

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA ANIMAL



Efectos de pretratamientos con agua marina fría en el proceso de espermatogénesis y en el rendimiento reproductivo de los machos de anguila europea (*Anguilla anguilla*)

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN ACUICULTURA

Autora:

María Isabel Suay Costa

Directores:

Dr. Juan F. Asturiano

Dra. Marina Morini

Curso académico: 2020-2021

Valencia, septiembre de 2021

Título: Efectos de pretratamientos con agua marina fría en el proceso de espermatogénesis y en el rendimiento reproductivo de los machos de anguila europea (*Anguilla anguilla*).

RESUMEN:

Estudios recientes han descubierto que el agua marina fría estimula al eje cerebro-hipófisis-gónada e induce un desarrollo sexual temprano en los machos de anguila europea (*Anguilla anguilla*). Estos resultados sugieren que el agua marina fría podría utilizarse como un tratamiento previo al método hormonal estándar aplicado para inducir la maduración sexual con el fin de obtener una mayor cantidad y calidad de esperma. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de pretratamientos con agua marina fría (10°C) de diferente duración (0 o control, 1, 2 y 4 semanas) sobre el proceso de espermatogénesis y rendimiento reproductivo, en un total de 88 machos de anguila; así como su efecto sobre los niveles plasmáticos de esteroides y a nivel celular. Los peces se ubicaron en 8 acuarios con 10 peces cada uno, que se repartieron en un total de 4 pretratamientos (2 acuarios/pretratamiento). Se determinaron los siguientes parámetros biométricos: índice ocular (IO), de la aleta (IA), hepatosomático (IHS) y gonadosomático (IGS). En cuanto a los esteroides, se analizó la concentración en sangre de estradiol (E2), testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11KT). A nivel de histología testicular, se determinaron los porcentajes celulares de espermatogonias indiferenciadas (SPG_{ind}), espermatogonias tipo A diferenciadas (SPGA_{dif}) y espermatogonias tipo B tempranas (SPGB_{temprana}). Los machos que recibieron los pretratamientos a 10 °C durante 1, 2 y 4 semanas mostraron un aumento de los parámetros biométricos y de los niveles plasmáticos de andrógenos y E2, con respecto a los del grupo control. Además, los machos mantenidos a 10°C durante 4 semanas mostraron una mayor proporción de SPGA_{dif} en comparación con SPGA_{ind}. Estos resultados, por tanto, sugieren que un pretratamiento de agua marina fría promueve una maduración sexual temprana. Sin embargo, la baja calidad del esperma en los grupos pretratados reveló que el pretratamiento a 10°C seguido del tratamiento hormonal tradicional con gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG_{rec}) a 20°C afecta de manera negativa a la espermatogénesis. Los machos que fueron sometidos a una temperatura del agua de 10°C durante 1, 2 y 4 semanas tuvieron una respuesta rápida y dependiente de la duración del pretratamiento al tratamiento con hCG_{rec} (en comparación con los machos del grupo control mantenidos a 20 °C). Sin embargo, su periodo de espermiación fue más corto y sus parámetros de movilidad espermática fueron significativamente menores, lo que sugiere un efecto del pretratamiento térmico sobre la regulación de los genes implicados en el proceso de la espermatogénesis, que a su vez conduce a una inhibición de la maduración final del esperma.

Palabras clave: *Anguilla anguilla*, maduración, testículos, espermatogonia, temperatura, migración reproductiva.

Autora: María Isabel Suay Costa.

Directores: Dr. Juan F. Asturiano y Dra. Marina Morini.

Valencia, septiembre de 2021

Title: Effects of cold seawater pretreatments on the spermatogenesis process and the reproductive performance of male European eels (*Anguilla anguilla*).

ABSTRACT:

Recent studies found that cold seawater stimulates the brain-pituitary-gonad axis and induces early sexual development in male European eels (*Anguilla anguilla*). These results suggest that cold seawater could be used as a pretreatment to the standard hormonal method applied to induce sexual maturation in order to obtain higher sperm quantity and quality. The objective of this work was to evaluate the effects of pretreatments with cold seawater (10°C) of different duration (0 or control, 1, 2 and 4 weeks) on the process of spermatogenesis and reproductive performance, in a total of 88 male eels; as well as their effect on plasma steroid levels and at the cellular level. The fish were organized in 8 aquaria with 10 fish each, which were distributed, in pairs, in a total of 4 pretreatments (2 aquaria/pretreatment). Ocular, fin, hepatosomatic and gonadosomatic indices were determined. As for steroids, blood concentrations of estradiol (E2), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) were analyzed. At the testicular histology level, cell percentages of undifferentiated spermatogonia (SPG_{und}), differentiated type A spermatogonia (SPGA_{diff}) and early type B spermatogonia (SPGB_{early}) were determined. Males treated at 10 °C for 1, 2 and 4 weeks showed an increase in biometric indices and plasma androgen and E2 levels compared to the control group. In addition, males maintained at 10°C for 4 weeks showed a higher proportion of SPGA_{diff} compared to SPGA_{und}. These results, therefore, suggest that a cold seawater pretreatment promotes early sexual maturation. However, low sperm quality in the pretreated groups revealed that pretreatment at 10°C followed by traditional hormonal treatment with recombinant human chorionic gonadotropin (hCG_{rec}) at 20°C negatively affects spermatogenesis. Males that were subjected to a water temperature of 10°C for 1, 2 and 4 weeks had a rapid and time-dependent response to hCG_{rec} treatment (compared to control group males maintained at 20°C). However, their spermiation period was shorter and their sperm motility parameters were significantly lower, suggesting an effect of thermic pretreatment on the regulation of genes involved in the spermatogenesis process, which in turn leads to a final inhibition of sperm maturation.

Key words: *Anguilla anguilla*, maturation, testis, spermatogonia, temperature, reproductive migration.

Author: María Isabel Suay Costa.

Academic directors: Dr. Juan F. Asturiano and Dra. Marina Morini.

Valencia, September of 2021

“No importa cuán largo sea el camino y los errores que cometas, tengo un plan para ti. Y es perfecto.”

A tu, iaia.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. LA ANGUILA: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y DESCRIPCIÓN	1
1.2. BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN.....	2
1.3. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ANGUILA EUROPEA.....	4
1.3.1. Producción y estado actual de las poblaciones.....	4
1.4. INDUCCIÓN ARTIFICIAL DE LA MADURACIÓN SEXUAL PARA LA CONSERVACIÓN Y EFICACIA REPRODUCTIVA	6
1.5. MANEJO DE LA TEMPERATURA COMO ALTERNATIVA DE MEJORA DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
3.1. MANTENIMIENTO DE LOS PECES.....	10
3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL	11
3.3. MEDICIONES REALIZADAS.....	11
3.3.1. Parámetros biométricos	12
3.3.2. Análisis de esteroides en plasma.....	12
3.3.3. Histología testicular	12
3.3.4. Parámetros espermáticos.....	13
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. PARÁMETROS BIOMÉTRICOS	14
4.2. ANÁLISIS DE ESTEROIDES EN PLASMA	15
4.3. HISTOLOGÍA TESTICULAR	16
4.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA	17
4.4.1. Producción de esperma	17
4.4.2. Movilidad y velocidad espermática.....	18
5. DISCUSIÓN.....	21
5.1. Parámetros biométricos, niveles de esteroides en plasma e histología	21
5.2. Producción de esperma, movilidad y parámetros de velocidad de los espermatozoides	23
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍA	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ANGUILA: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y DESCRIPCIÓN

La anguila es un pez teleosteo eurihalino perteneciente al orden Anguilliformes, a la familia Anguillidae y al género *Anguilla*, el cual conforman un total de 21 especies ampliamente distribuidas por todo el mundo: la *A. rostrata* (anguila americana) se encuentra en aguas del Océano Atlántico norte, la *A. mossambica* en la costa africana del Océano Índico y la *A. japonica* (anguila japonesa) habita en las costas del Mar de China oriental y Japón. En el hemisferio Sur destacan las especies de Indonesia, Australia y Nueva Zelanda; *A. marmorata*, *A. australis* y *A. reinhardti*, respectivamente. Estas dos últimas pueden alcanzar hasta los 20 kg de peso. Finalmente, en el caso de la anguila europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758), su área de distribución va desde el Mar Mediterráneo (costas europeas y del norte de África) hasta la Península Escandinava e Islandia en el Océano Atlántico (Van Ginneken & Maes, 2005; Figura 1).

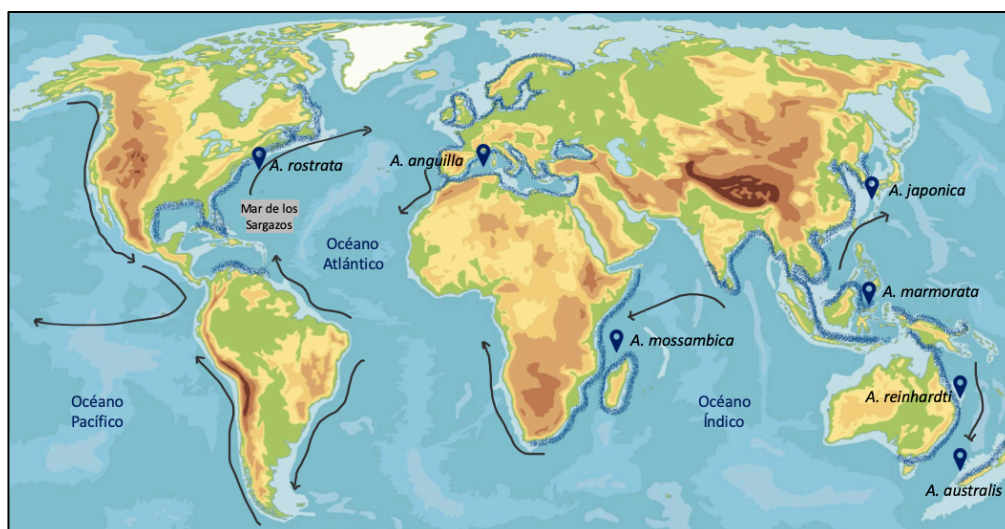


Figura 1. Distribución geográfica de las principales especies de anguila en el mundo.

En cuanto a la morfología, su cuerpo es serpentiforme y con dos pequeñas aletas pectorales y una única aleta larga y continua que deriva de la fusión de las aletas dorsal y anal con la caudal (Deelder, 1984). La piel de la anguila es lisa y está compuesta por escamas elípticas y numerosas glándulas secretoras de mucus (Gutiérrez, 2003), y su color es variable dependiendo del estado de madurez. Los ejemplares adultos son de un color entre negruzco y verdoso en la zona dorsal y plateado en el vientre y los costados. Su tamaño habitual está comprendido entre 40 y 60 cm, aunque en el caso de las hembras se han publicado longitudes de hasta 130 cm (Dekker *et al.*, 1998) y pesos más altos (Gómez-Juaristi y Salvador, 2017).

Toleran bien tanto las variaciones de salinidad (gracias a la osmorregulación) como las de temperatura (12-28°C, Pérez *et al.*, 2004; Sastre, 2011), y soportan concentraciones bajas (3 mg/l) de oxígeno disuelto en el agua (Vílchez, 2013). Son animales bentónicos (viven en el fondo y prefieren sustratos arenosos), omnívoros (se alimentan de pequeños crustáceos, moluscos y anélidos, así como de larvas de insectos y carroña) y lucífugos (Tesch, 1991; Costa *et al.*, 1992; Blanco *et al.*, 2003). En un estudio de seguimiento de anguilas mediante radiotelemetría, se observó mayor actividad nocturna que diurna, y en días nublados o lluviosos (LaBar *et al.*, 1987).

1.2. BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

La anguila europea tiene un ciclo de vida complejo, y aún hoy en día hay aspectos que solo se conocen parcialmente. Se trata de una especie catádroma, es decir, que nace y se reproduce en el mar, pero crece en los cursos de aguas dulces continentales: ríos, canales, lagos litorales salobres, estuarios, marjales e incluso en zonas costeras (donde se resguardan en las praderas de *Posidonia*), son los ambientes donde las anguilas pasan la mayor parte de su vida.

