



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Evaluación de bombas osmóticas como método alternativo para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea (*Anguilla anguilla*)



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN ACUICULTURA

Tesis de Fin de Máster

Roger Alberto Guerra Gaitán

Dirigido por:

Víctor Gallego Albiach

Juan F. Asturiano

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	i
Summary	ii
1 Introducción	1
1.1 Biología y ecología de la especie	1
1.2 Amenazas, conservación y producción acuícola	3
1.3 El control de la reproducción: Única alternativa sostenible	5
1.4 Nuevos métodos para inducir la maduración sexual en la anguila	6
2 Objetivos	7
3 Material y métodos	8
3.1 Instalaciones y grupos experimentales	8
3.2 Inducción de la maduración	8
3.3 Extracción de las muestras de esperma	10
3.4 Evaluación de la producción de esperma (volumen, densidad y motilidad)	10
3.5 Parámetros biométricos	11
3.6 Análisis económico	11
3.7 Análisis estadístico	11
4 Resultados	12
4.1 Porcentaje de machos espermiantes	12
4.2 Volumen de esperma	12
4.3 Densidad de esperma	13
4.4 Motilidad de esperma	14
4.5 Parámetros biométricos	14
4.6 Análisis económico	16
5 Discusión	17
6 Conclusiones	20
Agradecimientos	21
Bibliografía	21

RESUMEN

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie importante para la acuicultura europea, siendo muy apreciada tanto en el mercado europeo como en el asiático. Sin embargo, su producción actual todavía se base en el engorde de anguilas capturadas en el medio natural, debido a que aún no es posible reproducir anguilas en cautividad. Además, se ha observado una disminución drástica en el número de anguilas europeas que migran desde Europa y el norte de África a los lugares de puesta en el Océano Atlántico, lo que ha llevado a que la especie se incluya en la lista roja de la UICN como en peligro crítico de extinción. Por tanto, la cría en cautividad se postula como la única sostenible para preservar esta especie *i*) reduciendo la presión sobre las poblaciones naturales, *ii*) facilitando el suministro a las granjas acuícola, y *iii*) permitiendo la repoblación en zonas donde históricamente se encontraba distribuida esta especie.

El objetivo de este estudio fue evaluar la aplicación de métodos alternativos (bombas osmóticas ALZET®) para la inducción de la maduración en machos de anguila europea. Estos sistemas se evaluaron tanto en términos biológicos como económicos, con la intención de diseñar protocolos capaces de inducir la espermatogénesis en esta especie. Los resultados mostraron que la implantación de bombas osmóticas ALZET 1004 (grupo OP-100) y ALZET 2006 (grupo OP-200), indujo la maduración y producción de esperma en machos de anguila europea. En cuanto al índice gonadosomático (IGS), los grupos implantados con bombas osmóticas alcanzaron valores de 2.23 ± 0.81 (OP-100) y 3.06 ± 1.43 (OP-200), sin embargo, en general, todos estos valores se encontraron por debajo de los resultados obtenidos mediante tratamientos a base de inyecciones semanales de hCG_{rec} (grupo Control). En cuanto a la producción del esperma, los grupos experimentales (OP-100 y OP-200) alcanzaron volúmenes de hasta un 1 mL/100 g pez, densidades de hasta 5×10^9 (OP-200) y 10×10^9 espermatozoides/ mL, y porcentajes bajos de motilidad de aproximadamente 10% de células móviles. Finalmente, desde un punto de vista económico, el coste de las bombas osmóticas es muy elevado, y por tanto no representó una inversión rentable en términos económicos.

Por lo tanto, este estudio ha demostrado que la utilización de sistemas de liberación controlada (bombas osmóticas ALZET®) induce la espermatogénesis y espermiación en machos de anguila europea, pero sin el potencial necesario para producir una cantidad suficiente de gametos (volumen densidad) con parámetros de calidad espermática (motilidad) aceptables que puedan satisfacer las necesidades de una hatchery de anguilas a nivel comercial.

Palabras claves: Reproducción; acuicultura; gametos; esperma; espermiación; hormonas

SUMMARY

The European eel (*Anguilla anguilla*) is an important species for European aquaculture, being highly appreciated both in the European and Asian markets. However, its current production still consists in the fattening of eels captured in the natural environment, due to the fact that it is not yet possible to reproduce eels in captivity. In addition, a drastic decrease has been observed in the number of wild European eels migrating from Europe and North Africa to the spawning sites in the Atlantic Ocean, leading to the species being included in the IUCN red list as critically endangered. Therefore, breeding in captivity is postulated as a key alternative in order to save this species, which will help to reduce the pressure on natural populations, it will facilitate the supply to the eel farms, and it will allow repopulation in areas where those that historically were located the eel.

The objective of this study was to evaluate the application of alternative methods (ALZET® osmotic pumps) for the induction of maturation in male European eel. These systems were evaluated both in biological and economic terms, with the intention of designing protocols capable of inducing spermatogenesis in this species. The results showed that the implantation of osmotic pumps ALZET 1004 (group OP-100) and ALZET 2006 (group OP-200) induced the maturation and production of sperm in male European eels. Regarding the gonadosomatic index (IGS), the implanted groups with osmotic pumps reached values of 2.23 ± 0.81 (OP-100) and 3.06 ± 1.43 (OP-200), however, all these values were below the results obtained by treatments based on weekly injections of hCGrec (Control group). Regarding sperm production, the experimental groups (OP-100 and OP-200) reached volumes of up to 1 mL / 100 g fish, densities of up to 5×10^9 (OP-200) and 10×10^9 sperm / mL, and low percentages of motility of approximately 10% of mobile cells. Finally, from an economic point of view, the cost of osmotic pumps was very expensive, so they did not represent a profitable investment in economic terms.

