunque el volumen resultante de esperma y los datos de motilidad fueron demasiado bajos como para proseguir con un estudio de fertilización posterior (Peñaranda *et al.*, 2018). Además de estos pobres resultados, es preciso destacar que la producción de la hormona nativa es un proceso bastante complicado que suele ser llevado a cabo principalmente por empresas, implicando esto que el coste económico que conlleva la adquisición de este tipo de hormonas sea prohibitivo para muchos equipos de investigación de este campo.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo principal del presente trabajo, enmarcado dentro del proyecto europeo IMPRESS “*Improved production strategies for endangered freshwater species*”, fue evaluar diferentes tratamientos hormonales para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea. Para ello se llevaron a cabo dos experimentos distintos:

- i. En el primer experimento, el objetivo fue evaluar el efecto de dos tratamientos hormonales (gonadotropinas de mamífero purificadas y gonadotropinas recombinantes) en el rendimiento reproductivo de machos de anguila europea.
- ii. Tras escoger el tratamiento hormonal con mejores resultados, el segundo experimento tuvo como objetivo comparar el efecto de tres dosis diferentes de la hormona (1,5, 0,75 y 0,5 UI/g de pez).

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Las anguilas macho para este estudio se obtuvieron de la granja acuícola Valenciana de Acuicultura, S.A. (Puzol, Valencia). Fueron instaladas en el Laboratorio de Acuicultura de la Universidad Politècnica de València, donde se distribuyeron en diferentes acuarios, todos ellos equipados con sistemas de recirculación y termostatos, además de encontrarse cubiertos para reducir la exposición a la luz y así reducir el estrés que esto pudiera ocasionar a los animales. Las anguilas fueron aclimatadas gradualmente al agua marina (salinidad  $37 \pm 0,3$  g/l) durante el transcurso de una semana.

Durante el periodo experimental las anguilas fueron semanalmente anestesiadas con benzocaína (60 ppm) para así pesarlas y poder calcular la dosis individual que debía administrarse de la hormona.

Cabe destacar que las anguilas no fueron alimentadas a lo largo del experimento. La dieta proporciona a los peces los ácidos grasos necesarios para su metabolismo, sin embargo, en especies como la anguila, en la que la reproducción viene asociado a un periodo de privación de alimento, este ayuno provoca que el perfil de ácidos grasos de la anguila cambie y se produzca la deposición, elongación, desaturación y oxidación de dichos ácidos grasos. Estos cambios se presentan como vitales para las necesidades que presenta la anguila en esta etapa de su ciclo de vida (Turchini *et al.*, 2006).

#### **3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL**

##### **3.2.1 EXPERIMENTO 1: GONADOTROPINAS PURIFICADAS Y RECOMBINANTES**

Veinte anguilas macho adultas (con un peso medio corporal de  $107,9 \pm 1,6$  g) fueron distribuidas aleatoriamente en dos acuarios de 150 litros de capacidad, de modo que 10 machos quedaron destinados para cada tratamiento. El primer tratamiento consistió en el uso de la hormona OVI, el segundo tratamiento de la hormona VET.

OVI, es una  $\alpha$ -coriogonadotropina recombinante que es producida en las células ováricas de hámster chino mediante la técnica de DNA recombinante (hormona comercializada por Ovitrelle, Merck S.L., Madrid). Por otro lado, VET es una gonadotropina coriónica humana purificada (comercializada por Veterin Corion, Divasa-Farmavic S.A., Barcelona). La hormona VET fue disuelta en suero salino (NaCl 0,9%) para así conseguir una concentración de 1 UI/ $\mu$ l de suero. En el caso de la hormona OVI, esta también fue disuelta para obtener una concentración similar.

Ambas hormonas fueron administradas mediante una inyección intraperitoneal de frecuencia semanal durante 25 semanas consecutivas a las respectivas anguilas reservadas para cada tratamiento, siendo la dosis de 1,5 UI/g de pez (Figura 3).



**Figura 3.** Inyección semanal de la gonadotropina coriónica humana recombinante (hCGrec)

### 3.2.2 EXPERIMENTO 2: DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE

Tras elegir a la gonadotropina recombinante (OVI) como la mejor hormona en cuanto a calidad del esperma y rentabilidad, 30 machos adultos de anguila fueron distribuidos aleatoriamente en tres acuarios de 150 litros de capacidad. De esta forma, las anguilas quedaron distribuidas en tres grupos de 10 machos, recibiendo cada grupo una dosis diferente del tratamiento hormonal como queda plasmado en la Figura 4.



**Figura 4.** Diagrama con las diferentes dosis de la hormona recombinante usadas en el 2do experimento

La hormona OVI utilizada fue diluida con una ratio 1:1 con suero salino (NaCl 0,9%). En cuanto a la administración de las dosis, estas fueron inyectadas también de forma intraperitoneal y semanalmente durante 12 semanas.

### 3.3 RECOLECCIÓN DE SEMEN Y MUESTREO

La recolección de las muestras de esperma se efectuó semanalmente mediante la aplicación de una ligera presión en la zona abdominal, y siempre pasadas unas 24 horas desde la administración de la hormona (según protocolo descrito por Pérez *et al.*, 2000). Se tuvo especial cuidado durante el proceso de recolección para evitar la posible contaminación con heces, orín o agua salada.

Posteriormente, las muestras fueron diluidas con una ratio 1:9 (esperma:extender) en medio P1 (en mM: 125 NaCl, 20 NaHCO<sub>3</sub>, 2,5 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1 CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 30 KCl según Peñaranda *et al.*, 2010a). A continuación, fueron guardadas en tubos Falcon de 15 mL en una nevera a 4 °C hasta el momento de la realización de los análisis cinéticos, los cuales se llevaron a cabo en las siguientes dos horas desde la recolección.

El volumen de esperma fue medido utilizando tubos graduados y la densidad del esperma fue calculada mediante el software CASA (Gallego *et al.*, 2013).

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA Y PARÁMETROS CINÉTICOS

Las muestras de esperma tuvieron que ser activadas. Esto se consiguió mezclando 0,5  $\mu$ l de esperma diluido en P1 (descrito en el apartado 3.3) con 4,5  $\mu$ l de agua marina artificial (Aqua Medic Meersalz, 37 g/l, con 2% BSA (w/v), pH ajustado a 8,2).

Con ayuda del software ISAS (Proiser R + D, España) se analizaron diferentes parámetros cinéticos: el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT), la motilidad progresiva (pMOT), definida como el porcentaje de espermatozoides que nadan de manera progresiva; y la velocidad curvilínea (VCL), definida como definido como velocidad promedio de un espermatozoide a través de su trayectoria curvilínea. Finalmente, los espermatozoides fueron considerados como móviles si su motilidad progresiva tenía una velocidad rectilínea (VSL) mayor a 10  $\mu$ m/s.

A continuación, a fin de realizar un análisis exhaustivo de los resultados, las muestras de esperma fueron clasificadas en tres clases, basando el criterio para su clasificación en el porcentaje de espermatozoides móviles medido por el sistema de análisis espermático CASA, de manera que se obtuvieron los grupos presentados en la Figura 5.

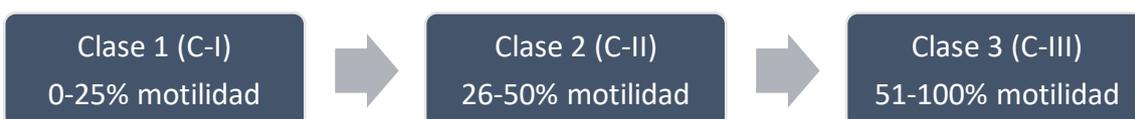


Figura 5. Clasificación de las muestras según el porcentaje de espermatozoides móviles

### 3.5 ANÁLISIS ECONÓMICO

El objetivo del análisis económico fue el de conocer la relación entre la inversión realizada para llevar a cabo cada uno de los tratamientos hormonales y el nivel de esperma de buena calidad producido por cada animal. Para analizar la rentabilidad de cada tratamiento hormonal se tuvieron en cuenta tres factores:

- i. El precio de la hormona.
- ii. La cantidad total de hormona usada (dosis) a lo largo de todo el experimento.
- iii. El volumen total de esperma de la clase más elevada de motilidad (C-III).