Entre los meses de octubre y enero, y en el momento en que los ejemplares han alcanzado su madurez sexual (Deelder, 1984; Tesch, 1991), comienzan su migración reproductiva a través del Océano Atlántico, durante la que recorrerán entre 4000 y 6400 km en función de su punto de origen. En este momento, las anguilas experimentan una metamorfosis conocida como “plateamiento” o *silvering*, en inglés (Durif *et al.*, 2005), que lleva asociados una serie de cambios morfológicos que sirven como mecanismo de pre-adaptación a la vida que les espera en la profundidad del Océano (Pankhurst, 1982), como: aumento del diámetro del ojo, alargamiento y oscurecimiento de las aletas, desarrollo de la línea lateral y cambio de coloración de las zonas dorsal y ventral a tonos oscuro y plateado, respectivamente, de ahí que se les llame en esta etapa **anguilas plateadas** o *silver eels*, en inglés. Al inicio de la ruta migratoria, permanecen sexualmente inmaduras, con índices gonadosomáticos de entre el 1% y 2,7% (Durif *et al.*, 2005), y se cree que el desarrollo completo de las gónadas ocurre cuando están cerca de llegar a su zona de freza, ubicada en el Mar de los Sargazos (Schmidt, 1923; Righton *et al.*, 2016). Algunos autores (Aarestrup *et al.*, 2009; Jellyman and Tsukamoto, 2010) sugieren que las anguilas son capaces de autorregular su velocidad de maduración sexual exponiéndose a aguas frías. Recientemente, de hecho, y gracias a una tecnología basada en *pop-up satellite archival transmitters*, se ha demostrado que realizan migraciones verticales diarias: durante la noche las anguilas nadan en aguas menos profundas y más cálidas (media de 282 m, y 11.7 °C), mientras que por el día descienden a zonas más profundas y frías (media de 564 m, y 7-10 °C) (Aarestrup *et al.*, 2009; Righton *et al.*, 2016).

Hasta la fecha no se han documentado las condiciones de temperatura, salinidad, presión o profundidad exactas que se dan durante el desove, ya que nunca se ha logrado capturar una anguila en el área estimada de puesta en el Mar de los Sargazos.

Los huevos, pelágicos y de 0.3 a 0.8 mm de diámetro, son fecundados en el agua por el esperma de los machos, pues como ocurre en la mayoría de los peces, su fertilización es externa. Después del desove, se supone que los progenitores mueren (Van Ginneken and Maes, 2005), puesto que no se han observado anguilas adultas volviendo a la plataforma continental.

Tras la eclosión de los huevos, se liberan larvas con una morfología normal (estado pre-leptocéfalo), y cuando ya tienen varios cm de longitud, adoptan una nueva forma: se trata de las larvas llamadas **leptocéfalos**, con el cuerpo muy comprimido lateralmente y completamente transparentes, de 4 mm y con forma de hoja de sauce (Tesch, 1991), y cuya nutrición depende al principio de las reservas acumuladas en el saco vitelino. Posteriormente, se alimentarán de lo que se conoce como *nieve marina*: término referido al conjunto de detritus, principalmente orgánicos (que descienden al fondo del océano desde las capas superiores de la columna de agua, donde se originan) como partículas de zooplancton o cápsulas mucilaginosas de apendicularias (Otake *et al.*, 1993; Mochioka and Iwamizu, 1996). También se alimentan de salpas, pterópodos, e hidrozooos (Riemann *et al.*, 2010). Los leptocéfalos llegan a las costas de Europa gracias a la natación activa y a la corriente del Golfo de México, y tardan entre 220 y 290 días (Lecomte-Finiger, 1994; Arai *et al.*, 2000). Recientemente se ha demostrado que las larvas emplean unos mecanismos de orientación magnéticos y lunares durante su migración (Cresci, 2020). Estas larvas, cuando están próximas a las desembocaduras de los ríos, experimentan una primera metamorfosis: pasan de medir de 7 a 7.5 cm, a medir un cm menos, el cuerpo se redondea y pierden los dientes originales, es la conocida **angula** o *glass eel*, en inglés. Las angulas, que no están diferenciadas sexualmente, ascienden por los ríos en noches de luna llena, y al poco tiempo van adquiriendo su pigmentación característica y completan su crecimiento. A los 4 años de vida aproximadamente, las angulas se transforman en **anguilas amarillas** (*yellow eel*, en inglés). Parece ser que entre las poblaciones que permanecen en los estuarios y albuferas predominan los machos; y que entre los ejemplares que remontan los ríos son más abundantes las hembras (Torrent-Bravo, 2004). Finalmente, y hasta que se acerca la época de migración reproductiva (con nuevos cambios morfológicos que definen a la “anguila maresa”), se alimentan y crecen almacenando reservas energéticas, en previsión del largo viaje que emprenderán de nuevo hacia el mar, completando así su ciclo biológico (Figura 2).

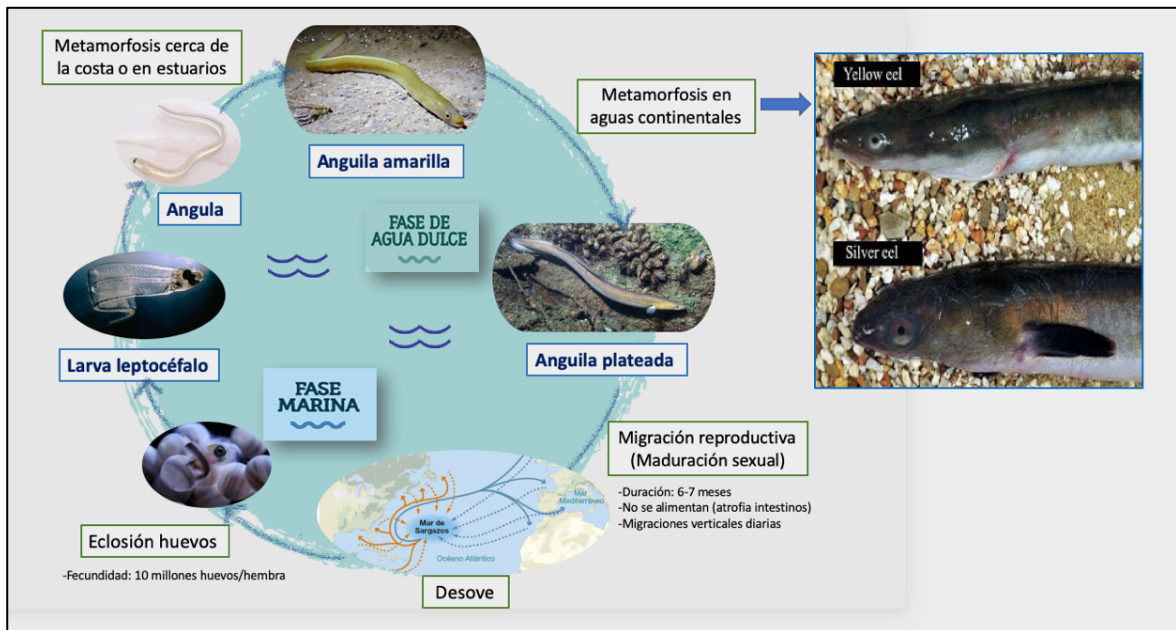


Figura 2. Esquema del ciclo biológico de la anguila con los distintos estadios de desarrollo.

1.3. IMPORTANCIA SOCIOECONÓMICA DE LA ANGUILA EUROPEA

1.3.1. Producción y estado actual de las poblaciones

La producción de anguila depende del suministro (captura y cría hasta talla comercial) de anguilas silvestres, ya que ningún laboratorio ha conseguido cerrar el ciclo vital completo obteniendo adultos de anguila europea. Según datos facilitados por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en el año 2017 la producción mundial de las diferentes especies de anguila se situaba cerca de 260 mil toneladas, generando 2042 millones de dólares. China es, con creces, el país que más anguila produce y consume a nivel global, seguido de Japón e Indonesia. En Europa, el mismo año se produjeron 4887 toneladas de anguila europea, destacando como países productores los Países Bajos, Alemania, Italia, Dinamarca y en último y quinto lugar, España. La producción española a nivel comercial de 2018, localizada esencialmente en la Comunidad Valenciana, fue de 360 toneladas (APROMAR, 2020).

Hasta la década de los años 70, la anguila era una especie relativamente abundante en todas las cuencas hidrográficas de la Península Ibérica, con importantes mercados locales en Galicia, País Vasco, Cataluña y Comunidad Valenciana. También se exportaba a países centroeuropeos, sobre todo a Alemania. Durante los años 80, muestreos realizados a gran escala en nuestro país revelaron que la anguila europea se había extinguido en más del 80% de los ríos (Lobón-Cerviá *et al.*, 1986; Sostoa y Lobón-Cerviá, 1986).

Según el Consejo Internacional para la Exploración del Mar (ICES, por sus siglas en inglés) (2013), las poblaciones naturales de *Anguilla anguilla* han sufrido un descenso del 99% con respecto a los registros de la década de los años 60, lo que ha situado a la especie fuera de los límites biológicos de seguridad. De hecho, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ya la consideró en 2008 como especie en peligro crítico. Las principales causas, de origen antropogénico, por las que se debe este declive tan dramático de las poblaciones, son:

- La sobreexplotación pesquera. Los índices actuales de reclutamiento de angulas en Europa (Figura 3), la pesca furtiva y el comercio ilegal están situando a la especie fuera de los límites biológicos (Fernández Delgado, 2013; Brufao Curiel, 2020).

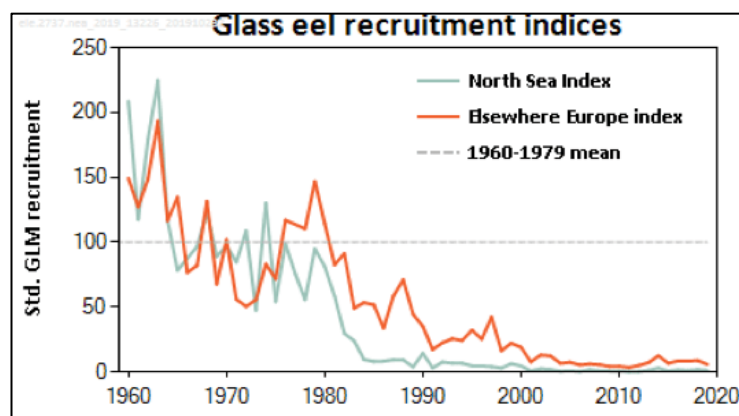


Figura 3. Índice de reclutamiento de angula. Fuente: ICES, 2019.

- La existencia de **barreras físicas**, como presas, diques y centrales hidroeléctricas, que impiden que las anguilas remonten los tramos altos de los ríos (Elvira, 1991).
- La **contaminación** de las aguas, debida a plaguicidas y efluentes provenientes de núcleos urbanos, degrada el hábitat natural de esta especie. Además, la anguila es capaz de acumular en su tejido adiposo residuos organoclorados y metales pesados durante todo su ciclo de vida, lo que afecta a su función reproductora (Neto *et al.*, 2011).

Entre otras posibles causas, también se pueden mencionar;

- **Patologías** como la vibriosis (*Vibrio anguillarum*) y la infestación por *Anguillicola crassus*, nematodo introducido en Europa en los años 80 en anguilas japonesas que causa una pérdida de la funcionalidad de la vejiga natatoria, y, en consecuencia, aumenta el gasto energético durante la migración (Kirk, 2003).
- **Cambio climático:** podría influir en las corrientes oceanográficas como la del Golfo de México. (Knights, 2003; Friedland *et al.*, 2007).

Ante tal situación de emergencia, la Comisión Europea (CE) aprobó hace más de una década unos Planes de Gestión específicos (Reglamento Nº 1100/2007) para cada Estado miembro, que incluyen medidas para la recuperación de la especie, con el objetivo general de preservar un 60% de los ejemplares que constituirían el reclutamiento anual. Cada país adoptó medidas que incluyeron la reserva de un porcentaje de las capturas anuales para dedicarlas a la repoblación de las aguas interiores europeas (con el fin de aumentar el índice de fuga de anguilas plateadas al mar), la reducción de la pesca profesional y/o recreativa, o la desconexión temporal de las turbinas de producción hidroeléctrica, entre otras. Además, la anguila europea se incluyó en marzo de 2009 en el Anexo II de CITES (Convención para el Comercio Internacional de Especies Amenazadas), por lo que se interrumpió la exportación de angulas desde la Unión Europea (UE) a países terceros (China principalmente) reduciendo la presión sobre la especie.

1.4. INDUCCIÓN ARTIFICIAL DE LA MADURACIÓN SEXUAL PARA LA CONSERVACIÓN Y EFICACIA REPRODUCTIVA

En este contexto, la reproducción en cautividad de la anguila se considera una necesidad para reducir la presión sobre las poblaciones salvajes (lo que repercutiría positivamente en su conservación) y permitir un abastecimiento de forma sostenible en el tiempo de angulas a las piscifactorías.

Actualmente, es posible obtener tanto huevos como esperma de anguila y realizar fecundaciones in vitro (Butts *et al.*, 2014; Vílchez *et al.*, 2014; Asturiano *et al.*, 2016). A los animales reproductores se les aplica tratamientos hormonales para conseguir la maduración sexual, puesto que no maduran de forma natural en cautividad. Los tratamientos que se emplean actualmente están basados en el método desarrollado por Ohta *et al.* (1996, 1997) en anguila japonesa, con el que se ha podido inducir la maduración sexual artificial tanto en machos como en hembras de anguila europea (Figura 4). Sin embargo, la duración de estos tratamientos puede prolongarse hasta 2-5 meses y su coste es elevado. Esto último hace que, aunque se haya conseguido recientemente obtener angulas de anguila japonesa (*Anguilla japonica*) con regularidad (Tanaka *et al.*, 2003; Okamura *et al.*, 2014), su producción a nivel comercial siga siendo inviable. Además, los resultados evidencian una alta variabilidad en la calidad de los gametos producidos, así como altas mortalidades durante el desarrollo del embrión, bajos porcentajes de eclosión, aparición de deformidades y baja supervivencia en la fase larvaria. Así, pese a los experimentos realizados y los avances obtenidos, parece que aún se desconocen aspectos básicos relacionados con el control de la reproducción, debido a la compleja fisiología reproductiva de las anguilas (Asturiano, 2020).