Therefore, this study showed that the use of controlled release systems (ALZET® osmotic pumps) induces spermatogenesis and spermiation in European eel males, but without the potential necessary to produce a sufficient amount of gametes (volume density) with acceptable sperm quality (motility) parameters that can satisfy the needs of a commercial eel hatchery.

Keywords: Reproduction; aquaculture; gametes; sperm; spermiation; hormones

1 INTRODUCCIÓN

1.1 BIOLOGÍA Y ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

La anguila europea es una especie catádroma con un ciclo de vida peculiar y complejo que consta de una larga migración a través del océano (Figura 1). La anguila europea es una especie de costumbres nocturnas que puede colonizar todo tipo de ecosistemas acuáticos, desde pequeños arroyos con poco caudal hasta orillas de grandes ríos y lagos, siempre que estos se encuentren conectados con el mar. Es una especie que tolera grandes variaciones ambientales pudiendo vivir en aguas dulces, salobres o saladas, y a temperaturas entre 12 y 28 °C (Pérez *et al.*, 2004), y su necesidad de oxígeno es inferior a la de otras especies, pudiendo tolerar concentraciones de 3-4 mg/l. Presentan cierto grado de respiración cutánea, que les permite salir del agua y desplazarse sobre el terreno en tiempo húmedo o lluvioso. Habitan aguas mas profundas y frías durante el día y aguas mas superficiales y cálidas por la noche, Al iniciar la madurez sexual, adquieren una coloración plateada con oscurecimiento del dorso y las aletas, el diámetro de sus ojos aumenta, sus cabezas se ensanchan y su aparato digestivo entra en regresión a favor del desarrollo gonadal (Pérez *et al.*, 2004). Estas anguilas se conocen como “anguilas plateadas”, las cuales inician el proceso de migración hacia el Mar de los Sargazos.



Figura 1. Esquema del ciclo biológico de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Fuente: EPGGráficos

Las razones de esta migración se desconocen en el presente. No obstante, se ha propuesto una serie de hipótesis incluyendo termorregulación, evitar depredadores y potencialmente como método

para estimular la continuación del proceso de maduración. Aunque las migraciones oceánicas de esta especie no se conocen perfectamente, se sabe que son fundamentales para la supervivencia (CMS, 2014). Aun no hay datos exactos sobre lugares de reproducción concretos, sin embargo, basándose en el trabajo llevado a cabo por Johannes Schmidt (Schmidt, 1923), se ha deducido que la reproducción tiene lugar en el Mar de Sargazos en el Atlántico Central Occidental.

La puesta da lugar a huevos pelágicos que al eclosionar liberan larvas con una morfología normal, denominados pre-leptocéfalos, meses después aparece el estado leptocéfalo (Figura 1A), que se caracteriza por cuerpo comprimido en forma de hoja, cabeza pequeña y coloración transparente. Estos volverán a las costas del norte de África, de Europa y del Mediterráneo ayudadas por la corriente del Golfo, realizando natación activa en un viaje de alrededor de 200-300 días (Lecomte-Finiger, 1994). Se cree que durante este viaje de migración las larvas se alimentan de partículas de zooplancton (Riemann *et al.*, 2010), cápsulas mucilaginosas de apendiculariáceos (Mochioka y Iwamizu, 1996) y materia orgánica disuelta (Otake *et al.*, 1993). Las larvas sufren una metamorfosis regresiva al llegar al talud continental, en la cual disminuyen su tamaño y pierden peso, y se conocen como “anguilas sin pigmentar” o “angulas” (Figura 1B), que nadan hacia aguas continentales mientras van adquiriendo la coloración característica de las anguilas jóvenes, llamadas anguilas amarillas. En la etapa de anguila amarilla, se presentan diferencias físicas entre los sexos, los machos llegan a medir 300-500 mm de longitud y llegar a pesar 200 g, en cambio las hembras llegan a medir 500-700 mm de longitud total y llegar a pesar 2 Kg, durante esta fase permanecen en los ríos hasta que alcanzan la fase de plateamiento, cuando pasan a llamarse anguilas plateadas o mareas (Figura 1C), y que corresponde con el inicio de su maduración sexual.

En cuanto a su distribución, la anguila europea en sus estadios juveniles se localiza en aguas continentales de toda Europa, a excepción de la cuenca del Danubio, debido a que el Mar Negro ofrece una barrera infranqueable. En su etapa adulta se encuentran en las costas atlánticas de Europa (hasta Noruega) y en todo el Mediterráneo, tanto en las costas europeas como en el norte de África (van Ginneken y Maes, 2005). En general, su hábitat se encuentra en las praderas de *Posidonia*, lagunas salobres, estuarios y todo tipo de cursos de agua dulce, bien sea en ambientes lóticos como ríos, canales, acequias e incluso alcantarillado urbano, o bien lénticos como lagos, estanques y pozos. Es una especie bentónica y lucífuga, que tolera bien las variaciones de salinidad y de temperatura (Sastre, 2011).

1.2 AMENAZAS, CONSERVACIÓN Y PRODUCCIÓN ACUÍCOLA

La anguila era una especie abundante que se distribuía en todos los ríos de la Península Ibérica. Sin embargo, a partir de los años 60 del siglo pasado se observaron disminuciones de casi un 90% de las capturas de anguila en todo el continente (Dekker, 2003). Según las estadísticas de la FAO y el informe del Consejo Internacional de Exploración del Mar (ICES, 2009), los niveles de capturas de la anguila europea (Figura 2) sufrieron un descenso notorio en los años 2009 y 2010, principalmente en la parte norte de su área de distribución, encontrándose fuera de los límites biológicos de seguridad. En la actualidad, los niveles de capturas de anguila no se comparan con los niveles alcanzados entre 1960-1980, lo que indica que el stock de anguilas ha seguido disminuyendo constantemente.