### 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para todos los parámetros del esperma tratados en el estudio (volumen, densidad, motilidad y demás parámetros cinéticos) se calculó su media y el error estándar. El test de Shapiro-Wilk se utilizó para comprobar la distribución normal de los datos, mientras que para estudiar la homogeneidad de varianzas se empleó el test de Levene. Se realizó un análisis *two-way* ANOVA para analizar la producción de esperma y sus parámetros de calidad. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el pack estadístico SPSS versión 19.0 para el software Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU). Se consideraron diferencias significativas cuando el p-value  $\leq$  0,5.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 EXPERIMENTO 1: GONADOTROPINA PURIFICADA VS RECOMBINANTE

La Figura 6 muestra los parámetros de producción de esperma. De ella se puede extraer que la mayoría (el 90%) de las anguilas tratadas con la hormona OVI empezaron a producir esperma en la sexta semana del tratamiento, mientras que sólo un 60% de las anguilas tratadas con VET generaron esperma en esa semana (Figura 6A). No obstante, de la semana 12 a la 18, el tratamiento VET alcanzó un porcentaje de machos espermiantes (90-100%) mayor que el tratamiento OVI (70-80%).

En cuanto al volumen de esperma (Figura 6B), los valores generados por los machos tratados con OVI fueron ligeramente mayores, aunque estadísticamente hablando, sólo en las semanas 8 y 9 se presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos. Esto probablemente se deba a la gran dispersión de datos que presenta el tratamiento con la hormona OVI durante las últimas semanas del experimento.

Respecto a los valores de densidad espermática, la Figura 6C muestra que estos fueron levemente mayores en machos sometidos al tratamiento con la hormona VET entre las semanas 11 y 21. Sin embargo, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en las semanas 13 y 15.

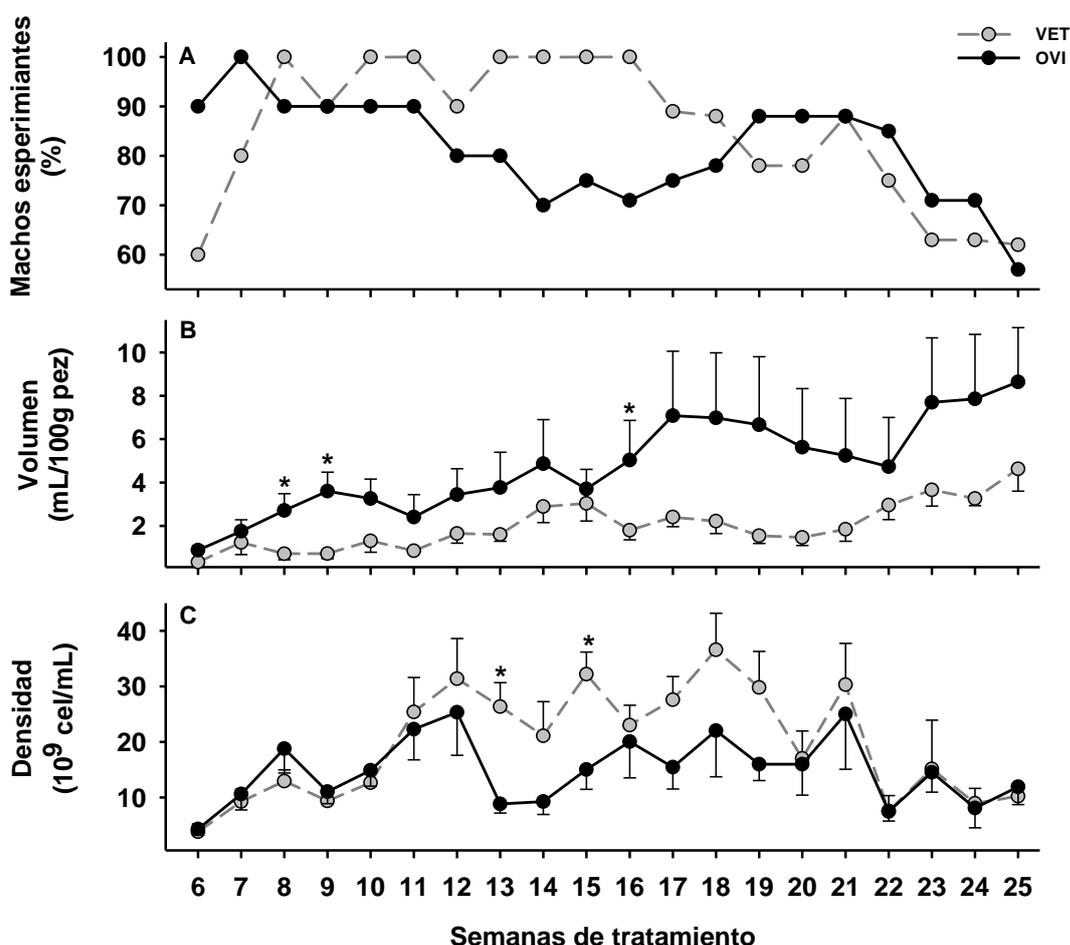


Figura 6. Parámetros de producción de esperma de los diferentes tratamientos

Referente a los parámetros de calidad espermática, los machos tratados con OVI presentaron mayores valores de motilidad que los machos tratados con VET durante las primeras semanas de tratamiento (Figuras 7A y B), alcanzándose un valor máximo de MOT del 76% en el caso de OVI y del 45% en el caso de VET. A pesar de esto, los machos tratados con VET mostraron un marcado crecimiento en los valores de motilidad a partir de la semana 12, obteniéndose valores de MOT del 77% y de pMOT del 35%. En general, los parámetros de motilidad se mantuvieron en valores similares para ambos tratamientos hormonales a partir de esta semana 12 y hasta el final del tratamiento, y se llegó a superar el 50% en la semana 25.

En el caso de la VCL de ambos tratamientos, esta exhibió un patrón similar a los parámetros de motilidad (Figura 7C). Los machos tratados con OVI presentaron una mayor velocidad curvilínea (VCL) que aquellos tratados con VET durante las primeras semanas de tratamiento, pero finalmente los valores se tornaron similares entre las dos hormonas desde la semana doce hasta el final del tratamiento.