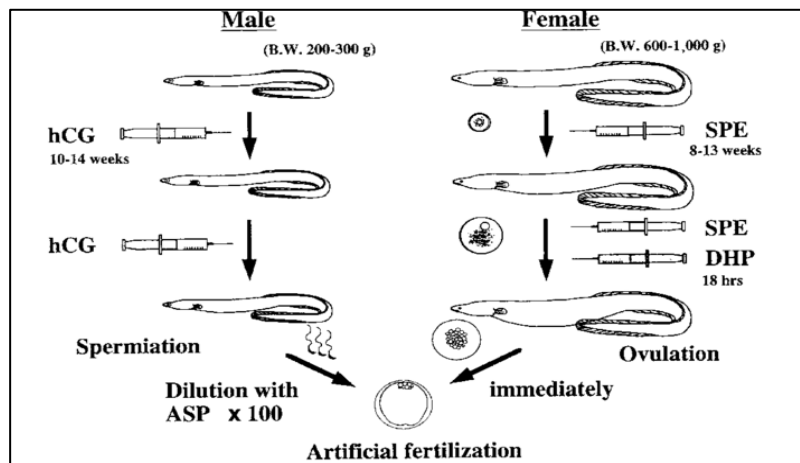


Figura 4. Esquema del protocolo de inducción hormonal para la maduración de machos y hembras de anguila japonesa. Fuente: Ohta *et al.* (1997).

En cuanto a los estudios con machos de anguila europea, éstos presentan inicialmente (en cautiverio, siendo inmaduros) testículos en los que solo se encuentran espermatogonias de tipo A y tipo B tempranas (SPGA y SPGB_{tempranas}) (Peñaranda *et al.*, 2016; Morini *et al.*, 2017), con lo que, para inducir la espermatogénesis, la espermiogénesis y la espermiación, se requiere la administración intraperitoneal durante semanas de gonadotropina coriónica humana (hCG), purificada de orina de mujeres embarazadas o bien de formas recombinantes (Müller *et al.*, 2004; Gallego *et al.*, 2012). Esta es la hormona más utilizada en machos de anguila europea en 1.5 UI/g de pez, y ha generado buenos resultados en términos de cantidad, densidad y movilidad espermática (Pérez *et al.*, 2000), en especial cuando se utiliza hCG recombinante (hCG_{rec}) (Gallego *et al.*, 2012). Pese a ello, estos resultados no garantizan la eficacia reproductiva de los espermatozoides, pues deberían considerarse también los factores epigenéticos no controlados, que podrían ser la causa de las bajas tasas de fertilización y de supervivencia de los embriones y las larvas.

Por todo ello, resulta de vital importancia apostar por la mejora de los métodos tradicionales de inducción de la maduración sexual, así como por el empleo de tratamientos alternativos mediante los cuales sea posible conseguir una mayor producción de esperma de buena calidad y de forma más económica, considerando tanto los costes de los tratamientos hormonales como el volumen de esperma de alta calidad producido.

1.5. MANEJO DE LA TEMPERATURA COMO ALTERNATIVA DE MEJORA DE LOS TRATAMIENTOS HORMONALES

Durante los últimos años, diversos investigadores han puesto el foco de atención sobre el uso que podrían tener los factores ambientales aplicados en combinación con tratamientos hormonales estándar para la maduración de la anguila europea (Mazzeo *et al.*, 2014; Peñaranda

et al., 2016; Herranz-Jusdado *et al.*, 2018; Asturiano, 2020). Aunque los conocimientos sobre la migración reproductiva transatlántica son limitados, parece probable que el desarrollo gonadal ocurra durante varios meses y a temperaturas frías, mientras que el desove y la espermiación se produzcan en agua con temperaturas más altas (Aarestrup *et al.*, 2009; Palstra and Van den Thillart, 2009).

En este sentido, se han llevado a cabo varios experimentos que incluyen bajas temperaturas. Peñaranda *et al.* (2016) demostraron que éstas pueden retrasar la espermatogénesis. De hecho, los peces mantenidos a 10 °C detuvieron su maduración en el estadio SPG1 (con una gran proporción de SPGA), y no se observaron otros signos de maduración hasta que se aumentó la temperatura (por encima de un umbral de 15 °C). Ese aumento de la temperatura provocó variaciones en la expresión génica de los enzimas esteroidogénicos y, a su vez, un cambio en la vía esteroidogénica desde los andrógenos (sintetizados incluso a bajas temperaturas, ligados a la expresión génica de otros enzimas esteroidogénicos) hacia la síntesis de estrógenos y progestágenos, permitiendo los siguientes pasos de la maduración testicular. Esto se propuso como parte del sistema endocrino que regula la maduración de los testículos durante la migración reproductiva de la anguila europea a su zona de desove en el Atlántico occidental. Pero estos resultados abrieron las siguientes preguntas: si la producción de andrógenos (11-ketotestosterona, 11-KT) inducida por la administración de gonadotropinas exógenas está controlando la proliferación de SPGA, y el pico de 11-KT es muy corto en el tiempo cuando se usan altas temperaturas con las anguilas maduras, ¿Tiene el tejido testicular de la anguila tiempo suficiente para llevar a cabo la proliferación celular completa cuando se utilizan tratamientos con hCG y altas temperaturas? ¿O se está limitando la capacidad de proliferación de SPGA del testículo (y a su vez la producción de esperma) por el uso de esta temperatura alta, induciendo picos de andrógenos y estradiol (E2) demasiado tempranos, y estimulando una diferenciación demasiado rápida de las espermatogonias y el resto de la espermatogénesis?

La eliminación de la inhibición dopaminérgica de la pubertad (Vidal *et al.* 2004) parece inducida por los cambios en las condiciones ambientales que encuentran las anguilas plateadas que migran (Dufour *et al.*, 2003; Sébert *et al.*, 2008). El término pretratamiento (a menudo llamado acondicionamiento) define el uso de factores ambientales u hormonales que intentan inducir las primeras fases del proceso de maduración y el desarrollo gonadal o, al menos, aumentar la sensibilidad de las anguilas a los tratamientos hormonales aplicados posteriormente. La aplicación de estos pretratamientos puede ser especialmente importante en el caso de las anguilas criadas en cautividad, que no se han enfrentado a cambios en las condiciones

ambientales (Palstra and Van den Thillart, 2009). Varios factores, incluyendo la temperatura, la salinidad, la natación, la administración de andrógenos e incluso la alimentación de los reproductores, han sido utilizados como parte de los pretratamientos aplicados a las anguilas (Asturiano *et al.*, 2020).

En un estudio anterior, Rozenfeld *et al.* (2019) compararon los efectos de pretratamientos de 2 semanas utilizando agua de mar a 10 o 20 °C (sin la aplicación de ningún tratamiento hormonal). Los autores describieron cómo los machos de anguila mantenidos a 10 °C mostraron mayores niveles plasmáticos de testosterona (T) y 11-KT, y la evaluación histológica evidenció que el pretratamiento con agua de mar fría indujo la sincronización y el aumento de la proliferación y la diferenciación de las espermatogonias hasta el estadio de células diferenciadas de tipo A, mientras que evitó el inicio del proceso de meiosis y la maduración de estas células, como ocurrió en los peces mantenidos a 20 °C. En conjunto, estos resultados indicaron que un pretratamiento a baja temperatura (similar a la temperatura media experimentada por las anguilas europeas en las primeras etapas de su migración oceánica) puede activar el eje cerebro-hipófisis-gónada, lo que podría facilitar la maduración posterior mediante métodos hormonales estándares. Sin embargo, en este punto se plantean nuevas preguntas: ¿Podría un pretratamiento a baja temperatura aumentar la producción de esperma una vez administrado el tratamiento hormonal clásico? ¿Se asemejaría más el proceso a la experiencia de los reproductores en la naturaleza y se induciría un mejor perfil epigenético? ¿Sería posible obtener un mejor esperma tanto en términos de eficacia reproductiva como de rendimiento económico, aplicando un pretratamiento térmico?

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo, enmarcado dentro del proyecto EELGONIA (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Proyectos de I+D+i «Retos investigación» RTI2018-096413-B-I00), fue el de evaluar el uso de pretratamientos de agua marina fría (10°C) durante 1, 2 y 4 semanas (previos a la inducción hormonal clásica de la maduración sexual de la anguila europea), con la intención de estimular la espermatogénesis de esta especie. Los efectos *in vivo* de estos pretratamientos se estudiaron tanto en el proceso de maduración del tejido testicular como en el rendimiento reproductivo de los machos. Así, los objetivos específicos a desarrollar fueron:

- I. Evaluación de los efectos sobre los siguientes parámetros biométricos: índice ocular (IO), índice de la aleta (IA), índice hepatosomático (IHS) e índice gonadosomático (IGS).

- II. Evaluación de los niveles plasmáticos de esteroides sexuales (andrógenos: T, y 11-KT; estrógenos: E2).
- III. Identificación histológica de tipos celulares (espermatogonias indiferenciadas tipo A, espermatogonias diferenciadas tipo A y espermatogonias tipo B tempranas; SPGA_{ind}, SPGA_{dif} y SPGB_{tempranas}) y cuantificación de los mismos tras los pretratamientos.
- IV. Evaluación de la cantidad y calidad de los gametos producidos por los machos de anguila europea, concretamente: volumen de esperma, porcentaje de células móviles totales y de células móviles progresivas, y parámetros de velocidad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MANTENIMIENTO DE LOS PECES

Un lote de 88 machos de anguila europea, procedentes de la piscifactoría Valenciana de Acuicultura, S.A. (Puzol, Valencia) fueron trasladados a las instalaciones de acuicultura de la Universitat Politècnica de València (UPV). Los peces (20 peces/tratamiento; $104,08 \pm 3,94$ g) se distribuyeron en 8 acuarios de 150 L equipados con un sistema de recirculación cada uno y un sistema de control de la temperatura (con calefactores y refrigeradores, Figura 5). Estos estuvieron completamente cubiertos durante todo el transcurso de la prueba, para mantener al máximo posible una oscuridad constante que redujese el estrés en los peces. El nivel de oxígeno y el pH fueron de 7-8 mg/L y 8,2, respectivamente. Los peces no fueron alimentados durante todo el transcurso de la prueba y su manejo fue acorde al establecido por la UE (véase el apartado de Declaración Ética).



Figura 5. Alojamiento de los peces.

3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Antes del tratamiento hormonal, las anguilas se mantuvieron inicialmente durante 3-4 días en agua dulce a 20 °C (aproximadamente las mismas condiciones utilizadas en la piscifactoría). Después, durante 10 días se cambiaron progresivamente a agua de mar a 10 °C (excepto el grupo control, que se cambió a agua marina, pero se mantuvo a 20 °C). Antes de aumentar la salinidad y recibir cualquier pretratamiento, se sacrificaron 8 machos (mediante anestesia con benzocaína y decapitación) como control al principio del experimento (Figura 6).

Se aplicaron pretratamientos de agua marina fría durante 1, 2 y 4 semanas a grupos de 20 machos (2 acuarios/pretratamiento; 10 peces/acuario). Una vez finalizado cada pretratamiento, se sacrificaron 8 peces por grupo (4 peces/acuario) para el muestreo. La temperatura del agua del resto de los machos (12 peces/pretratamiento) se incrementó a 20 °C en 3-4 días y desde entonces, comenzaron a recibir la inducción hormonal tradicional, que consistía en la administración semanal de hCG_{rec} (Ovitrelle, Madrid, España, 1,5 UI/g de pez) hasta completar las 15 semanas de experimento en total en cada caso.