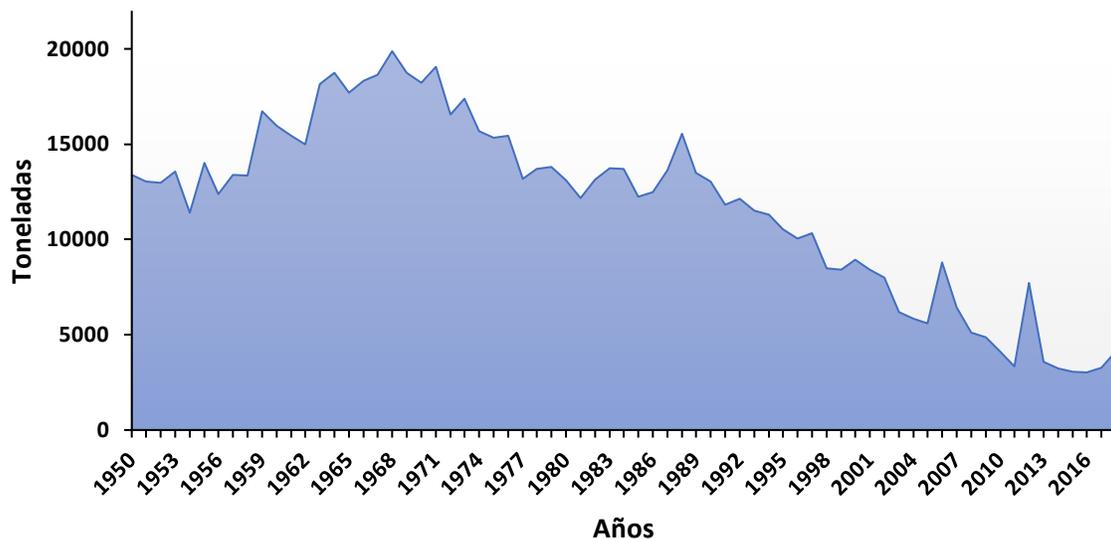


Figura 2. Capturas mundiales de anguila europea entre 1950-2018. Fuente: FAO Fishery Statistics, 2020.

Se atribuyen diferentes causas a la disminución del stock de la anguila europea, y entre las posibles causas destacan: **i) Sobrepesca:** las anguilas son pescadas en todas las áreas donde se distribuyen y en todas sus etapas de su ciclo biológico. En 1960, se reclutaron 10825 toneladas de anguilas en Europa, mientras que en 2015 se reclutaron apenas 440 toneladas, de las cuales se comerció ilegalmente con entre 8 y 100 toneladas (entre el 2 y el 29% del total, algo que afecta considerablemente a su reclutamiento y ha sido motivo de alarma para las autoridades; **ii) Cambios climáticos:** estos cambios afectan a las corrientes por las cuales las anguilas migran hasta las costas europeas; **iii) Destrucción del hábitat y barreras,** construcción de presas u otras infraestructuras que representan una gran amenaza, ya que no permiten que las anguilas jóvenes alcancen los tramos

superiores de los ríos, lo que representa una disminución en las poblaciones continentales. Entre otras posibles causas se pueden mencionar; **iv)** Efecto de los parásitos: específicamente el nemátodo (*Anguillicola crassus*), procedente de Japón; **v)** Disminución de la calidad de los reproductores: la bioacumulación de algunos pesticidas en las reservas lipídicas de las anguilas puede mobilizarse durante la ovogénesis, ser incorporados a los huevos en formación, y causar efectos negativos durante el desarrollo embrionario. En este sentido, se ha detectado la presencia de pesticidas en las anguilas de la Albufera de Valencia, mercurio en las de Cádiz, o residuos organoclorados y metales pesados en las de Doñana (Gómez-Juaristi y Salvador, 2011).

Por todas estas razones, en 2008 la anguila europea pasó a considerarse en peligro crítico (CR) a nivel mundial por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). Además, en 2009 también se incluyó en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES), que tiene por finalidad velar por que el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituya una amenaza para su supervivencia.

En cuanto a la producción mundial de anguila, según datos de la FAO, en 2017 se produjeron 259390 toneladas de las diferentes especies de anguilas, generando alrededor de 2042 millones de dólares a nivel mundial (Figura 3). Más del 80% de la producción es liderada por China, mientras que España es el quinto país de Europa y décimo a nivel mundial en producción de anguila (Marí, 2019). En cuanto a la anguila europea, según la FAO, en 1950 se pescaron alrededor de 14095 toneladas, mientras que solo 160 toneladas fueron producidas por la acuicultura.

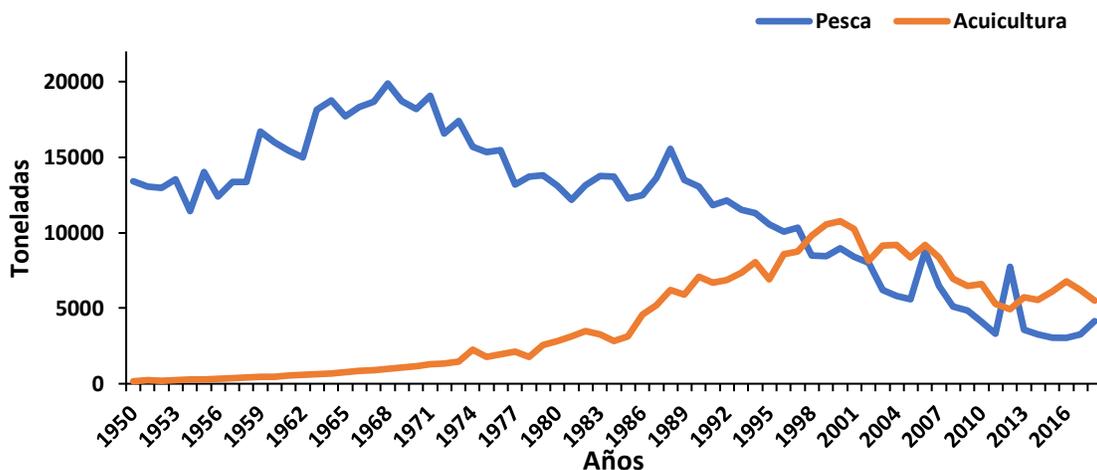


Figura 3. Capturas mundiales de anguila europea (t) vs producción mundial de anguila europea por acuicultura(t) entre los años 1950-2018. Fuente: FAO Fishery Statistics (2020).