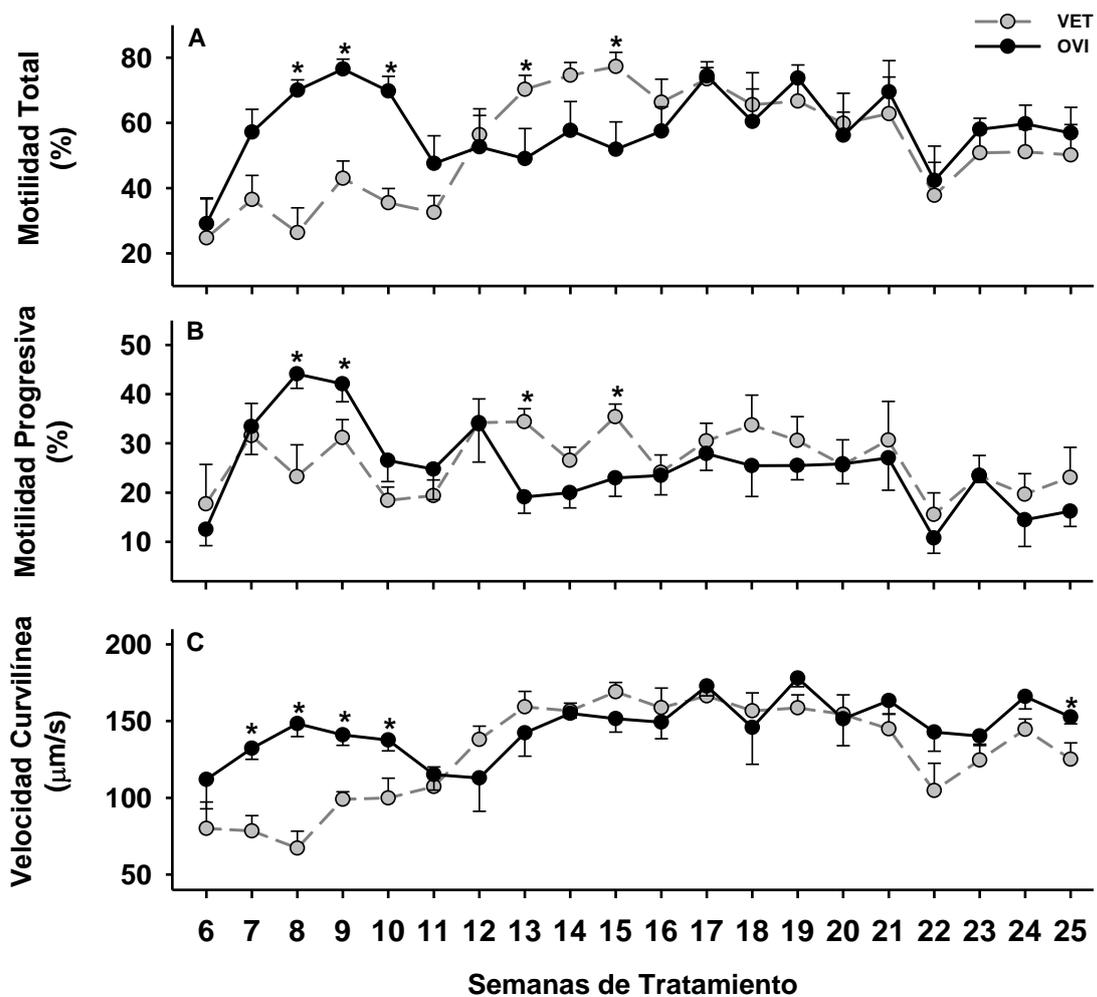


Figura 7. Parámetros de calidad espermática de los diferentes tratamientos

Finalmente, en la Figura 8 se muestra que cuando se consideraron simultáneamente los valores de volumen espermático y las diferentes clases de esperma según su motilidad, el tratamiento con la hormona OVI resultó en un mejor volumen total de esperma que el tratamiento con la hormona VET, incluso con valores superiores a los 500 mL de esperma de clase III (C-III). El tratamiento con VET, por el contrario, derivó en valores de volumen espermático situados alrededor de los 200 mL de esperma de clase III (C-III). Asimismo, en cuanto a la producción de esperma de calidad (C-III) a lo largo de las semanas de duración del tratamiento, la hormona OVI exhibió un mayor número de semanas en las que se consiguió ese esperma de alta calidad (semanas 8, 9, 10, 12, 22, 23, 24 y 25) y en mayor volumen que la hormona VET.

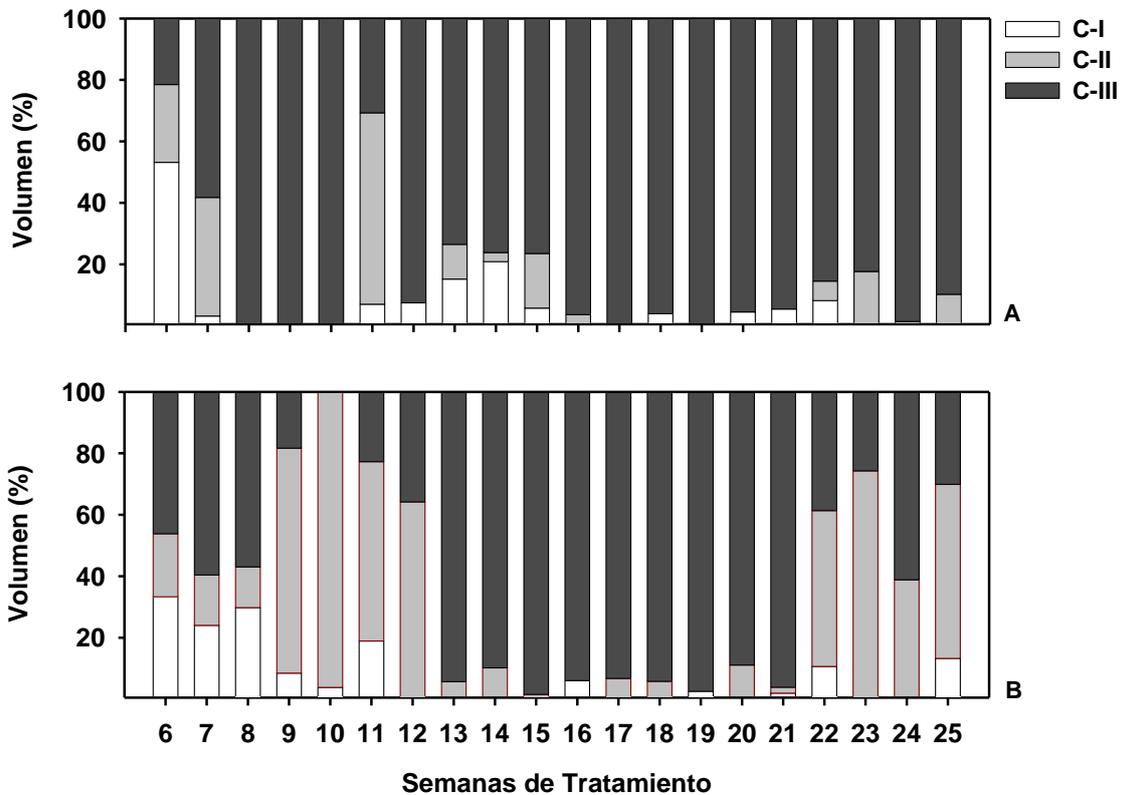


Figura 8. Porcentaje de volumen espermático de cada clase (I-III) en cada semana de los tratamientos con A) OVI y B) VET

#### 4.2 EXPERIMENTO 2: DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE

En cuanto a los parámetros de producción de esperma en este experimento (Figura 9), todas las diferentes dosis de gonadotropina OVI fueron capaces de inducir altos porcentajes (en torno al 80%) de machos espermiantes durante la mayoría de las semanas del tratamiento. Sin embargo, el grupo de machos tratados con la dosis  $OVI_{0,25}$  se presentaron como el grupo con menos espermiantes (sobre un 60%) en las últimas semanas del experimento.

Respecto al volumen, se puede observar una tendencia creciente desde el principio hasta el final en los tres tratamientos (Figura 9B). Los valores de volumen mayores corresponden al grupo tratado con OVI<sub>0,25</sub>, pero sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos en las semanas 8 y 10.

Por otro lado, se obtuvieron valores de densidad espermática ligeramente mayores en el grupo de machos tratados con la dosis OVI<sub>1,5</sub>, y diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos desde la semana 9 a la 12 (Figura 9C).