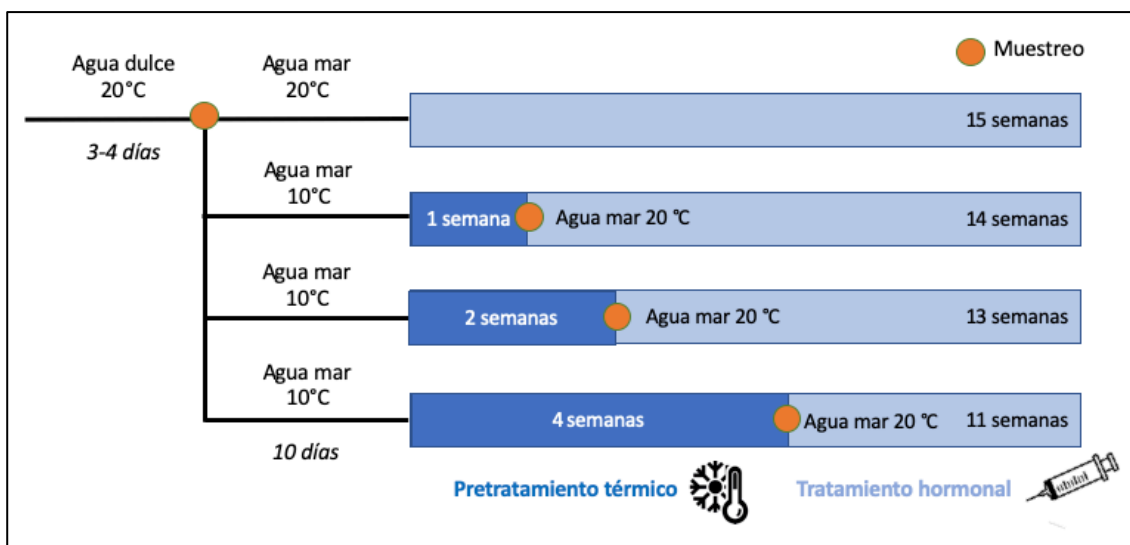


Figura 6. Esquema del diseño experimental. Los peces se mantuvieron en agua dulce a 20 °C durante 3-4 días. Después, durante 10 días, se cambiaron a agua de mar a 20 °C (grupo control) o a 10 °C (grupos de pretratamiento térmico). Los pretratamientos térmicos se aplicaron durante 1, 2 y 4 semanas y tras estos, se aumentó la temperatura a 20 °C, antes de aplicar semanalmente el tratamiento hormonal.

3.3. MEDICIONES REALIZADAS

A continuación, se realiza una descripción de las medidas y toma de muestras obtenidas de los animales durante el periodo experimental.

3.3.1. Parámetros biométricos

Las mediciones biométricas incluyeron: el peso y la longitud totales del pez, los diámetros oculares vertical y horizontal, el peso de los testículos, el peso del hígado y la longitud de las aletas pectorales. A partir de estas mediciones, se calcularon, por un lado, el IO (Pankhurst, 1982) y el IA (Durif *et al.*, 2006) como: (diámetro del ojo/longitud total) x 100 y (longitud de la aleta/ longitud total) x 100. Por último, se calcularon el IHS y el IGS de acuerdo con las siguientes expresiones: (peso del hígado/peso total) x 100 y (peso de la gónada/peso total) x 100.

3.3.2. Análisis de esteroides en plasma

De todos los peces sacrificados, se tomaron muestras de sangre de la vena caudal, las cuales se guardaron en viales heparinizados y se centrifugaron (3500 rpm, 15 min). El plasma sanguíneo se almacenó a -80°C para los análisis de esteroides. Para determinar las concentraciones de andrógenos (T, 11-KT) y de E2 se emplearon kits comerciales de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), siguiendo los métodos desarrollados para la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Rodríguez *et al.*, 2000, 2005; Molés *et al.*, 2011) previamente validados para plasma de anguila (Peñaranda *et al.*, 2018). Los límites mínimos de detección (80% *binding*) fueron de 0,0050 ng/ml para la 11-KT, 0,0336 ng/ml para la T y 0,5788 ng/ml para la E2. Los coeficientes de variación intraensayo fueron del 1,55% (n=3) para el 11-KT, del 6,07% (n=3) para la T y del 0,05% (n=4) para el E2.

3.3.3. Histología testicular

Las muestras de testículo se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 10% diluido en PBS (pH = 7,4; 10% PFA-PBS) para su análisis histológico. Luego, se deshidrataron en porcentajes crecientes de etanol y se incrustaron en resina (Technovit 7100) según las instrucciones del fabricante. Se cortaron secciones de 5 µm de grosor con un microtomo Microm HM325 y se tiñeron con azul de toluidina al 1 %. Seguidamente, se observaron los portaobjetos con un microscopio Nikon Eclipse E-400 y se tomaron fotografías con una cámara Nikon DS-5M acoplada al microscopio (Nikon, Tokio, Japón). Los tipos celulares se clasificaron siguiendo la descripción sugerida por Schulz *et al.* (2010), también descrita por Rozenfeld *et al.* (2019). Los tipos celulares observados fueron: SPGA_{ind}, SPGA_{dif} y SPGB_{tempranas} (Figura 8).

3.3.4. Parámetros espermáticos

Las muestras de esperma se recogieron 24 horas después de la administración semanal de inyección hormonal, para obtener un esperma de mayor calidad. La zona genital de los peces se limpió con agua destilada y se secó minuciosamente con papel, para evitar la contaminación con heces, orina o agua de mar y consecuente inactivación del esperma. El esperma se recogió realizando un masaje abdominal suave desde las aletas pectorales hasta la abertura del área genital, y con la ayuda de una bomba de vacío se recogió en tubos Falcon de plástico (Herranz-Jusado *et al.*, 2019). Posteriormente, se evaluó el volumen de esperma (ml/100 g de pez) y las muestras se diluyeron 1:9 (esperma:diluyente) en medio P1 (en mM: NaCl 125, NaHCO₃ 20, MgCl₂ 2.5, CaCl₂ 1, KCl 30; pH ajustado a 8,5, como describe Peñaranda *et al.*, 2010) y se mantuvieron a 4°C hasta la posterior evaluación espermática.

Dicha evaluación se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Gallego *et al.* (2013a). Cada muestra de esperma se activó mezclando 0,5 µL de muestra de esperma diluida en P1 con 4,5 µL de agua de mar artificial (en mM: NaCl 354,7, MgCl₂ 52,4, CaCl₂ 9,9, Na₂SO₄ 28,2, KCl 9,4, en agua destilada) con 2% (p:v) de albúmina de suero bovino (BSA), pH ajustado a 8,2 y osmolaridad de 1100 mOsm/kg. La activación de los espermatozoides se realizó en una cámara de recuento ISAS Spermtrack 10 (Proiser R+D, S.L., España) en un microscopio de contraste de fase con un aumento de 10× (Nikon Eclipse 80i) conectado a un ordenador con una cámara ISAS 782M (Proiser R+D, S.L., España), grabando 60 fotogramas por segundo. Todas las muestras se analizaron 15 s después de la activación, utilizando el software CASA módulo ISAS v1 (Proiser R+D, S.L., España).

Los parámetros que se consideraron para el análisis fueron: el porcentaje de espermatozoides móviles (MOT, %), la movilidad progresiva (pMOT, %), la velocidad curvilínea (VCL, µm/s), la velocidad rectilínea (VSL, µm/s) y la velocidad media de la trayectoria (VAP, µm/s).

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon las medias y los errores estándar de los índices biométricos, de los niveles de esteroides en plasma y de los parámetros de calidad del esperma. Se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para verificar la normalidad de la distribución de los datos y la homogeneidad de la varianza, respectivamente. Para analizar los datos (distribución normal) entre grupos se utilizaron el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la prueba t-Student. Mediante la prueba de Student-Newman-Keuls (SNK), fueron detectadas diferencias significativas entre los tratamientos (P<0,05). En el caso de poblaciones con distribución no

normal o cuando falló la prueba de igualdad de varianzas, se utilizó el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis de un factor. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software IBM SPSS statistics for Windows versión 25.0 (Armonk, NY, EE.UU.).

4. RESULTADOS

4.1. PARÁMETROS BIOMÉTRICOS

Los IO e IA (Figura 7A y B, respectivamente) de los machos pretratados durante 1, 2 y 4 semanas fueron significativamente superiores a los de los machos del grupo control. Asimismo, los machos de los grupos de pretratamiento de 1, 2 y 4 semanas mostraron valores de IHS significativamente superiores a los del grupo control (Figura 7C). Sin embargo, los IGS observados en este grupo fueron significativamente superiores a los del grupo de 1 semana de pretratamiento y no se hallaron diferencias significativas entre los grupos de pretratamiento de 2 y 4 semanas (Figura 7D).

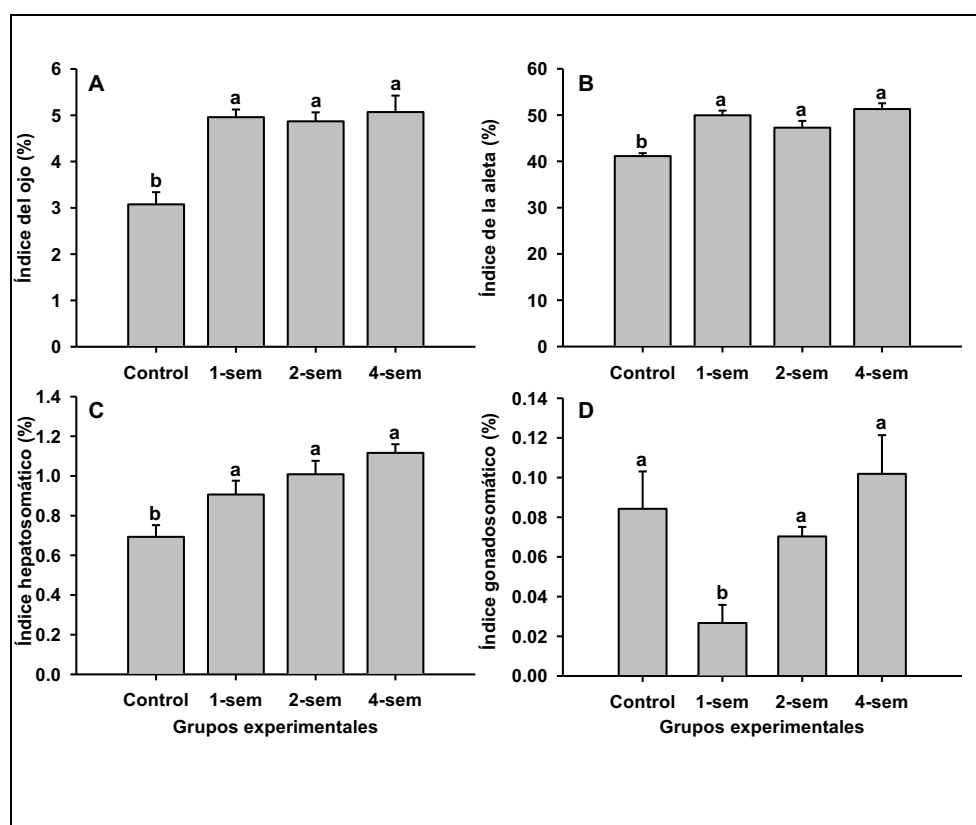


Figura 7. Resultados de los parámetros biométricos. (A) Índices ocular, (B) de la aleta, (C) hepatosomático y (D) gonadosomático de los grupos experimentales (control (n=6), 1 (n=8), 2 (n=8) y 4 (n=8) semanas de pretratamiento). Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre pretratamientos para cada parámetro.

4.2. ANÁLISIS DE ESTEROIDES EN PLASMA

En cuanto a los niveles plasmáticos de E2 (Figura 8), no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes pretratamientos, a excepción de los niveles superiores encontrados en los machos del grupo de pretratamiento de 4 semanas, en comparación con los de los machos del grupo de pretratamiento de 1 semana.

Los machos pertenecientes al grupo de 4 semanas de pretratamiento mostraron la mayor concentración de niveles plasmáticos de T, la cual fue significativamente diferente en comparación con los del grupo control; mientras que los niveles de este esteroide en plasma en los grupos de pretratamiento de 1 y 2 semanas reflejaron valores intermedios.

Los valores de 11-KT mostraron una tendencia similar a la de los niveles de T, pero en concentraciones inferiores, siendo los machos del grupo de pretratamiento de 4 semanas los que tuvieron niveles significativamente más altos que los de los machos de los grupos control y pretratamiento de 1 semana.

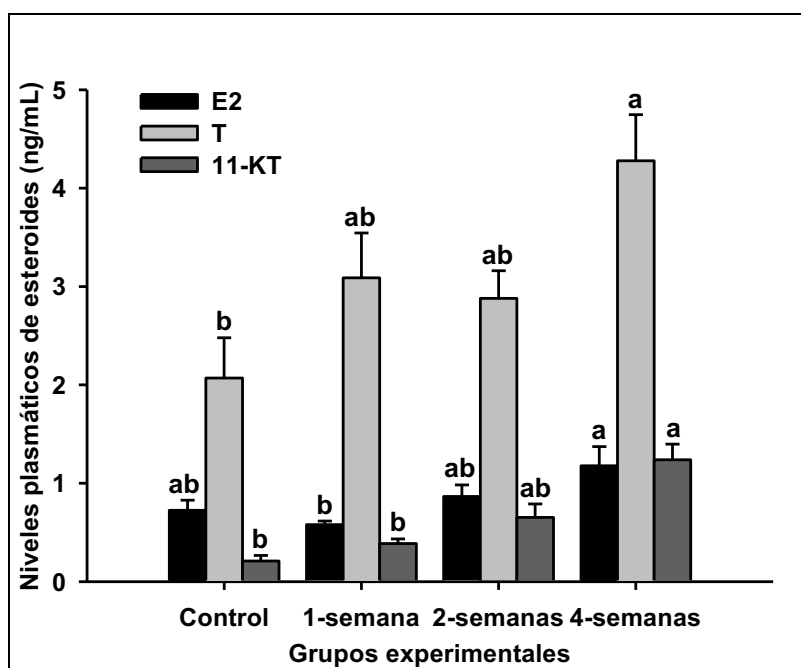


Figura 8. Resultados de niveles de esteroides en plasma. Concentración plasmática de 17 β -estradiol (E2), testosterona (T) y 11-ketotestoterona (11-KT) de la sangre de los peces de los grupos experimentales control (n=6), 1 (n=8), 2 (n=8) y 4 (n=8) semanas de pretratamiento. Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) entre pretratamientos para cada esteroide.