1.3 EL CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN: ÚNICA ALTERNATIVA SOSTENIBLE

El principal objetivo para reproducir cualquier especie en acuicultura es el abastecimiento de alevines de forma regular y sostenible en el tiempo. Sin embargo, a pesar del interés en esta especie y después de muchas investigaciones, diferentes aspectos relacionados con el control de su reproducción se desconocen o han dado resultados confusos debido a la compleja fisiología reproductiva de las anguilas (Asturiano, 2020), por lo que el desarrollo de nuevos protocolos para reproducir esta especie en cautiverio es de vital importancia.

En cuanto a los estudios con machos de anguila europea, éstos presentan inicialmente (en cautiverio) testículos que solo contienen espermatogonias de tipo A y de tipo B temprano (Miura *et al.*, 2002; Morini *et al.*, 2017), y para desarrollar la espermatogénesis y la espermiación es necesaria la administración de tratamientos hormonales durante varias semanas (Figura 4). La gonadotropina coriónica humana (hCG), purificada de orina de mujeres embarazadas, es la hormona más utilizada en machos de anguila europea en (1.5 UI/g de pez), y ha generado buenos resultados tanto en cantidad, calidad y densidad de espermia (Pérez *et al.*, 2000). Sin embargo, diversos problemas relacionados con el suministro de hCG en los últimos años, junto con la llegada al mercado de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG_{rec}), motivó a la aplicación de nuevas técnicas biotecnológicas para la maduración de machos de anguila europea. La utilización de esta nueva hormona (hCG_{rec}), generó buenos resultados tanto en volumen, densidad, calidad y parámetros cinéticos del espermia a lo largo de todo el tratamiento (Gallego *et al.*, 2012).

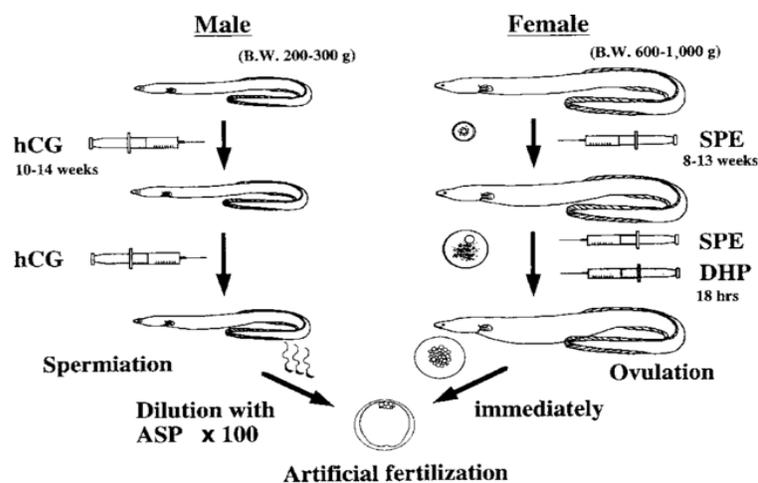


Figura 4. Esquema del protocolo de inducción hormonal para la maduración de machos y hembras de anguila japonesa (Ohta *et al.*, 1997).

Sin embargo, la efectividad de los tratamientos basados en hCG_{rec} depende en muchas ocasiones del lote de hormona utilizado, pudiendo encontrar una elevada variabilidad en los resultados obtenidos (Peñaranda *et al.*, 2018). En 2018, se realizaron nuevos estudios utilizando gonadotropinas recombinantes específicas (nativas) de anguila europea, con las que se indujo la espermiación, sin embargo, los resultados de volumen y motilidad de espermatozoides se consideraron no aptos para realizar ensayos de fertilización (Peñaranda *et al.*, 2018). Además, el proceso de producción de estas hormonas nativas es sofisticado y costoso, y solo ciertas compañías son capaces de realizarlo.

En búsqueda de tratamientos hormonales alternativos, los efectos sobre el rendimiento reproductivo en machos de anguila obtenidos con hCG se compararon con α -coriogonadotropina recombinante (hCG_{rec}, Herranz-Jusdado *et al.*, 2019). Los resultados indicaron que las hormonas utilizadas afectaron positivamente la progresión espermática, obteniendo mejores resultados la hCG_{rec} en términos de cantidad y calidad de espermatozoides, con lo que se demostraba como un tratamiento eficaz para la inducción de la espermiación en esta especie. No obstante, aunque todas las dosis de hCG_{rec} fueron capaces de inducir la espermiación en los machos de anguila europea, una dosis semanal de 1.5 UI/g pez, fue la necesaria para obtener excelentes resultados de volumen de esperma, densidad, motilidad y parámetros cinéticos durante la mayoría de las semanas del tratamiento (Asturiano, 2020). Además, se demostró que los tratamientos basados en hormonas recombinantes son más rentables económicamente, ya que permiten obtener muestras de esperma de elevada calidad a un menor coste (Herranz Jusdado, 2019).