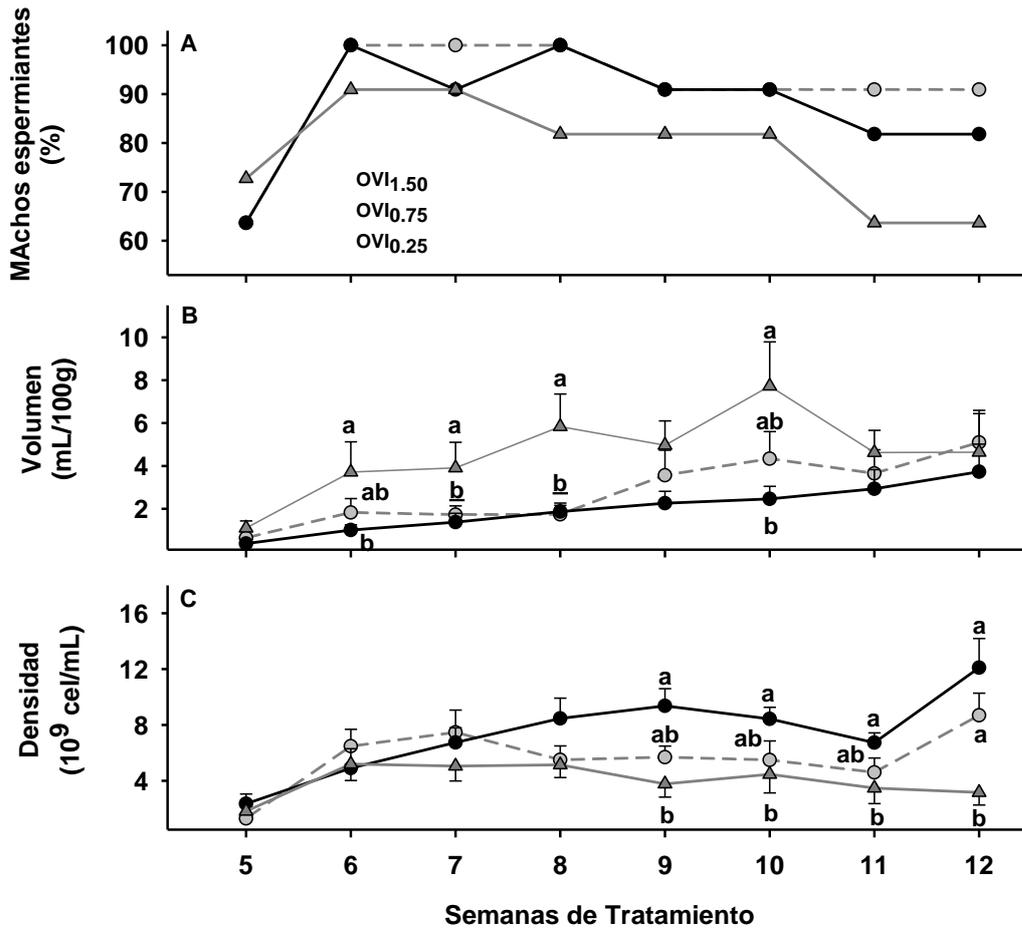


Figura 9. Parámetros de producción de espermia según las diferentes dosis de OVI

Acerca de los parámetros de calidad del espermia, los machos tratados con OVI<sub>1,5</sub> proporcionaron muestras con unos valores estadísticos de MOT y pMOT mayores durante prácticamente toda la duración del tratamiento, alcanzando valores máximos del 72% en el caso de MOT y del 46% en el caso de pMOT. Por el contrario, los tratamientos con dosis OVI<sub>0,75</sub> y OVI<sub>0,25</sub> derivaron en muestras que sólo llegaban a máximos del 30 y del 20% de MOT respectivamente. En el caso de la VCL de los diferentes tratamientos, esta mostró un patrón similar a los parámetros de motilidad (Figura 10C). Los machos tratados con OVI<sub>1,5</sub> exhibieron mayor velocidad curvilínea (VCL) a lo largo de casi toda la duración del tratamiento.

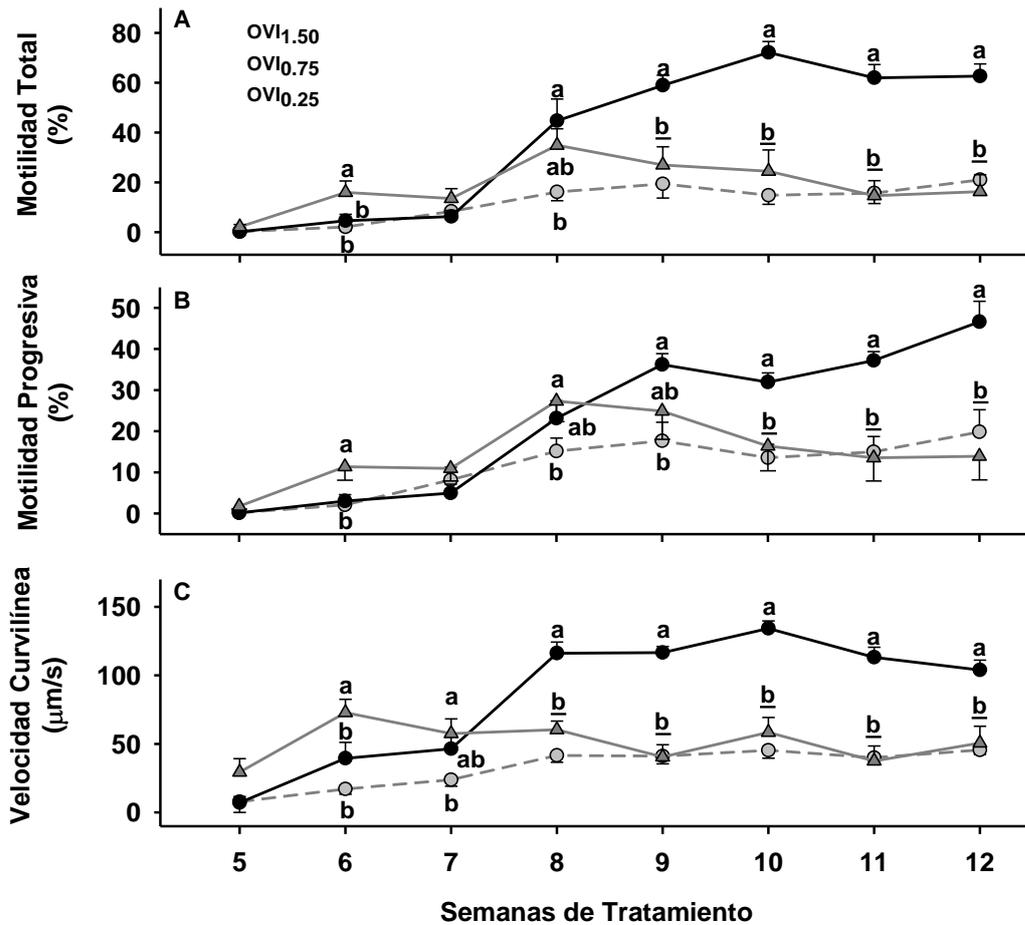


Figura 10. Parámetros de calidad espermática de las diferentes dosis de OVI

Por último, en la Figura 11 se muestra que cuando se consideraron simultáneamente los valores de volumen espermático y las diferentes clases de espermatozoides según su motilidad, el tratamiento con la mayor dosis OVI<sub>1,5</sub> fue el único capaz de producir unos volúmenes aceptables de espermatozoides de alta calidad (alrededor de casi 100 mL de espermatozoides clase C-III). Los tratamientos con la dosis media OVI<sub>0,75</sub> y la dosis baja OVI<sub>0,25</sub> generaron en un alto porcentaje de espermatozoides de mala calidad.