4.3. HISTOLOGÍA TESTICULAR

Los tipos celulares encontrados en los cortes histológicos fueron: espermatogonias indiferenciadas tipo A (SPGA_{ind}, Figura 9A), espermatogonias diferenciadas tipo A (SPGA_{dif}, Figura 9B) y espermatogonias tempranas tipo B (SPGB_{tempranas}, Figura 9C). Los testículos de los grupos control (Figura 9D) y de 1 semana de pretratamiento estaban compuestos principalmente por células SPGA_{ind} y SPGA_{dif}, mientras que los testículos de los machos pretratados durante 2 (Figura 9E) y 4 semanas (Figura 9F) mostraban células SPGA_{dif} con SPGB_{tempranas}. El análisis del tejido testicular de los machos de los grupos control y pretratamiento de 1 semana reveló porcentajes significativamente mayores de células SPGA_{ind} y SPGA_{dif} que de SPGB_{tempranas} (Figura 10A y B, respectivamente). Por otro lado, y tras recibir los pretratamientos de 2 y 4 semanas, los machos de estos dos grupos mostraron una proporción significativamente mayor de células SPGA_{dif} (superior al 70%) en comparación con los porcentajes de SPGA_{ind} que representaron menos del 30% del total de células (Figura 10C y D, respectivamente).

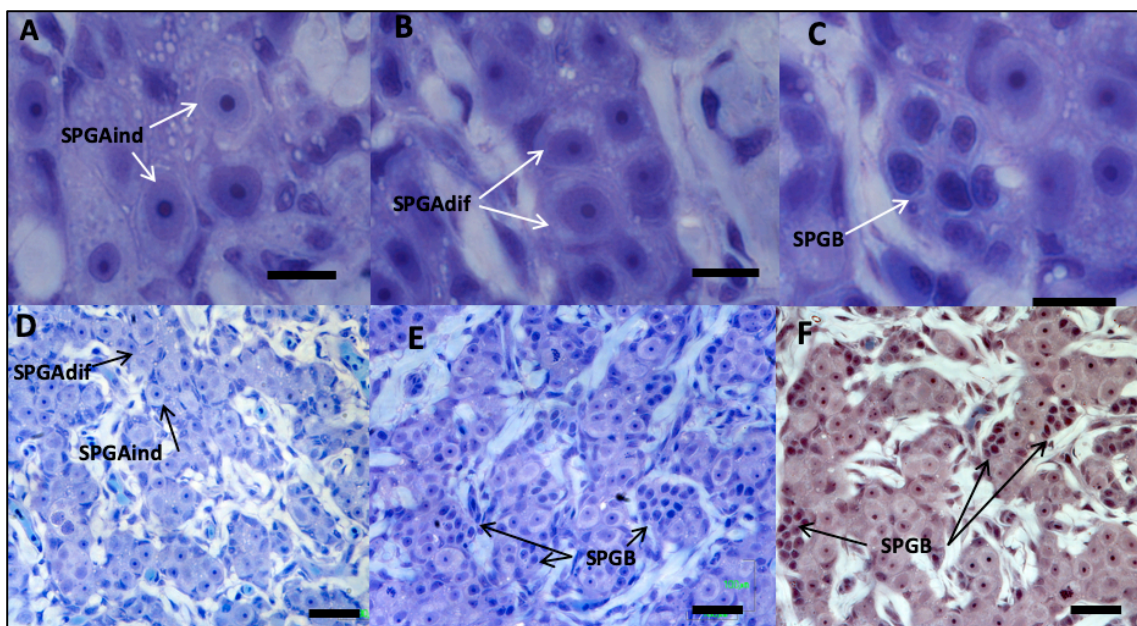


Figura 9. Tipos celulares presentes en las muestras de testículo. (A) espermatogonias indiferenciadas tipo A (SPGA_{ind}); (B) espermatogonias diferenciadas tipo A (SPGA_{dif}) y (C) espermatogonias tempranas tipo B (SPGB_{tempranas}); (D) Testículo de macho control; (E) Testículo de macho pretratado con agua marina fría a 10 °C durante 2 semanas; (F) Testículo de macho pretratado con agua marina fría a 10 °C durante 4 semanas; Escala: A, B, C = 10 μ m; D, E, F: 25 μ m.

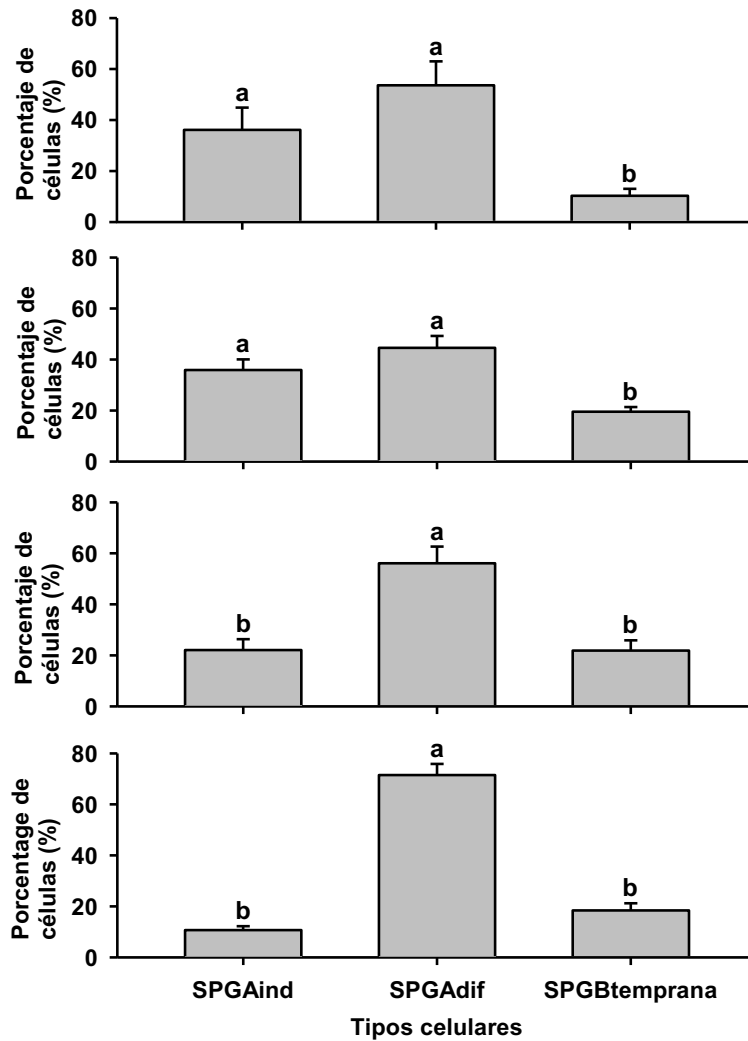


Figura 10. Recuento de células histológicas. Porcentajes de espermatogonias indiferenciadas tipo A (SPGA_{ind}), espermatogonias diferenciadas tipo A (SPGA_{dif}) y espermatogonias tempranas tipo B (SPGB_{tempranas}) en los testículos de (A) los grupos control (n=6), (B) 1 (n=8), (C) 2 (n=8) y (D) 4 (n=8) semanas de pretratamiento térmico. Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los pretratamientos para cada tipo celular.

4.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA

4.4.1. Producción de esperma

Aunque los volúmenes de esperma no mostraron diferencias significativas entre sí y entre los diferentes pretratamientos, hubo una respuesta dependiente del tiempo al tratamiento hormonal, teniendo una respuesta más rápida a la hCG_{rec} en los grupos con pretratamientos con una duración más prolongada (Figura 11). Los machos del grupo control comenzaron a producir espermatozoides en la semana 6 de tratamiento hormonal y mostraron un aumento progresivo. Los valores de volumen espermático estuvieron por debajo de los 4 ml hasta la semana 12-13 y dieron los resultados más altos en las últimas semanas del experimento. Los machos del grupo

de 1 semana de pretratamiento revelaron inicialmente una tendencia similar a la de los machos del grupo control, alcanzando su máximo de espermiación en las semanas 9 y 11, seguido de un descenso progresivo hasta el final del experimento. Los machos del grupo de 2 semanas de pretratamiento iniciaron la producción de esperma en la semana 5, mostraron una tendencia creciente hasta la semana 11 y cesaron la producción de esperma una semana antes del final del experimento. Los machos pretratados durante 4 semanas empezaron a producir esperma después de sólo 4 semanas de tratamiento hormonal, y alcanzaron una producción superior a 4 ml de esperma. En este punto, la producción de esperma disminuyó rápidamente de la semana 11 a la semana 12 del experimento. Los valores de volumen espermático de una semana no estaban disponibles, lo cual explica la falta de un valor o punto en todos los grupos (Figura 11).

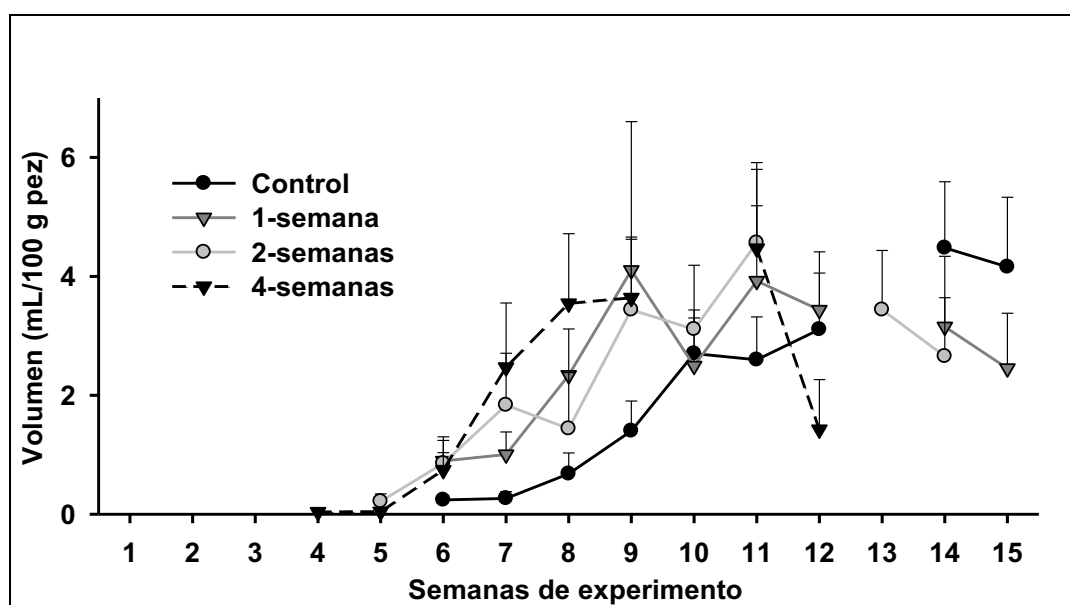


Figura 11. Evolución de la producción de esperma. Volumen de esperma (ml/100 g de pez) producido de los grupos experimentales (control, 1, 2 y 4 semanas de pretratamiento térmico) en cada semana de tratamiento hormonal. Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media).

4.4.2. Movilidad y velocidad espermática

Tanto los machos del grupo control como los pretratados mostraron un aumento gradual de las movilidades espermáticas total y progresiva (Figura 12A y B, respectivamente), aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales durante las primeras semanas. En la semana 10, se produjo un aumento significativo de las movilidades espermáticas del grupo control en comparación con todos los grupos pretratados, alcanzando valores significativamente superiores a los mostrados por los machos pretratados hasta el final del experimento.

En cuanto a los parámetros cinéticos de los espermatozoides, los machos del grupo control y los pretratados registraron perfiles VCL, VSL y VAP similares (Figura 13 A, B y C, respectivamente) a los observados en las moviidades espermáticas. Hasta la semana 6 y 7, los machos pretratados mostraron un aumento progresivo de los parámetros cinéticos más rápido que el observado en el grupo control, alcanzando diferencias significativas en algunos casos. En la semana 8, el grupo control registró un aumento rápido y significativo, alcanzando valores de velocidad más altos. Los machos control mantuvieron estos parámetros cinéticos más altos (en comparación con los machos pretratados) hasta el final del experimento.