1.4 NUEVOS MÉTODOS PARA INDUCIR LA MADURACIÓN SEXUAL EN LA ANGUILA

Desde los inicios de la acuicultura de la anguila, ha quedado evidenciado que los métodos hormonales para la maduración requieren de tratamientos prolongados, inyecciones múltiples y manipulaciones repetidas a lo largo de varias semanas de tratamiento. Estas manipulaciones pueden causar estrés y/o daños a los peces, afectando negativamente su desempeño reproductivo, por lo que la necesidad de administrar hormonas sostenidas a largo plazo a través de sistemas de suministros o sistemas de liberación controlada (SLC) puede ser considerado como una alternativa sostenible a largo plazo. Los SLC se han utilizado en las últimas décadas, principalmente para controlar la maduración de ovocitos en las hembras, pero también para mejorar la espermiación en los machos de algunas especies de teleósteos (Mylonas *et al.*, 2010). Estos sistemas pueden estar

en forma de gránulos sólidos de colesterol, acetato de etileno-vinilo (EVAc) u otro material (por ejemplo, “Ovopel”) o en forma de micro-esferas biodegradables (revisado por Mylonas *et al.*, 2017).

En 2014 se llevaron a cabo experimentos utilizando implantes para la liberación controlada de hormonas en hembras de anguila de aleta corta (*Anguilla australis*; Lokman *et al.*, 2014), y los resultados mostraron acumulación de lípidos y expresión del receptor de la hormona folículo estimulante. En 2017 se utilizaron implantes de colesterol-celulosa para administrar 17-metiltestosterona (17MT) a hembras de anguilas europeas (Di Biase *et al.*, 2017) como pretratamiento antes del tratamiento tradicional con extracto de hipófisis de carpa (CPE, descrito por Lokman *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos usando este pretratamiento incrementaron la fecundidad, la calidad de los ovocitos, la tasa de eclosión y la supervivencia de las larvas.

En 2009 las bombas osmóticas se utilizaron por primera vez en teleósteos (*Anguilla japonica*), obteniendo resultados favorables. El estudio demostró que el tratamiento a largo plazo mediante el uso de una bomba osmótica es un método eficaz para inducir la espermatogénesis y la espermiación, aumentando los valores de índice gonadosomático (GSI) (10.7 ± 1.0) a los 35-43 días después del implante (Kagawa *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se había evaluado la eficacia de las bombas osmóticas para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea.

2 OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo, enmarcado dentro del proyecto ANTRA “Aplicación de nuevas técnicas para el control de la reproducción de la anguila europea” (concedido en la convocatoria para “Primeros Proyectos” de la Universitat Politècnica de València; SP201801473), trata de evaluar la aplicación de métodos alternativos de inducción de la maduración en machos de anguila europea. Estos sistemas se evaluaron tanto en términos biológicos (maduración gonadal) como económicos (coste final del tratamiento), con la intención de diseñar protocolos capaces de inducir la espermatogénesis en esta especie. Los objetivos específicos a desarrollar fueron:

- I. Validar la inducción de la maduración gonadal en machos de anguila europea mediante el uso de nuevos sistemas de liberación controlada (SLC).
- II. Evaluar la producción y calidad de gametos en machos de anguila europea mediante el uso de SLC.
- III. Realizar un análisis económico de los métodos de inducción actuales y alternativos (SLC) para evaluar su aplicabilidad en términos de viabilidad económica.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 INSTALACIONES Y GRUPOS EXPERIMENTALES

Un lote de 30 machos de anguila europea procedentes de la piscifactoría Valenciana de Acuicultura S.A. (Puzol, Valencia), fue trasladado a las instalaciones de la UPV. Las anguilas fueron aclimatadas gradualmente durante 2 semanas a una salinidad del 37‰ en tres acuarios de 200 litros con circuito cerrado independiente, filtros externos y cubiertos con paneles opacos. Las anguilas se dividieron en tres grupos experimentales (Control, OP-100 y OP-200; n=10 por grupo), y se les implantó un microchip en la musculatura dorsal que permitió diferenciarlas individualmente. Durante todo el experimento las anguilas no fueron alimentadas con el objetivo de simular las condiciones que enfrentan cuando realizan su migración reproductiva. Todos los animales fueron manipulados de acuerdo con las regulaciones de la Unión Europea sobre la protección de animales de experimentación (Dir 86/609/EEC).

3.2 INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN

La maduración sexual del grupo Control se indujo mediante inyecciones semanales intraperitoneales de gonadotropina coriónica humana recombinante (hCG_{rec} Ovitrelle®), siguiendo el procedimiento habitual descrito por Gallego *et al.* (2012). De esta manera, cada semana las anguilas fueron anestesiadas y pesadas antes de administrar la dosis de 1.5 UI/g; este procedimiento se realizó durante 15 semanas. La maduración de los grupos experimentales OP-100 y OP-200 se llevó a cabo utilizando sistemas de liberación controlada (bombas osmóticas; ALZET® Osmotic Pumps). Concretamente los modelos utilizados fueron la bomba ALZET®-1004 para el grupo experimental OP-100 y la bomba ALZET®-2006 para el grupo experimental OP-200.

Las bombas osmóticas (ALZET) son dispositivos que se encargan de administrar determinadas sustancias a tasas continuas y controladas, durante periodos concreto, sin la necesidad de conexiones externas o manipulaciones frecuentes. Funcionan debido a una diferencia de presión osmótica (Figura 5) entre un compartimiento dentro de la bomba (capa osmótica), y el entorno del tejido en el que se implanta la bomba. La alta osmolaridad de la capa osmótica hace que el agua fluya hacia la bomba a través de la membrana semipermeable que forma la superficie externa de la bomba. Cuando el agua entra en la capa osmótica, comprime el depósito flexible, desplazando la solución de la bomba a una velocidad controlada y predeterminada.