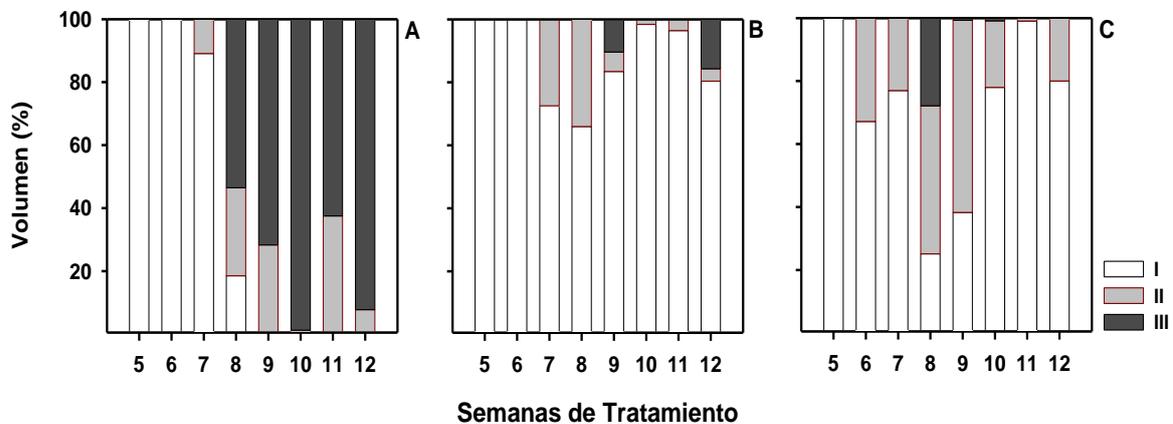


Figura 11. Porcentaje de volumen espermático de cada clase (I-III) en cada semana según las diferentes dosis de OVI: A) OVI<sub>1,5</sub>, B) OVI<sub>0,75</sub> y C) OVI<sub>0,25</sub>

### 4.3 ANÁLISIS ECONÓMICO

#### Gonadotropinas purificadas vs recombinantes

Como queda representado en la Tabla 1, la inversión necesaria para obtener machos sexualmente maduros es notablemente diferente entre los dos tratamientos hormonales. El tratamiento con la hormona VET se posiciona como el tratamiento que conlleva una menor inversión con 0,69 € semanales por macho. No obstante, aunque la inversión requerida con el tratamiento OVI es alta (1,17 € semanales por macho), el volumen de esperma de clase III (C-III) es superior al conseguido con el tratamiento VET.

A partir de estos datos se concluye que la rentabilidad final de la hormona OVI es mayor, ya que es posible obtener 1 mL de esperma de la mayor calidad (C-III) por 0,44 € (0,44 €/mL). Por otro lado, la hormona VET muestra peores resultados al ascender la inversión a 0,86 € para conseguir 1mL de buena calidad (C-III).

**Tabla 1.** Rentabilidad de los tratamientos hormonales del experimento 1 (OVI y VET; 1,5 UI/g de pez) y del experimento 2 (OVI<sub>1,5</sub>: 1,5 UI/g de pez; OVI<sub>0,75</sub>: 0,75 UI/g de pez; y OVI<sub>0,25</sub>: 0,25 UI/g pez) en relación con la inversión económica y la producción de esperma de alta calidad (Clase III)

		<i>Experimento 1</i>		<i>Experimento 2</i>		
		OVI	VET	OVI <sub>1,5</sub>	OVI <sub>0,75</sub>	OVI <sub>0,25</sub>
Dosis	UI/g pez	1,5	1,5	1,5	0,75	0,25
Precio hormona	€/UI	0,008	0,005	0,008	0,008	0,008
Precio dosis	€/g pez	0,012	0,007	0,012	0,006	0,002
Inversión/macho	€/macho	1,17	0,69	1,17	0,58	0,19
Precio esperma C-III	€/mL	0,44	0,86	1,78	6,44	1,85

#### Diferentes dosis de gonadotropina recombinante

Queda claro que la inversión económica necesaria para obtener machos sexualmente maduros es notablemente diferente entre los dos tratamientos hormonales. El tratamiento con dosis OVI<sub>1,5</sub> es el que requiere la mayor inversión semanal por macho, situándose en 1,17 €. En el caso de utilizar el tratamiento con dosis OVI<sub>0,75</sub> la inversión desciende a 0,58 € y al utilizar tratamiento con dosis OVI<sub>0,25</sub> a 0,19 €. A pesar de esto, el volumen total de esperma de clase III (C-III) obtenido a partir de los machos tratados con OVI<sub>1,5</sub> fue notoriamente mayor que el volumen producido por machos tratados con OVI<sub>0,75</sub> o OVI<sub>0,25</sub>.

De estos datos se deduce que la rentabilidad final del tratamiento con dosis estándar OVI<sub>1,5</sub> es la mayor, siendo posible conseguir 1 mL de esperma de la mayor calidad (C-III) por un precio de 1,78 € (1,78 €/mL).

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 GONADOTROPINAS PURIFICADAS Y RECOMBINANTES

El estudio de tratamientos hormonales alternativos a los actuales que consigan mejorar tanto la producción como los parámetros de calidad del esperma debe considerarse una prioridad si se quiere potenciar la maduración gonadal en peces (Mylonas *et al.*, 2017), especialmente en especies con problemas reproductivos serios como a los que se enfrenta la anguila europea (Gallego *et al.*, 2012; Peñaranda *et al.*, 2018). En el presente estudio, los resultados obtenidos indican que el tipo de hormona utilizada durante el tratamiento (gonadotropinas recombinante y purificada) afecta significativamente en el proceso de espermiación de machos de la anguila europea, siendo la hormona recombinante OVI la que produce mejores resultados.

Ante todo, es importante destacar que la cantidad y calidad del esperma se ha convertido en un factor clave en el control de la reproducción, tanto para la acuicultura como para propósitos científicos, por lo que obtener muestras con volúmenes razonables de esperma de buena calidad es de gran importancia si se quiere fertilizar al máximo número de óvulos posibles (Migaud *et al.*, 2013; Tvedt *et al.*, 2001). Siguiendo esta línea, aunque tanto la hormona OVI como la hormona VET fueron capaces de inducir un alto porcentaje de machos espermiantes (>70%), hubo una notable diferencia en el volumen de esperma y en los patrones de densidad espermática entre los dos tratamientos. En términos de volumen, los machos tratados con OVI produjeron aproximadamente el doble (incluso el triple) de volumen de esperma que los machos tratados con VET en todas las semanas del tratamiento, por lo que la cantidad final de esperma resultante derivada de la hormona OVI fue mucho mayor que la cantidad producida por los machos tratados con VET. En este sentido, Gallego *et al.* (2012) presentaron resultados similares en esta misma especie cuando usaron la hormona recombinante OVI. En este caso, la otra hormona usada se trataba de una hormona también purificada de diferente marca comercial que VET, y que había mostrado buenos resultados que ascendían incluso hasta los 8 mL de esperma recolectado. A parte del volumen de esperma, los valores de densidad espermática que se obtuvieron de las muestras de machos tratados con la hormona VET en el presente estudio no fueron lo suficientemente altas para verse compensadas por una mayor cantidad de esperma, dados los bajos volúmenes de esperma producidos durante las semanas del tratamiento con esta hormona. Es por todo esto que la hormona recombinante (OVI) se consideró como el mejor tratamiento según estos dos parámetros de producción de esperma.

Asimismo, además de la cantidad de esperma, su calidad es un factor de suma importancia en las prácticas de fertilización, y varios de los parámetros cinéticos (como la motilidad o la velocidad espermática) son hoy en día considerados también como los mejores biomarcadores de calidad espermática en peces (Gallego and Asturiano, 2018). En el experimento 1, ambas hormonas causaron excelentes valores de motilidad y

velocidad durante la mayor parte del tratamiento. No obstante, la hormona recombinante (OVI) fue capaz de proporcionar muestras de esperma de gran calidad durante un número más alto de semanas (semanas 18 a 20) que la hormona purificada (VET) (semanas 12 a 20). En este sentido, cabe destacar que la capacidad para obtener muestras de alta calidad de esperma durante un largo periodo de tiempo puede ser un factor clave en la cría en cautividad de la anguila europea, ya que es necesaria una sincronización entre la obtención de esperma y la producción de huevos por parte de las hembras (Butts *et al.*, 2014; Tomkiewicz *et al.*, 2013). Debido a todo lo comentado, y atendiendo los parámetros indicadores de calidad espermática, la hormona recombinante (OVI) se presentó como el mejor tratamiento hormonal.