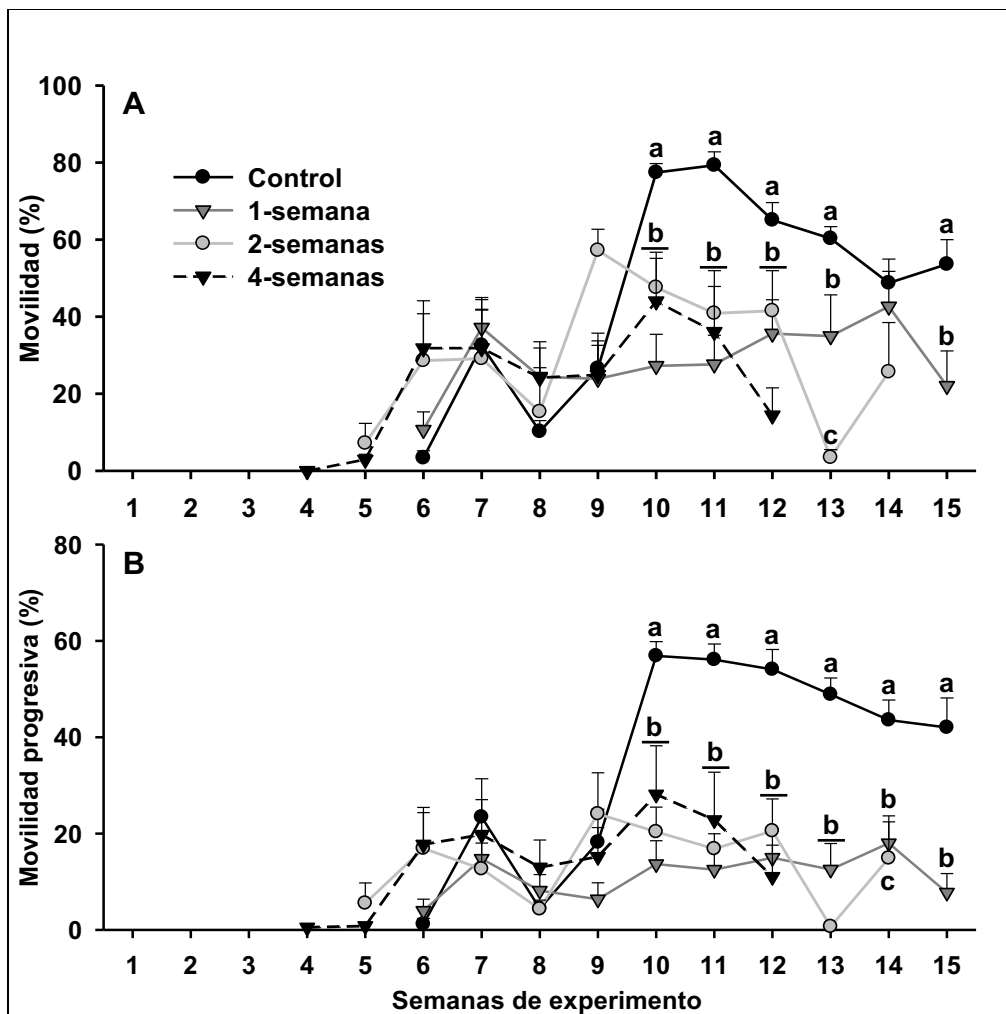


Figura 12. Evolución de los parámetros de movilidad espermática. Porcentaje de (A) células móviles totales (MOT, %) y (B) células móviles progresivas (pMOT, %) entre los grupos experimentales (control, 1, 2 y 4 semanas de pretratamiento térmico). Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los pretratamientos en cada semana de tratamiento hormonal.

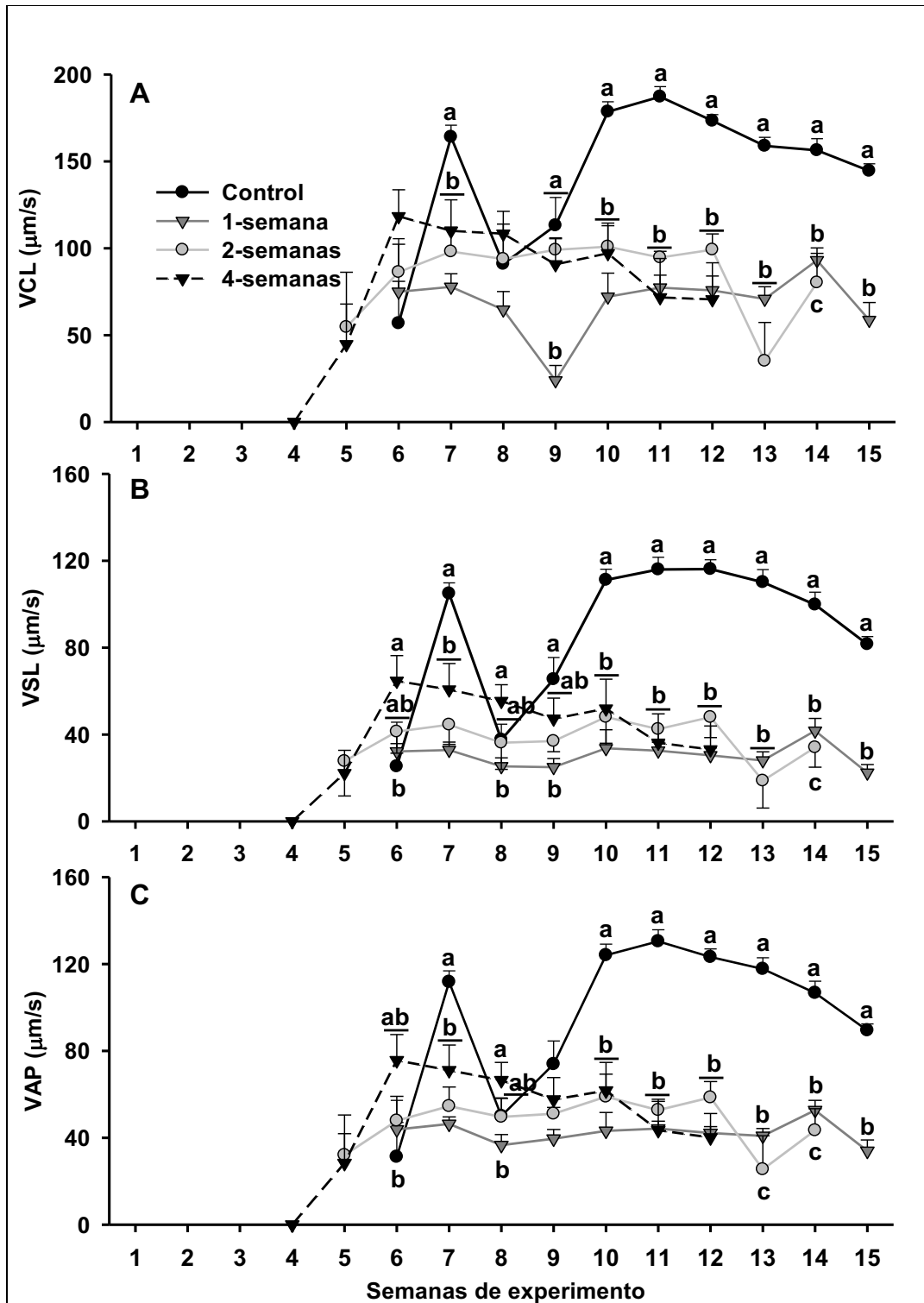


Figura 13. Evolución de los parámetros de velocidad de los espermatozoides. Velocidad según (A) trayectoria curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), (B) trayectoria rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$) y (C) trayectoria media (VAP, $\mu\text{m/s}$) entre los grupos experimentales (control, 1, 2 y 4 semanas de pretratamiento térmico). Los datos se expresan como media \pm EEM (error estándar de la media) y letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los pretratamientos en cada semana de tratamiento hormonal.

5. DISCUSIÓN

5.1. Parámetros biométricos, niveles de esteroides en plasma e histología

El presente estudio reveló que el pretratamiento térmico con agua marina fría inicia la maduración de los machos de anguila europea, ya que se observó un aumento significativo del IO, IA y IHS cuando se trasladaron las anguilas a agua de mar a 10 °C. De hecho, el aumento del tamaño de los ojos, de la longitud de las aletas y del peso del hígado son signos típicos en el inicio de la pubertad de la anguila, y que les sirven como preparación a las condiciones ambientales oceánicas a las que se enfrentarán durante su migración reproductiva (Dufour *et al.*, 2003; Sébert *et al.*, 2008). En el caso de las hembras, Mazzeo *et al.* (2014) observaron un aumento del IA la semana previa a la administración del tratamiento hormonal, que también fue promovido por un pretratamiento térmico a 10 °C.

En cuanto al IGS, en este trabajo no siguió la misma tendencia creciente que el resto de índices anteriormente mencionados. Los machos del grupo control no se diferenciaron significativamente de ninguno de los grupos pretratados, excepto de los machos pretratados durante 1 semana, que registraron un IGS significativamente menor. Esto podría deberse al alto contenido en grasa encontrado durante el muestreo en los testículos de las anguilas del grupo control, lo que se confirmó además en las secciones histológicas. Así pues, este hecho sugiere que parte del tejido muestreado podría ser tejido adiposo en lugar de testículo.

Con respecto al análisis histológico, los porcentajes más altos de células SPGA_{Ind} y SPGA_{dif} se encontraron en los testículos de los machos del grupo control y de los pretratados durante 1 semana. Sin embargo, los machos pretratados durante 2 y 4 semanas mostraron una mayor proporción de células SPGA_{dif} en comparación con los tipos celulares SPGA_{Ind} y SPGB_{tempranas}. Rozenfeld *et al.* (2019) reportaron resultados similares, mostrando secciones de testículos que contenían mayores proporciones de células SPGA_{dif} en machos de anguila (sin tratamiento hormonal) después de 2 semanas de pretratamiento a 10 °C. Por lo tanto, estos resultados coinciden con la conclusión de que el pretratamiento con agua de mar fría promueve la diferenciación y proliferación de las células SPGA_{Ind} en células SPGA_{dif}.

Por otro lado, tal y como sugieren Schulz *et al.* (2010), la causa de tales resultados histológicos y parámetros biométricos fueron probablemente los niveles de esteroides en plasma. Según indican algunos estudios, el 11-KT fue responsable de inducir cambios relacionados con el “plateamiento” (como el aumento del IO y el IHS en las anguilas de aleta corta (Rohr *et al.*, 2001)) o que tratamientos con T indujeron un aumento del diámetro del ojo en la anguila europea (Aroua *et al.*, 2005). En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los

de los dos trabajos anteriormente citados, en cuanto a que los índices biométricos de los machos pretratados aumentaron junto con los niveles de andrógenos, confirmando que los andrógenos (T y 11-KT) promueven la maduración de la anguila. Además, el presente estudio reveló que los machos pretratados durante 4 semanas mostraron no sólo los índices biométricos más altos, sino también niveles más altos de T y 11-KT, de lo que se deduce que un pretratamiento térmico con agua marina fría más prolongado en el tiempo mejoraría el efecto de la maduración sexual de estos animales.

Además, Miura and Miura (2011) sugirieron que los andrógenos controlan los mecanismos espermatogénicos induciendo la proliferación celular. Por lo tanto, es posible que los machos pretratados con una temperatura baja del agua durante 2 y 4 semanas, indujesen mayores cantidades de células SPGA como resultado de los niveles de andrógenos, que fueron significativamente mayores en estos grupos. Conclusiones similares se observaron también en un estudio anterior realizado con machos de anguila europea sometidas a tratamiento con agua de mar fría, y que se relacionaron además con niveles crecientes de andrógenos (Rozenfeld *et al.*, 2019).

Por otro lado, Peñaranda *et al.* (2016) evaluaron los niveles de andrógenos en machos de anguila europea inducidas con hCG_{rec} y mantenidas a 10 °C durante las primeras 4 semanas. En este estudio se registraron niveles de T superiores a 6 ng/ml y niveles de 11-KT que llegaron a superar los 100 ng/ml. En el presente estudio, los niveles de T de los machos pretratados con agua de mar fría no diferían mucho de los machos tratados con hCG_{rec}, a diferencia de los niveles de 11-KT que diferían considerablemente. Esta discrepancia podría haber sido causada por la falta del estímulo de las inyecciones de hormona, que probablemente limitó la actividad de las enzimas esteroideogénicas de los andrógenos. En la anguila europea, es posible que la baja temperatura estimulara la producción de T, pero la ausencia de tratamiento hormonal limitó la vía biosintética y la expresión de la enzima responsable de la conversión de T en 11-KT, el andrógeno más activo en los teleósteos.