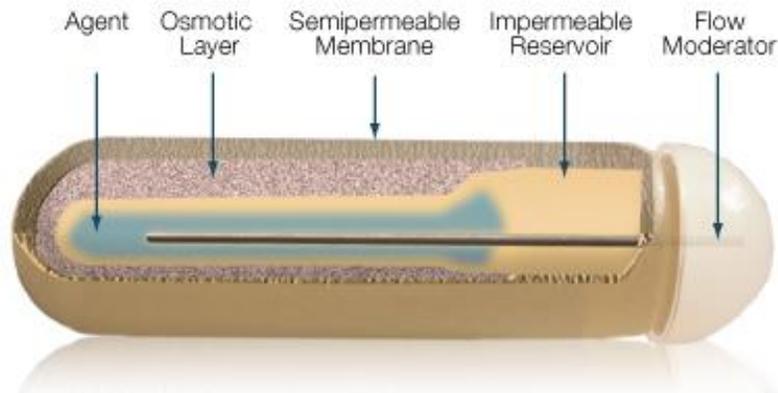


Figura 5. Esquema descriptivo de las distintas partes de una bomba osmótica tipo Alzet OP-2006.

El proceso de implantación de las bombas osmóticas consistió en realizar una pequeña incisión con bisturí en la pared abdominal, a través de la que se introdujo en la cavidad peritoneal de los machos del grupo OP-100 una bomba tipo Alzet-1004 (con diámetro de 0.6 cm, longitud de 1.5 cm), que tenía una tasa de liberación de 0.11 $\mu\text{l/h}$ y volumen de depósito de 100 μl (Figura 6). A las anguilas del grupo OP-200, se les introdujo una bomba tipo Alzet-2006 (con diámetro de 0.7 cm, longitud de 3 cm), que tenía una tasa de liberación de 0.15 $\mu\text{l/h}$ y volumen de depósito de 200 μl (Figura 6).



Figura 6. Procedimiento de la inserción de las bombas osmóticas. (A) Apertura de la pared abdominal para la implantación de la bomba osmótica. (B) Implantación de la bomba osmótica en la cavidad peritoneal. (C) Sutura con puntos quirúrgicos.

La hormona utilizada para el llenado de las bombas osmóticas fue (hCG_{rec} Ovitrelle®), que se disolvió en solución esterilizada de cloruro de sodio al 0.9%, presentó una concentración final de 13 UI/ μL . La cantidad de hormona para cada tipo de bomba se calculó en base al tiempo de duración del tratamiento: 10 semanas para los grupos experimentales OP-100 y OP-200. A partir de la semana 10 de tratamiento, los machos de ambos grupos recibieron inyecciones intraperitoneales semanales (1.5 UI/g pez) de hCG_{rec}, igual que el grupo Control.

3.3 EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ESPERMA

Para la extracción del esperma los ejemplares fueron anestesiados con benzocaina a una concentración final de 60 ppm. Una vez anestesiada, la anguila era colocada con el abdomen hacia arriba, luego se procedía a limpiar el área genital con agua dulce y se secaba completamente para evitar contaminación con agua de mar, heces u orina. Finalmente, se procedió a realizar el masaje abdominal (*stripping*) (Figura 7). Para recolectar la muestra, se modificó una pequeña bomba de aire del acuario para obtener fuerza de vacío con la que aspirar el esperma, se utilizó un tubo de 15 ml nuevo para cada ejemplar y se utilizó agua destilada para limpiar el tubo colector entre cada uno de los machos (Gallego *et al.*, 2012).



Figura 7. Realización de masaje abdominal (*stripping*) y recolección de muestra de esperma.

Después de realizar las extracciones del esperma de cada grupo experimental, los animales fueron devueltos a los acuarios y las muestras se trasladaron al laboratorio de análisis para evaluar los diferentes parámetros de morfología y cinética espermática.

3.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPERMA (VOLUMEN, DENSIDAD Y MOTILIDAD)

Desde el momento en que inicio la espermiación (semana 6-7), se iniciaron los muestreos, en los cuales se anotó el número de machos con producción de esperma, lo que permitió determinar el porcentaje de machos espermiantes, así como el volumen de esperma producido por cada uno de ellos, que se midió utilizando tubos graduados.

Para la evaluación de la densidad espermática, las muestras se diluyeron 1:25 en medio P1 (calibrado a pH 8.5, según Asturiano *et al.*, 2004). Con esta dilución se realizó una primera valoración subjetiva de la densidad de las muestras, y se eligió una segunda dilución que permitió un conteo preciso de los espermatozoides en cada una de ellas. utilizando una cámara de conteo Neubauer Improved y un microscopio (Nikon ECLIPSE E400) a 100 aumentos (objetivo 10x).

Para evaluar la motilidad, las muestras se activaron mezclando 0.5 µl del esperma diluido 1:25 en medio P1, con 4.5 µl de agua de mar artificial (Aqua Medic mEersalz, 37g/l, con BSA al 2% (p/v) y pH ajustado a 8.2). Cada muestra se analizó por triplicado usando el modulo de motilidad de ISAS (Proiser R+D, S.L.; Paterna, España). Se capturaron secuencias de vídeo de 0.5 segundos a 60 fps (fotogramas por segundo) usando una cámara (Nikon Digital Sight DS-5M) acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon ECLIPSE 80i) a 100 aumentos (objetivo 10x).

3.5 PARÁMETROS BIOMÉTRICOS

Al finalizar el experimento, los animales de cada grupo fueron sacrificados y se recolectaron datos de peso, longitud, color de la aleta (gris, gris oscuro, casi negra y negra) e índice gonadosomático (GSI = 100 *peso de las gónadas/ peso corporal total)

3.6 ANÁLISIS ECONÓMICO

Para analizar la rentabilidad económica los métodos hormonales utilizados durante el experimento se tuvieron en cuenta tres factores: i) el coste del material fungible (precio y cantidad de hormona utilizada, ii) el coste del material inventariable (jeringas y bombas osmóticas); y iii) el coste del personal, tomando como base los salarios de un Técnico Superior de investigación y calculando el coste en función de las horas invertidas para cada tratamiento (Control contra OP-100 u OP-200). El objetivo fundamental fue calcular la viabilidad económica de los sistemas de liberación controlada para su uso habitual en laboratorio o la industria acuícola.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron mediante SPSS, utilizando el test Shapiro-Wilk y Levene para comprobar la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas. Para la comparación de medias se realizó un análisis t-student o análisis de varianza (ANOVA), utilizando el test Student-Newman-Keuls (SNK) para la comparación múltiples de rango. Los datos que no presentaron una distribución normal se evaluaron mediante el test Kruskal-Wallis (ANOVA) o prueba U de Mann-Whitney. Para el nivel de significancia se utilizó $P < 0.05$ y los resultados se muestran con la media \pm error estándar (SEM).