Ahora bien, desde un punto de vista fisiológico, las diferentes respuestas que exhibieron los machos de anguila ante los diferentes tratamientos hormonales podrían ser explicados por la actividad biológica de cada hormona. Mientras que la hormona VET es una forma nativa de hCG, purificada y aislada de la orina humana (Birken *et al.*, 1996), la hormona OVI es una versión recombinante de la hCG endógena producida por la tecnología del ADN recombinante (Choi y Smitz, 2015). Aunque ambas hormonas (OVI y VET) actúan como análogas de la hormona luteinizante (LH), Bassett *et al.* (2005) concluyeron que las preparaciones de hCG purificadas contenían un número mayor de contaminantes proteicos derivados del orín, así como metabolitos relacionados con hCG, mientras que la hCG recombinante comercializada era esencialmente hCG intacta, es decir, libre de contaminantes proteicos y con muy bajos niveles de hCG oxidada. Es debido a la distinta naturaleza y origen de las hormonas (que además cuentan con diferentes grados de glicosilación), que éstas podrían inducir la maduración gonadal de diferentes modos, generando además distintos patrones de volumen o densidad espermática como ha quedado demostrado en anteriores trabajos (Gallego *et al.*, 2012). Asimismo, recientes estudios han mostrado que las nuevas hCG recombinantes presentes en el mercado (Pregnyl, Ovidrel, etc.) podrían ser utilizadas para la maduración en peces debido al alto grado de similitud tanto estructural como funcional con la hormona en el formato de referencia de este estudio (Leão and Esteves, 2014).

Por otra parte, nuevas terapias hormonales que utilizan gonadotropinas recombinantes específicas están siendo actualmente desarrolladas con el fin de inducir la espermiación en las diferentes especies de anguila. Aunque los resultados que se tienen en la anguila europea no han sido aún lo suficientemente buenos para ser aplicados en la acuicultura (Peñaranda *et al.*, 2018), la hormona LH recombinante de anguila japonesa ha sido capaz de generar una mayor cantidad de esperma de alta calidad que la que se ha conseguido con las inyecciones de hCG en esta especie en particular (Ohta *et al.*, 2017). En este contexto, queda argumentado que la investigación en nuevas terapias hormonales debe ser potenciada si se pretende mejorar los tratamientos con los que se cuenta actualmente para inducir la maduración artificial de especies en peligro como lo es la anguila europea.

A modo de síntesis, los resultados expuestos han demostrado que el proceso de espermiación en la anguila europea se ve notablemente influido por la hormona usada en el tratamiento. La gonadotropina recombinante (OVI) exhibió los mejores resultados en términos de producción de esperma y también en cuanto a parámetros de calidad, convirtiéndose así en un tratamiento efectivo para la inducción de la espermiación en esta especie.

## **5.2 DIFERENTES DOSIS DE GONADOTROPINA RECOMBINANTE**

Además del trabajo de descubrir nuevas hormonas que ayuden a alargar el periodo de espermiación y a mejorar las cualidades del esperma en anguilas, la optimización y perfeccionamiento de las terapias hormonales también se presenta como una importante tarea para el sector de la acuicultura y en el ámbito científico. Bajo esta perspectiva, y una vez que la hormona recombinante (OVI) ha sido elegida como la más eficiente en el experimento 1, se evaluaron sus efectos a diferentes dosis en la inducción de la espermiación.

Los resultados demuestran que desde la dosis más baja (0,25 UI/g de pez) a la dosis más alta (1,5 UI/g de pez) de esta hormona recombinante, todos los tratamientos fueron capaces de inducir el proceso completo de espermiación. Estudios anteriores ya sugerían que una sola inyección de hCG era suficiente para inducir la espermatogénesis y espermiación tanto en la anguila europea como en la anguila japonesa (Khan *et al.*, 1987; Miura *et al.*, 1991), pero sin embargo se hace necesario un continuo suministro de hormona para mantener durante el tiempo la correcta producción de esperma y su calidad (Asturiano *et al.*, 2005). En concordancia con estos trabajos previos, este estudio coincide en que un suministro periódico de hCG, incluso a bajas dosis, es suficiente para mantener el proceso de espermiación durante semanas.

En cuanto a los índices de producción de esperma (volumen y densidad), sorprendentemente el grupo de machos tratados con la dosis OVI<sub>0,25</sub> obtuvo los mayores volúmenes de esperma durante todo el tratamiento, con valores que rozaban los 8 mL en la semana 10. Sin embargo, la densidad espermática resultó ser más baja en este grupo (OVI<sub>0,25</sub>) que en los otros dos grupos que fueron inyectados con dosis mayores de la hormona recombinante (dosis OVI<sub>0,75</sub> y dosis OVI<sub>1,5</sub>). Es por esto que el volumen total de espermatozoides (calculado como volumen x densidad) producido semanalmente terminó siendo bastante similar en todos los tratamientos. Este patrón volumen-densidad había sido ya descrito para otras especies, y parece estar controlado por los esteroides inductores de la maduración (MIS) que regulan las últimas etapas de la maduración espermática (Asturiano *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2010). En este sentido, las densidades espermáticas altas estarían normalmente vinculadas a pequeños volúmenes de esperma y de forma inversa, bajas densidades espermáticas vendrían compensadas por altos volúmenes de esperma. Es más, los datos obtenidos en este estudio en relación con las densidades espermáticas usando la dosis estándar de

hormona recombinante hCG (1,5 UI/g de pez) coinciden con los valores obtenidos previamente al administrar la hormona recombinante en esta especie, y que se pueden encontrar en la bibliografía sobre anguila europea (Gallego *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se observaron notables diferencias entre los tratamientos en cuanto a los parámetros de calidad espermáticos. Sólo el grupo de machos tratado con la dosis más alta (OVI<sub>1,5</sub>) fue capaz de producir muestras con unos valores de motilidad aceptable desde la semana 8/9 hasta el final del tratamiento. Mientras, los machos tratados con las dosis más bajas (OVI<sub>0,75</sub> y OVI<sub>1,5</sub>) produjeron esperma de mala calidad (<35% de motilidad) en todas las semanas del tratamiento. Esta mala respuesta en términos de motilidad exhibida por los grupos de anguilas tratados con dosis menores se puede deber a un fallo hormonal en el proceso de maduración. Y es que una dosis semanal insuficiente de gonadotropina podría generar un déficit en la producción de enzimas esteroideogénicos. Esto desembocaría entonces en una baja producción de hormonas esteroideas que se encuentran estrechamente relacionadas en la maduración gonadal y, consecuentemente, se reduciría la producción de esperma de buena calidad (Jamalzadeh *et al.*, 2014; Peñaranda *et al.*, 2010b; Schulz and Miura, 2002). A partir de estas consideraciones, la dosis más usada para peces en la bibliografía es 1 UI/g de pez, aunque lógicamente las dosis por lo general son dependientes de la especie, variando desde 0,15 UI/g de pez en lucioperca (*Sander lucioperca*) (Falahatkar y Poursaeid, 2014) a 50 UI/g de pez en perca plateada (*Leiopotherapon plumbeus*) (Denusta *et al.*, 2014). En lo referente a la anguila europea, experimentos previos llevados a cabo hace una década mostraron, al igual que lo hace este estudio, que dosis de 0,75 UI/g de pez de hormona no fueron suficientes para obtener muestras de alta calidad. Asimismo, la dosis de 1,5 UI/g de pez de hormona hCG purificada administrada cada 2 semanas derivó en un mayor número de muestras, aunque de una similar (y todavía baja) calidad espermática (Asturiano *et al.*, 2005).