En cuanto a los niveles de E2, éstos fueron bajos tanto en los machos del grupo control de agua dulce mantenidos a 20 °C como en los machos pretratados con agua de mar a 10 °C durante 2 y 4 semanas, aunque estos grupos mostraron niveles significativamente más altos que el grupo de 1 semana de pretratamiento. Se sabe que los niveles de E2 de los machos de teleósteos son bastante bajos por lo general (Schulz *et al.*, 2010), lo que podría explicar los bajos niveles de E2 encontrados en todos los grupos. No obstante, en un estudio llevado a cabo por Morini *et al.* (2017), se demostró que los niveles plasmáticos de E2 aumentaron cuando las anguilas europeas

inmaduras fueron trasladadas de agua dulce a agua de mar mantenida a 20 °C. En cambio, en el presente estudio las anguilas pretratadas fueron trasladadas de agua dulce a 20 °C a agua de mar a 10 °C, lo que sugiere que las diferencias observadas en los niveles de E2 pueden ser consecuencia no solo del aumento de la salinidad, sino también del efecto de la baja temperatura.

Miura *et al.* (1999) propusieron que la E2 actúa en las etapas primarias de la espermatogénesis estimulando la renovación de espermatogonias. De hecho, un estudio reciente en la anguila europea reveló que los receptores nucleares de estrógenos estaban altamente expresados al principio de la espermatogénesis, corroborando el papel propuesto de E2 como regenerador de estas células. De hecho, el mismo estudio mostró que los niveles de E2 eran significativamente más altos en la etapa de SPGA y disminuían a lo largo de la espermatogénesis (Morini *et al.*, 2017). Estos resultados sugieren que el aumento de la proporción de células SPGA_{dif} en los machos pretratados durante 2 y 4 semanas fue el resultado de los niveles significativamente más altos de E2, probablemente mediados por la alta expresión de los receptores nucleares de estrógenos.

En resumen, los resultados explicados anteriormente indican que un pretratamiento térmico de agua marina fría más prolongado promueve la aparición de cambios morfológicos y fisiológicos junto con la progresión de la espermatogénesis temprana debido a los efectos de los esteroides plasmáticos. Parece que las condiciones de pretratamiento simulan las experimentadas en la naturaleza por las anguilas en desarrollo temprano, una vez que estas migran en aguas frías durante al menos la mitad de su migración hacia el Mar de los Sargazos (Righton *et al.*, 2016).

5.2. Producción de esperma, movilidad y parámetros de velocidad de los espermatozoides

El presente trabajo es el primero que estudia en teleósteos (macho) el impacto *in vivo* que pueden tener pretratamientos a baja temperatura (y diferentes duraciones) combinados con el tratamiento estándar (inyección de hCG_{rec} a 20 °C), mediante la evaluación de parámetros de cantidad y calidad espermática. Para ello, a menudo se analiza el volumen de esperma con el fin de determinar el esperma disponible para los procedimientos de gestión de la reproducción (Gallego *et al.*, 2013b, 2016). En el presente experimento, los machos pertenecientes a los grupos de pretratamiento más largos comenzaron a producir esperma antes y los volúmenes alcanzaron los 4 ml/ 100 g de pez, coincidiendo con resultados obtenidos previamente en anguilas europeas inducidas con hCG y mantenidas a una temperatura más elevada (Gallego *et al.*, 2012). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los volúmenes de

esperma entre los grupos de pretratamiento a 10 °C y el control. Por otro lado, y en lo que se refiere a la movilidad espermática y los parámetros cinéticos, destacar su importancia a la hora de evaluar la fertilidad de los machos, además de que están correlacionados positivamente con las tasas de fertilización (Gallego *et al.*, 2016; Beirão *et al.*, 2019). Así pues, en este estudio, los machos pretratados con agua de mar fría durante 2 y 4 semanas mostraron un aumento rápido y progresivo de su movilidad espermática durante las primeras semanas de tratamiento estándar. No obstante, fue el grupo control el que alcanzó y mantuvo valores de movilidad significativamente más altos en las semanas siguientes. En el caso de los parámetros cinéticos, se observó un perfil parecido: los machos que fueron sometidos a un pretratamiento con agua de mar a 10 °C durante 4 semanas mostraron velocidades significativamente más altas en las primeras semanas de tratamiento estándar, pero luego los machos del grupo control registraron de nuevo un aumento significativo hasta el final del experimento. En conjunto, los peces que recibieron pretratamientos durante periodos más largos empezaron a producir esperma antes al principio del tratamiento hormonal a 20°C, pero tanto la cantidad como la calidad espermática disminuyeron a medida que continuó el tratamiento estándar.

En un estudio previo en anguila europea, los niveles plasmáticos de T y 11-KT aumentaron en las primeras semanas de administración de hCG_{rec} a 20 °C, lo que sugiere que el tratamiento estándar activó la expresión testicular de las enzimas responsables de la síntesis de andrógenos (aacyp11a1; aacyp17-l; 11βHSD) (Peñaranda *et al.*, 2016). En la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), varios aumentos de los niveles plasmáticos de andrógenos preceden a la síntesis de esteroides inductores de la maduración (MIS, por sus siglas en inglés), y los cambios de la esteroidogénesis gonadal conducen a puestas consecutivas y a la maduración del esperma (Asturiano *et al.*, 2002). En el presente estudio, los machos mantenidos durante más tiempo en pretratamiento a baja temperatura mostraron niveles plasmáticos de T significativamente mayores antes de la inyección de hCG_{rec} y del cambio a 20 °C. Además, estos grupos mostraron un aumento significativo de los parámetros cinéticos del esperma en las primeras semanas del experimento. Los resultados de este estudio sugieren que, en los machos pretratados durante 2 y 4 semanas, el tratamiento hormonal estándar probablemente activó una rápida conversión de los altos niveles de T en 11-KT, a la que siguió la síntesis de MIS, lo que posiblemente dio lugar a una espermiación temprana en estos grupos. Sin embargo, esta tendencia no se mantuvo a lo largo del tratamiento estándar en los machos de los grupos pretratados, pues estos mostraron una rápida disminución en términos de movilidad espermática. Esta rápida disminución en los grupos de machos que recibieron un pretratamiento más prolongado podría deberse a la desigual respuesta al tratamiento estándar. Es posible que un número muy limitado

de células germinales respondiera al tratamiento hormonal a 20 °C, y por lo tanto se preparasen más pronto al inicio de la espermiación. Curiosamente, en el pez cebra (*Danio rerio*) se ha informado de que el tratamiento con agua fría induce efectos opuestos en los niveles de metilación del ADN al cambiar los niveles de metilación en las regiones promotoras de muchos genes, incluidos los genes de los receptores relacionados con el estrógeno (Han *et al.*, 2016). Comparativamente, es posible que el pretratamiento con agua de mar fría también pueda alterar negativamente la expresión genética de los receptores de estrógenos en sus células testiculares. Como ya se ha mencionado, los receptores nucleares de estrógenos desempeñan un papel crucial durante el desarrollo inicial en la espermatogénesis de la anguila europea, pero recientemente Morini *et al.* (2017) demostraron que los receptores de membrana de estrógenos están altamente expresados en la maduración final, apoyando las sugerencias anteriores propuestas por Miura *et al.* (2003). Posteriormente, Morini *et al.* (2017) también encontraron altos niveles de expresión de los receptores de membrana de progestágenos en la etapa final de la espermatogénesis en los testículos de machos de anguila europea. Aunque todavía no está claro, ambos estudios sugieren que los receptores de membrana de estrógenos y progestágenos están implicados en el éxito de la espermatogénesis de la anguila. Por consiguiente, el presente estudio sugiere que el pretratamiento con agua de mar fría podría afectar a los receptores de membrana de los estrógenos y, en consecuencia, a los receptores de membrana de progestágenos que median el papel de los MIS en la maduración final del esperma.

6. CONCLUSIONES

En conclusión, el inicio de la espermatogénesis fue promovido por el pretratamiento con agua de mar a 10 °C, que estimuló la producción de andrógenos y estrógenos y la proliferación de espermatogonias. Sin embargo, los machos de anguila europea que recibieron el tratamiento estándar (inyecciones semanales de hCG_{rec} a 20 °C) tuvieron una respuesta rápida y dependiente del tiempo de duración del pretratamiento, pero su periodo de espermiación fue más corto y los parámetros espermáticos fueron menores. Se necesitan investigaciones futuras para evaluar el efecto que pueden tener los pretratamientos térmicos en la regulación de los genes que controlan la espermatogénesis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Aarestrup, K.; Okland, F.; Hansen, M.M.; Righton, D.; Gargan, P.; Castonguay, M.; Bernatchez, L.; Howey, P.; Sparholt, H.; Pedersen, M.I. and McKinley, R.S. 2009. Oceanic spawning migration of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science* 325 (5948), 1660.
- ❖ APROMAR, Asociación Empresarial de Acuicultura de España. 2020. Informe de la Acuicultura en España. 93 pp.
- ❖ Arai, T.; Otake, T. and Tsukamoto, K. 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels, *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology*, 137:39–45.
- ❖ Aroua, S.; Schmitz, M.; Baloche, S.; Vidal, B.; Rousseau, K. and 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. 2020. Improvements on the reproductive control of the European eel. In: *Reproduction in Aquatic Animals. From Basic Biology to Aquaculture Technology*. M. Yoshida and J.F. Asturiano. 14:293-320. ISBN 978-981-15-2290-1
- ❖ Asturiano, J.F.; Sorbera, L.A.; Ramos, J.; Kime, D.E.; Carrillo, M. and Zanuy, S. 2002. Groupsynchronous ovarian development, spawning and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina*. 66, 273–282.
- ❖ Asturiano, J.F.; Sørensen, S.R.; Pérez, L.; Lauesen, P. and Tomkiewicz, J. 2016. First production of larvae using cryopreserved sperm. Effects of preservation temperature and cryopreservation on European eel sperm fertilization capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 51, 485-491.
- ❖ Beirão, J.; Boulais, M.; Gallego, V.; O'Brien, J.K.; Peixoto, S.; Robeck, T.R. and Cabrita, E. 2019. Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology* 133, 161–178.
- ❖ Blanco, S.; Romo, S.; Villena, M. J. y Martínez, S. 2003. Fish communities and food web interactions in some shallow Mediterranean lakes. *Hydrobiologia*, 506-509: 473-480.
- ❖ Brufao Curiel, P. 2020. Actualidad Jurídica Ambiental. n. 105, Sección “Artículos doctrinales”. ISSN: 1989-5666; NIPO: 832-20-001-3.

- ❖ Butts, I.A.E.; Sørensen, S.R.; Politis, S.N.; Pitcher, T.E. and Tomkiewicz, J. 2014. Standardization of fertilization protocols for the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 426-42, 9-13.
- ❖ Costa, J. L.; Assis, C. A.; Almeida, P. R.; Moreira, F. M. y Costa, M. J. 1992. On the food of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.) in the upper zone of the Tagus estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology*, 41 (5): 841-850.
- ❖ Cresci, A. 2020. A comprehensive hypothesis on the migration of European glass eels (*Anguilla anguilla*). *Biological Reviews*, 95:1273-1276.
- ❖ Deelder, C. L. 1984. Synopsis of biological data on the eel, *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). FAO Fish. Synop. 80 Rev.1. Roma. 73 pp.
- ❖ Dekker, W.; Van Os, B. and Van Willigen, J. 1998. Minimal and Maximal size of eel. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 349: 195-197.
- ❖ Dufour, S.; Burzawa-Gerard, E.; Le Belle, N.; Sbaihi, M. and Vidal, B. 2003. Reproductive Endocrinology of the European Eel, *Anguilla anguilla*. In: Eel Biology. K. Aida, K. Tsukamoto and K. Yamauchi. Springer, Tokyo. 10 pp.
- ❖ Durif, C.M.F.; Dufour, S. and Elie, P. 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology*, 2–2.
- ❖ Durif, C.M.F.; Dufour, S. and Elie, P. 2006. Impact of silvering stage, age, body size and condition on reproductive potential of the European eel. *Marine Ecology Progress Series* 327, 171–181.
- ❖ Elvira, B. 1991. La anguila pide paso. *Quercus*, 63: 31-35.
- ❖ FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/fishery/species/2203/en> Consultado el 17/03/2021.
- ❖ Fernández Delgado, C. 2013. Bases para el plan de conservación de la anguila europea en Andalucía, VV. AA., I Jornadas españolas de la anguila, San Sebastián, pág. 93.
- ❖ Friedland, K. D.; Miller, M. J. and Knights, B. 2007. Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. *ICES Journal of Marine Science*, 64: 519–530.
- ❖ Gallego, V.; Carneiro, P.C.F.; Mazzeo, I.; Vílchez, M.C.; Peñaranda, D.S.; Soler, C.; Pérez, L. and Asturiano, J.F. 2013a. Standardization of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm motility evaluation by CASA software. *Theriogenology* 79, 1034–1040.