4 RESULTADOS

4.1 PORCENTAJE DE MACHOS ESPERMIANTES

Los resultados obtenidos en cuanto al porcentaje de machos espermiantes mostraron que el grupo Control presentó los valores más elevados de machos espermiantes a lo largo de todo el tratamiento (Figura 8). En general, el grupo OP-100 generó mejores valores (porcentajes mayores de machos espermiantes) que el grupo experimental OP-200. El grupo OP-100 alcanzó un 50% de machos espermiantes entre la semana 11 y 12, mientras que el grupo Control alcanzó más del 80% de machos espermiantes durante varias semanas del experimento. Además, los machos del grupo OP-200 no comenzaron a producir muestras de esperma hasta la semana 7 del experimento, mientras que los machos del grupo OP100 y grupo Control comenzaron a espermiar desde la semana 5.

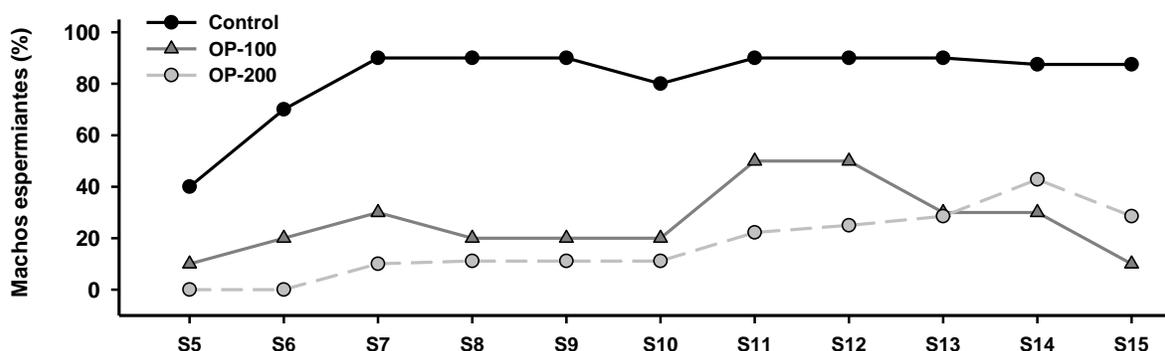


Figura 8. Porcentaje de machos espermiantes de cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200) durante todo el experimento.

4.2 VOLUMEN DE ESPERMA

En cuanto al volumen (Figura 9), el grupo Control presentó valores más elevados desde el inicio hasta el final del experimento, con valores máximos en torno a los 4 mL/100 g pez en la semana 13 y con diferencias significativas con el resto de los grupos experimentales en todas las semanas del experimento. Los grupos OP-100 y OP-200 mostraron valores mínimos similares entre sí, ligeramente más altos en los machos del grupo OP-200 en las semanas 11 y 13, pero solo se encontraron diferencias significativas entre ellos (OP-100, OP-200) en la semana 11, semana en la que el grupo OP-200 alcanzó su valor máximo en torno a 1 mL/100 g pez.

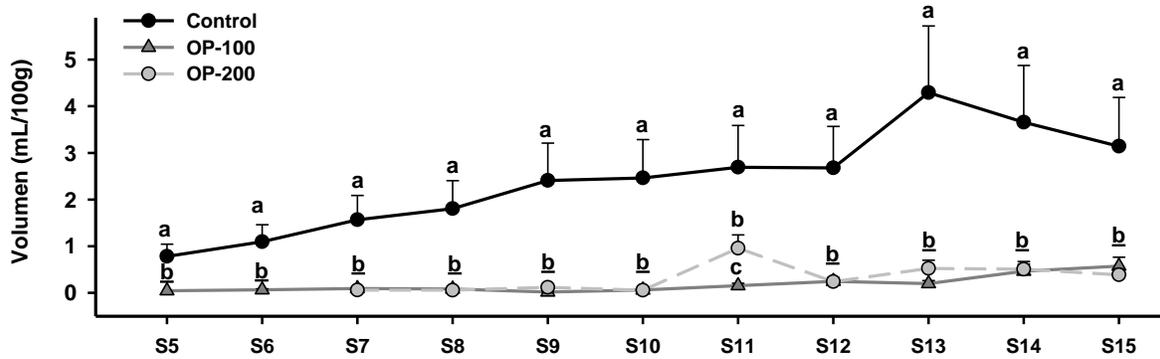


Figura 9. Volúmenes medios de esperma (mL/100 g de pez), obtenidos de cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200) a lo largo de todo el experimento. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos en cada semana.

4.3 DENSIDAD DE ESPERMA

Los mayores valores de densidad se observaron nuevamente en los machos del grupo Control, con diferencias significativas con los otros grupos experimentales durante todas las semanas del experimento (Figura 10). Los grupos inducido mediante bombas osmóticas (OP-100, OP-200) presentaron un incremento significativo de la densidad entre las semanas 10 y 12 del experimento, con valores máximos en la semana 12, mientras que el grupo Control alcanzó su valor de densidad máxima en la semana 15 ($>15 \times 10^9$ cel/mL).