Para recapitular, los resultados del último experimento demostraron que, para conseguir una maduración satisfactoria en la anguila europea, es necesario el uso de una dosis mínima de 1,5 UI/g de pez de la hormona hCG recombinante que sea administrada semanalmente, ya que sólo así se inducirá la producción de unos volúmenes razonablemente altos de esperma de alta calidad por parte de los machos.

### **5.3 ANÁLISIS ECONÓMICO**

Primero, hay que destacar que, desde un punto de vista biológico, el mejor tratamiento hormonal es aquel que proporciona una mayor cantidad de esperma (volumen y densidad) de muestras de alta calidad (motilidad y velocidad) durante el mayor número de semanas posibles. No obstante, desde un punto de vista económico, es esencial que exista una reducción en el coste de las terapias hormonales si se quiere conseguir el deseado tratamiento hormonal que proporcione efectividad no dejando de ser asequible económicamente (Mylonas *et al.*, 2017).

En este estudio, el rendimiento de los diferentes tratamientos fue evaluado teniendo siempre en cuenta tanto la inversión económica que conlleva el tratamiento (tipo de hormona, precio y dosis) como el volumen total de esperma de alta calidad generado por cada tratamiento. En el experimento 1, la hormona recombinante OVI mostró los mejores resultados durante todo el experimento en lo que se refiere a la relación calidad/precio del esperma, superando así a la hormona purificada VET. En este contexto, y a pesar de que la inversión requerida por los machos tratados con la hormona recombinante fue prácticamente el doble que la inversión con la hormona purificada (1,17 €/macho y semana con OVI vs 0,69 €/macho y semana con VET), la gran cantidad de esperma de alta calidad que produjeron los machos tratados con la hormona recombinante, que triplicaba la de aquellos tratados con la hormona purificada, significó que la hormona recombinante se situara como la más rentable, haciendo posible obtener el esperma de alta calidad buscado por la mitad de precio respecto a la hormona purificada (0,44 €/mL y 0,86 €/mL respectivamente).

Asimismo, el análisis económico referido al uso de las diferentes dosis de la hormona (experimento 2) aportó aún más resultados interesantes. Aunque la dosis más alta (OVI<sub>1,5</sub>) y la dosis más baja (OVI<sub>0,25</sub>) de la hormona recombinante mostraron un rendimiento económico similar en cuanto al precio del esperma de alta calidad (siendo 1,78 €/mL para la dosis OVI<sub>1,5</sub> y 1,85 €/mL para la dosis OVI<sub>0,25</sub>), el volumen total de esperma C-III generado por OVI<sub>0,25</sub> fue muy bajo como para tener una aplicación práctica en el campo de la acuicultura de la anguila. Es más, cuando se comparan los resultados de la rentabilidad económica de la hormona OVI y su dosis 1,5 UI/g de pez en los experimentos 1 y 2, estos se muestran bastante lejanos; la hormona recombinante presentó un rendimiento económico mucho mejor en el experimento 1 (0,44 €/mL) que en el experimento 2 (1,78 €/mL). Esta diferencia puede explicarse por el concepto de producción a gran escala, donde los costes de producción obtenidos al utilizar diferentes escalas (en este caso 25 semanas para el experimento 1 y 12 semanas para el experimento 2) hacen disminuir el coste por unidad de producto (esperma de alta calidad). De hecho, cuando la rentabilidad económica del experimento 1 fue calculada para sólo las 12 primeras semanas, el rendimiento económico de OVI fue menor que su rendimiento en el mismo experimento al completar las 25 semanas (1,06 €/mL para las 12 semanas mientras que 0,44 €/mL para las 25 semanas). Además, debido a que en las primeras semanas de cualquier tratamiento hormonal no hay producción de esperma de alta calidad, queda demostrado que las terapias hormonales a largo plazo se hacen necesarias si se quiere conseguir reducir el coste de producción del esperma de alta calidad de la anguila europea.

Finalmente, relacionando la abundante producción (volumen y densidad) de muestras de esperma de alta calidad (motilidad y velocidad), con las prácticas esenciales llevadas a cabo en cualquier criadero (como puede ser la fertilización *in vitro*, IVF), Butts *et al.* (2014) mostraron en su trabajo que la ratio esperma-óvulo es un parámetro de

importancia crítica en el establecimiento de un protocolo exitoso para la fertilización *in vitro*. Siguiendo esta línea, y teniendo en cuenta el valor óptimo de la ratio esperma-óvulo en esta especie en concreto (1:25000), se podría fertilizar una gran cantidad de óvulos (aproximadamente 10 millones de óvulos por semana) utilizando simplemente un lote de 10 machos de anguila que hayan sido tratados con la hormona recombinante hCG (1,5 UI/g de pez).

## **6. CONCLUSIONES**

En conclusión, en este estudio se demuestra que el tipo de hormona utilizada afecta significativamente al desarrollo de la espermiación en machos de anguilas europeas, y que fue la hormona recombinante (Ovitrelle (OVI), dosis 1,5 UI/g pez) la que produjo mejores resultados tanto en términos de cantidad de esperma (volumen y densidad) como en términos de calidad del esperma (motilidad y velocidad). Asimismo, el análisis económico indicó que esta hormona recombinante tuvo una rentabilidad superior a la rentabilidad de otros tratamientos hormonales. De esta forma, OVI se convierte en un método efectivo para inducir el proceso de espermiación en esta especie y conseguir así muestras de esperma de alta calidad durante un alto número de semanas. Esto supone un avance en la tan necesaria búsqueda de nuevos tratamientos hormonales que demuestren tener los efectos deseados en la manipulación reproductiva de machos de anguilas europeas y que a la vez no tengan un coste prohibitivo para la investigación o las empresas del sector acuícola que trabajan con esta especie.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ASTURIANO, J.F., SORBERA, L.A., RAMOS, J., KIME, D.E., CARRILLO, M., ZANUY, S., (2002). Groupsynchronous ovarian development, spawning and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal sterodiogenesis. *Sci. Mar.* 66, 273–282.
- AROUA, S., SCHMITZ, M., BALOCHE, S., VIDAL, B., ROUSSEAU, K., & DUFOUR, S., (2005). Endocrine Evidence that Silvering, a Secondary Metamorphosis in the Eel, Is a Pubertal Rather than a Metamorphic Event. *Neuroendocrinology*, 82(3-4), 221–232.
- ASTURIANO, J.F., PÉREZ, L., GARZÓN, D.L., PEÑARANDA, D.S., MARCO-JIMÉNEZ, F., MARTÍNEZLLORENS, S., TOMÁS, A., JOVER, M., (2005). Effect of different methods for the induction of spermiation on semen quality in European eel. *Aquac. Res.* 36, 1480–1487.
- ASTURIANO, J.F., MARCO-JIMÉNEZ, F., PÉREZ, L., BALASCH, S., GARZÓN, D.L., PEÑARANDA, D.S., VICENTE, J.S., VIUDES-DE-CASTRO, M.P., JOVER, M., (2006). Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* 66, 1012–1020.
- ASTURIANO, J. F., (2020). Chapter 14, Improvements on the Reproductive Control of the European Eel. *Reproduction in Aquatic Animals* (pp.293-320).
- BASSETT, R., DE BELLIS, C., CHIACCHIARINI, L., MENDOLA, D., MICANGELI, E., MINARI, K., GRIMALDI, L., MANCINELLI, M., MASTRANGELI, R., BUCCI, R., (2005). Comparative characterisation of a commercial human chorionic gonadotrophin extracted from human urine with a commercial recombinant human chorionic gonadotrophin. *Curr. Med. Res. Opin.* 21, 1969–1976.
- BIRKEN, S., MAYDELMAN, Y., GAWINOWICZ, M.A., POUND, A., LIU, Y., HARTREE, A.S., (1996). Isolation and characterization of human pituitary chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 137, 1402–1411.
- BUTTS, I.A.E., SØRENSEN, S.R., POLITIS, S.N., PITCHER, T.E., TOMKIEWICZ, J., (2014). Standardization of fertilization protocols for the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 426–427, 9–13.
- CHOI, J., SMITZ, J., (2015). Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: a review of their varied clinical applications in assisted reproductive technology. *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* 10, 87–100.
- DENUSTA, P.J.T., JESUS-AYSON, E.G.T., LARON, M.A., GARCIA, L.M.B., (2014). Effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and handling stress on spermiation of silver perch *Leiopotherapon plumbeus* (Kner, 1864). *J. Appl. Ichthyol.* 30, 448–453.
- DOLLERUP, J., GRAVER, C.M., (1985). Repeated induction of testicular maturation and spermiation, alternating with periods of feeding and growth in silver eels, *Anguilla anguilla* (L.). *Dana* 4, 19–39.
- FALAHATKAR, B., POURSAEID, S., (2014). Effects of hormonal manipulation on stress responses in male and female broodstocks of pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquac. Int.* 22, 235–244.
- FONTAINE, M., (1936). Sur la maturation complete des organes genitaux de l'anguille male et l'emission spontanee de ses produits sexuels. *CR Acad. Sci. Paris* 202, 1312–1315.