- ❖ Gallego, V.; Cavalcante, S.S; Fujimoto, R.Y.; Carneiro, P.C.F.; Azevedo, H.C. and Maria, A.N. 2016. Fish sperm subpopulations: changes after cryopreservation process and relationship with fertilization success in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Theriogenology* 87, 1–9.
- ❖ Gallego, V.; Mazzeo, I.; Vílchez, M. C.; Peñaranda, D. S.; Carneiro, P. C. F.; Pérez, L. and 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.; Pérez, L.; Asturiano, J.F. and Yoshida, M. 2013b. Relationship between spermatozoa motility parameters, sperm/egg ratio, and fertilization and hatching rates in pufferfish (*Takifugu niphobles*). *Aquaculture* 416–417, 238–243.
- ❖ Gómez-Juaristi, M. y Salvador, A. 2017. Anguila – *Anguilla anguilla*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. J.J. Sanz y B. Elvira. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/> Consultado el 27/02/2021.
- ❖ Gutiérrez, J. C. 2003. Desarrollo y evaluación de modelos para la toma de decisiones. Caracterización de la producción de anguilas (*Anguilla anguilla* L.) en sistemas intensivos. Tesis doctoral en Ciencias Biológicas. *Universidad de Córdoba*. 392 pp.
- ❖ Han, B.; Li, W.; Chen, Z.; Xu, Q.; Luo, J.; Shi, Y.; Li, X.; Yan, X. and Zhang, J. 2016. Variation of DNA methylome of Zebrafish cells under cold pressure. *PLoS One* 11, 1–19.
- ❖ Herranz-Jusdado, J.G.; Gallego, V.; Morini, M.; Rozenfeld, C.; Pérez, L.; Kása, E.; Kollár, T.; Depincé, A.; Labbé, C.; Horváth, Á. and Asturiano, J.F. 2019. Comparison of European eel sperm cryopreservation protocols with standardization as a target. *Aquaculture* 498, 539–544.
- ❖ Herranz-Jusdado, J.G.; Kása, E.; Kollár, T.; Gallego, V.; Peñaranda, D.S.; Rozenfeld, C.; Pérez, L.; Horváth, Á. and Asturiano, J.F. 2018. Handling and treatment of male European eels (*Anguilla anguilla*) for hormonal maturation and sperm cryopreservation. *JOVE* 131:e56835.
- ❖ ICES, International Council for the Exploration of the Sea. 2019. European eel (*Anguilla anguilla*) throughout its natural range. In Report of the ICES Advisory Committee, 2019. ICES Advice 2019, ele.2737.nea. <https://doi.org/10.17895/ices.advice.5898> Consultado el 15/02/2021.
- ❖ IUCN, International Union for Conservation of Nature. 2020. *Anguilla anguilla*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2020. C. Pike, V. Crook & M. Gollock. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T60344A152845178.en> Consultado el 14/02/2021.

- ❖ Jellyman, D. and Tsukamoto, K. 2010. Vertical migrations may control maturation in migrating female *Anguilla dieffenbachii*. *Marine Ecology Progress Series* 404: 241–247.
- ❖ Kirk, R.S. 2003. The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management and Ecology*, 10(6): 385 – 394.
- ❖ Knights, B. 2003. A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Science of the Total Environment*, 310: 237–244.
- ❖ LaBar, G. W.; Hernando Casal, J. A. y Fernández Delgado, C. 1987. Local movements and population size of European eels, *Anguilla anguilla*, in a small lake in southwestern Spain. *Environmental Biology of Fishes*, 19 (2): 111-117.
- ❖ Lecomte-Finiger, R. 1994. Les stades larvaires (leptocéphales et civelles) de l'anguille uropéenne: migrations et métamorphose. *Année Biologique* 33: 1–17.
- ❖ Lobón-Cervía J.; Elvira, B. and Rincón, P. A. 1986. Historical changes in the fish fauna of the river Duero basin, In: *Historical changes of large alluvial rivers: Western Europe*. G.E. Petts. Chichester (England). 221-232 pp.
- ❖ Mazzeo, I.; Peñaranda, D.S.; Gallego, V.; Baloché, S.; Nourizadeh-Lillabadi, R.; Tveiten, H.; Dufour, S.; Asturiano, J.F.; Weltzien, F.A. and Pérez, L. 2014. Temperature modulates the vitellogenesis progression in European eel. *Aquaculture* 434, 38-47.
- ❖ Miura, T. and Miura, C. 2011. Analysis of spermatogenesis using an eel model. *Aqua-Bioscience Monograph*, 4(4): 105-119.
- ❖ Miura, T.; Miura, C.; Ohta, T.; Nader, M.R.; Todo, T. and Yamauchi, K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264: 230-234.
- ❖ Miura, T.; Ohta, T.; Miura, C. and Yamauchi, K. 2003. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *Endocrinology* 144, 5504–5510.
- ❖ Mochioka, N. and Iwamizu, M. 1996. Diet of anguilloid larvae: Leptocephali feed selectively on larvacean houses and fecal pellets. *Marine Biology*, 125(3): 447–452.
- ❖ Molés, G.; Zanuy, S.; Muñoz, I.; Crespo, B.; Martínez, I.; Mañanós, E. y Gómez, A. 2011. Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (FSH and LH) produced in different host systems. *Biology of Reproduction*, 84(6):1171 – 81.
- ❖ Morini, M.; Peñaranda, D. S.; Vílchez, M.C.; Nouriza-Lillabadi, R.; Lafont, A. G.; Dufour, S.; Asturiano, J. F., Weltzien, F. A. and Pérez, L. 2017. Nuclear and membrane progesterin

receptors in the European eel: Characterization and expression in vivo through spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 207, 79–92.

- ❖ Müller, T.; Urbányi, B.; Váradi, B.; Binder, T.; Horn, P.; Bercsényi, M. and Horváth, Á. 2004. Cryopreservation of sperm of farmed European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 225-231.
- ❖ Neto, A. F.; Costa, J. L.; Costa, M. J.; Pereira, M. E.; Duarte, A.; Cacador, I. y Domingos, I. 2011. Accumulation of metals in *Anguilla anguilla* from the Tagus estuary and relationship to environmental contamination. *Journal of Applied Ichthyology*, 27 (5): 1265-1271.
- ❖ Ohta, H.; Kagawa, H.; Tanaka, H.; Okuzawa, K. and Hirose, K. 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20h-dihydroxy-4- pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Aquaculture* 139: 291– 301.
- ❖ Ohta, H.; Kagawa, H.; Tanaka, H.; Okuzawa, K.; Inuma, N. and Hirose, K. 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla Japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 163– 169.
- ❖ Okamura, A.; Horie, N.; Mikawa, N.; Yamada, Y. and Tsukamoto, K. 2014. Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. *Ecology of Freshwater Fish* ,23: 95-110.
- ❖ Otake, T.; Nogami, K. and Maruyama, K. 1993. Dissolved and particulate organic matter as possible food sources for eel leptocephali. *Marine Ecology Progress Series*, 92(1–2): 27–34.
- ❖ Palstra, A. and Van Den Thillart, G.E. 2009. Artificial Maturation and Reproduction of the European Eel. In: van den Thillart G, Dufour S, Rankin JC (eds.) *Spawning Migration of the European Eel*, Springer Science+Business Media B.V, Netherlands, pp. 309-331.
- ❖ Pankhurst, N.W. 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual- maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L). *Journal of Fish Biology*, 21: 127– 140.
- ❖ Peñaranda, D.S.; Marco-Jiménez, F.; Pérez, L.; Gallego, V.; Mazzeo, I.; Vicente, J.S.; Jover, M. and Asturiano, J.F. 2010. Evaluation of different diluents for short-term storage of European eel sperm under air-limited conditions. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 659–664.
- ❖ Peñaranda, D.S.; Morini, M.; Tveiten, H.; Vílchez, M.C.; Gallego, V.; Dirks, R.P.; Van Den Thillart, G.; Pérez, L. and Asturiano, J.F. 2016. Temperature modulates testis steroidogenesis in European eel. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 197: 58–67.
- ❖ Peñaranda, D.S.; Gallego, V.; Rozenfeld, C.; Herranz-Jusdado, J.G.; Pérez, L.; Gómez, A.; Giménez, I. and 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. and Jover, M. 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel (*Anguilla anguilla*). Assessment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology*, 57, 1488-1504.
 - ❖ Pérez, L.; Barrera, R.; Asturiano, J. F. y Jover, M. 2004. Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura*, 20: 51–78.
 - ❖ Riemann, L.; Alfredson, H.; Hansen, M.; Als, T.D.; Nielsen, T.G.; Munk, P.; Aarestrup, K.; Maes, G.; Sparholz, H.; Petersen, M.I.; Bachler, M. and Castonguay, M. 2010. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, 6(6).
 - ❖ Righton, D.; Westerberg, H.; Feunteu, E.; Okland, F.; Gargan, P.; Amilhat, E.; Metcalfe, J.; Lobón-Cervia, J.; Sjo Berg, N.; Simon, J.; Acou, A.; Vedor, M.; Walker, A.; Trancart, T.; Brämick, U. and Aarestrup, K. 2016. Empirical observations of the spawning migration of European eels: The long and dangerous road to the Sargasso Sea. *Science Advances* 2(10).
 - ❖ Rodríguez, L.; Begtashi, I.; Zanuy, S. and Carrillo, M. 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23:141 – 50.
 - ❖ Rodríguez, L.; Begtashi, I.; Zanuy, S. and Carrillo, M. 2005. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *General and Comparative Endocrinology* 140:116-25.
 - ❖ Rohr, D.H.; Lokman, P.M.; Davie, P.S. and Young, G. 2001. 11-Ketotestosterone induces silvering-related changes in immature female short-finned eels, *Anguilla australis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 130(4):701-14.
 - ❖ Rozenfeld, C. 2019. Development of innovative methods for induction of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatogenesis. Doctoral thesis. *Universitat Politècnica de València*. 187 pp.
 - ❖ Sastre, A. B. 2011. Estudio comparativo de la eficacia y rentabilidad económica de tres tratamientos hormonales para la inducción de la espermiación en anguila europea. Trabajo Final de Máster en Acuicultura. *Universitat Politècnica de València*. 35 pp.

- ❖ Schmidt, J. 1923. The breeding places of the eel. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 211(382–390), 179–208.
- ❖ Schulz, R.W.; França, L.R.; Lareyre, J.J.; LeGac, F.; Chiarini-Garcia, H.; Nobrega, R.H. and Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 390–411.
- ❖ Sébert, M.E.; Weltzien, F.A.; Moisan, C.; Pasqualini, C. and Dufour, S. 2008. Dopaminergic systems in the European eel: characterization, brain distribution and potential role in migration and reproduction. *Hydrobiologia* 602, 27-46.
- ❖ Sostoa, A. and Lobón-Cerviá, J. 1986. Fish and fisheries of the river Ebro: Actual state and recent history, In: *Historical changes of large alluvial rivers: Western Europe*. G.E. Petts. Chichester (England) 232-247 pp.
- ❖ Tanaka, H.; Kagawa, H.; Ohta, H.; Unuma, T. and Nomura, K. 2003. The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 28:493-497.
- ❖ Tesch, F. W. 1991. *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758), In: *The Freshwater Fishes of Europe*, H. Hoestlandt. AULA-Verlag, Wiesbaden. 2:389–437.
- ❖ Torrent-Bravo, J.A. 2004. Análisis del comportamiento de la anguila (*Anguilla anguilla* L.) en procesos de aclimatación y engorde. Tesis doctoral en Ingeniero de Montes. *Universidad Politécnica de Madrid*. 248 pp.
- ❖ Van Ginneken, V.J.T. and Maes, G.E. 2005. The European eel (*Anguilla anguilla* L.), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15: 367–398.
- ❖ Vidal, B.; Pasqualini, C.; Le Belle, N.; Claire, M.; Holland, H.; Sbaihi, M.; Vernier, P.; Zohar, Y. and Dufour, S. 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biology of Reproduction* 71: 1491-500.
- ❖ Vílchez, M.C. 2013. Efecto del régimen térmico en la calidad de los huevos y desarrollo embrionario de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Trabajo Final de Máster en Acuicultura. *Universidad Politécnica de Valencia*. 49 pp.
- ❖ Vílchez, M.C.; Mazzeo, I.; Peñaranda, D.S.; Gallego, V.; Dufour, S.; Weltzien, F.A.; Asturiano, J.F. and Pérez, L. 2014. Effect of thermal regime on vitellogenesis, ovulation and larval development of European eel. *10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Olhão (Portugal) 25-30th May 2014. Book of abstracts, p. 190.

DECLARACIÓN ÉTICA

Este estudio se llevó a cabo siguiendo de manera estricta las recomendaciones recogidas en la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Real Decreto 53/2013 relativo a la protección de los animales utilizados con fines científicos (BOE 2013). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Animales de Experimentación de la Universitat Politècnica de València (UPV) y el permiso final fue otorgado por la administración local (Generalitat Valenciana, número de permiso: 2019/VSC/PEA/0073). Los peces fueron sacrificados con anestesia y se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento. Los peces no fueron alimentados durante todo el experimento y fueron manipulados de acuerdo con la normativa de la Unión Europea relativa a la protección de los animales de experimentación (Dir 86/609/EEC).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias al proyecto EELGONIA; (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; Proyectos de I+D+i «Retos investigación» RTI2018-096413-B-I00).