- GALLEGO, V., CARNEIRO, P. C. F., MAZZEO, I., VÍLCHEZ, M. C., PEÑARANDA, D. S., SOLER, C., PÉREZ, L., ASTURIANO, J. F., (2013). Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology*, 79(7), 1034-1040.
- GALLEGO, V., MAZZEO, I., VÍLCHEZ, M.C., PEÑARANDA, D.S., CARNEIRO, P.C.F., PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F., (2012). Study of the effects of thermal regime and alternative hormonal treatments on the reproductive performance of European eel males (*Anguilla anguilla*) during induced sexual maturation. *Aquaculture* 354–355, 7–16.
- GALLEGO, V., ASTURIANO, J.F., (2018). Sperm motility in fish: technical applications and perspectives through computer-aided sperm analysis (CASA) systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 30 (6), 820–832.
- JAMALZADEH, H.R., AKHUNDIAN, M., KABIR, M., KHARA, H., HAJIREZAEI, S., (2014). Sex steroids in the seminal fluid and milt quality indices in the endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*. *Aquac. Res.* 45, 1090–1095.
- VAN GINNEKEN, V., MAES, G., (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, L), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 367–398.
- KHAN, I.A., LOPEZ, E., LELOUP-HÂTEY, J., (1987). Induction of spermatogenesis and spermiation by a single injection of human chorionic gonadotropin in intact and hypophysectomized immature European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 91–103.
- LEÃO, R.B.F., ESTEVES, S.C., (2014). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics* 69, 279–293.
- LOKMAN, P.M., DAMSTEEGT, E.L., WALLACE, J., DOWNES, M., GOODWIN, S.L., FACOORY, L.J., WYLIE, M.J., (2016). Dose-responses of male silver eels, *Anguilla australis*, to human chorionic gonadotropin and 11-ketotestosterone in vivo. *Aquaculture* 463, 97–105.
- MIGAUD, H., BELL, G., CABRITA, E., MCANDREW, B., DAVIE, A., BOBE, J., HERRÁEZ, M.P., CARRILLO, M., (2013). Gamete quality and broodstock management in temperate fish. *Rev. Aquac.* 5, S194–S223.
- MIURA, T., YAMAUCHI, K., NAGAHAMA, Y., TAKAHASHI, H., (1991). Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zool. Sci.* 8, 63–73.
- MYLONAS, C.C., FOSTIER, A., ZANUJ, S., (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 516–534.
- MYLONAS, C.C., DUNCAN, N.J., ASTURIANO, J.F., (2017). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture* 472, 21–44.
- OHTA, H., KAGAWA, H., TANAKA, H., OKUZAWA, K., IINUMA, N., HIROSE, K., (1997). Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 163–169.
- OHTA, T., SATO, Y., IMAIZUMI, H., KAZETO, Y., (2017). Changes in milt volume and sperm quality with time after an injection of recombinant Japanese eel luteinizing hormone in male Japanese eels. *Aquaculture* 479, 150–154.

- PEÑARANDA, D.S., PÉREZ, L., GALLEGU, V., BARRERA, R., JOVER, M., ASTURIANO, J.F., (2010a). European eel sperm diluent for short-term storage. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 407–415.
- PEÑARANDA, D.S., PÉREZ, L., GALLEGU, V., JOVER, M., TVEITEN, H., BALOCHE, S., DUFOUR, S., ASTURIANO, J.F., (2010b). Molecular and physiological study of the artificial maturation process in European eel males: from brain to testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 160–171.
- PEÑARANDA, D.S., GALLEGU, V., ROZENFELD, C., HERRANZ-JUSDADO, J.G., PÉREZ, L., GÓMEZ, A., GIMÉNEZ, I., ASTURIANO, J.F., (2018). Using specific recombinant gonadotropins to induce spermatogenesis and spermiation in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Theriogenology* 107, 6–20.
- PÉREZ, L., ASTURIANO, J.F., TOMÁS, A., ZEGRARI, S., BARRERA, R., ESPINÓS, F.J., NAVARRO, J.C., JOVER, M., (2000). Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.* 57, 1488–1504.
- POLITIS, S.N., MAZURAS, D., SERVILI, A., ZAMBONINO, J.L., MIEST, J.J., SØRENSEN, S.R., TOMKIEWICZ, J., BUTTS, I.A.E., (2017). Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE* 12(8): e0182726.
- RICHARDS, J.L., SHENG, V., CHUNG, W.Y., CHAN, L.Y., NG, S.T., SADOVY, Y., BAKER, D., (2020). Prevalence of critically endangered European eel (*Anguilla anguilla*) in Hong Kong supermarkets. *Science Advances*, Vol. 6, no. 10, eaay0317.
- ROZENFELD, C., (2019). Development of innovative methods for induction of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatogenesis. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/125697>.
- SCHULZ, R.W., MIURA, T., (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.*
- SCHULZ, R.W., DE FRANÇA, L.R., LAREYRE, J.J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R.H., MIURA, T., (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411.
- SORENSEN, P.W., WINN, H.E., (1984). The induction of maturation and ovulation in American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur), and the relevance of chemical and visual cues to male spawning behaviour. *J. Fish Biol.* 25, 261–268.
- TOMKIEWICZ, J., STØTTRUP, J.G., CORRAZE, G., KAUSIK, S., HOLST, L.K., MCEVOY, F., et al. (2013). Reproduction of European eel and larval culture: state of the art. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 78, 455–456.
- TURCHINI, G., FRANCIS, D., DE SILVA, S., (2006). Fatty acid metabolism in the freshwater fish Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) deduced by the whole-body fatty acid balance method. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 144: 110–118.
- TVEDT, H.B., BENFEY, T.J., MARTIN-ROBICHAUD, D.J., POWER, J., (2001). The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194, 191–200.
- ZHONG, H., ZHOU, Y., YU, F., XIAO, J., GAN, X., & ZHANG, M., (2014). Seasonal changes and human chorionic gonadotrophin (hCG) effects on innate immune genes expression in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Shellfish Immunol.* 38(2), 303–310.