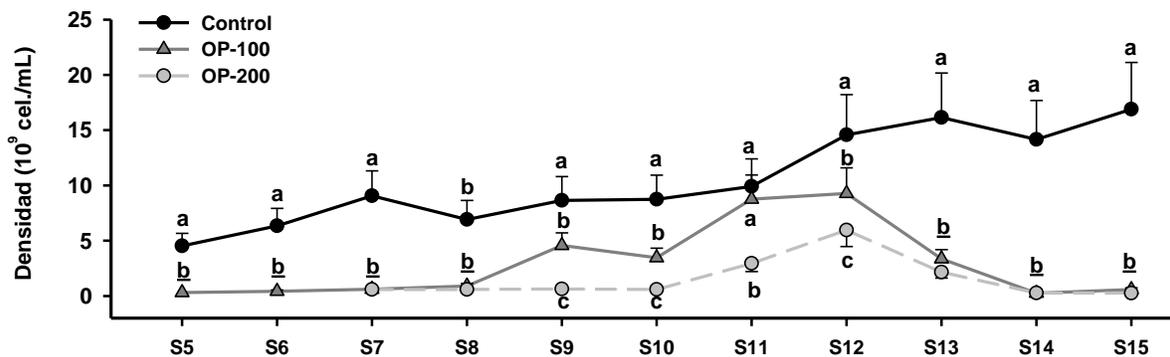


Figura 10. Densidad media de espermatozoides (10^9 células/mL) a lo largo de todo el experimento, para cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos en cada semana.

4.4 MOTILIDAD DE ESPERMA

Los resultados de la motilidad del espermatozoides mostraron valores más altos en las muestras obtenidas del grupo Control, el cual presentó una tendencia creciente desde el principio hasta el final del experimento, con diferencias significativas con los otros grupos durante todas las semanas del experimento, y alcanzando valores máximos en torno al 60% de células móviles en la semana 12 (Figura 11). El grupo OP-100 mantuvo motilidades por debajo del 25% durante todo el experimento, alcanzando su valor máximo en la semana 15 (20%), mientras que los valores de motilidad del grupo OP-200 durante todo el experimento fueron inferiores al 5%.

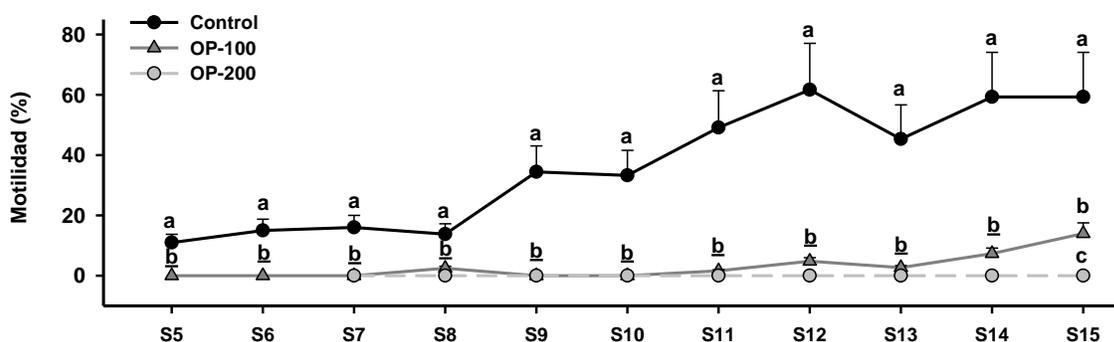


Figura 11. Motilidad (porcentaje de células móviles) para cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200). Las letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos en cada semana.

4.5 PARÁMETROS BIOMÉTRICOS

En cuanto al color de aleta (Figura 12), el grupo Control presentó más de un 80% de animales con aleta de color negra, en comparación con un 50% presentado por el grupo OP-100 y un 33% presentado por el grupo OP-200. En cuanto a animales con aleta casi negra, el grupo Control OP-100 presentó un 40%, mientras que el grupo OP-200 presentó un 33% y el grupo control un 13%.

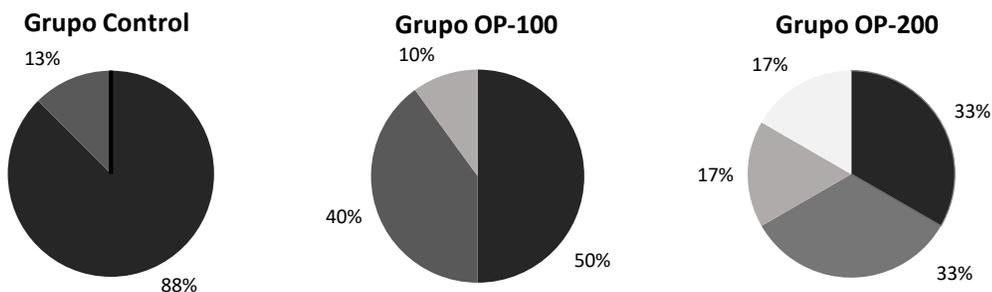


Figura 12. Porcentaje del color de aleta (■ - negra, ■ - casi negra, ■ - gris oscuro, □ - gris transparente) al finalizar el experimento, para cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200).

En cuanto a la maduración gonadal, todos los grupos presentaron machos maduros (IGS >1%) al finalizar el experimento (Figura 13). Sin embargo, el grupo Control alcanzó valores más elevados de machos maduros al finalizar el experimento (>80%), mientras que los grupos experimentales OP-100 y OP-200 alcanzaron valores del 50%. Por otro lado, los mayores valores de IGS (Figura 14) fueron obtenidos por el grupo Control (5.92 ± 1.02), seguido por el grupo OP-200 (3.06 ± 1.43) y por último el grupo OP-100 (2.23 ± 0.81). El grupo Control presentó diferencias significativas con los grupos bombas osmóticas (OP-100, OP-200).

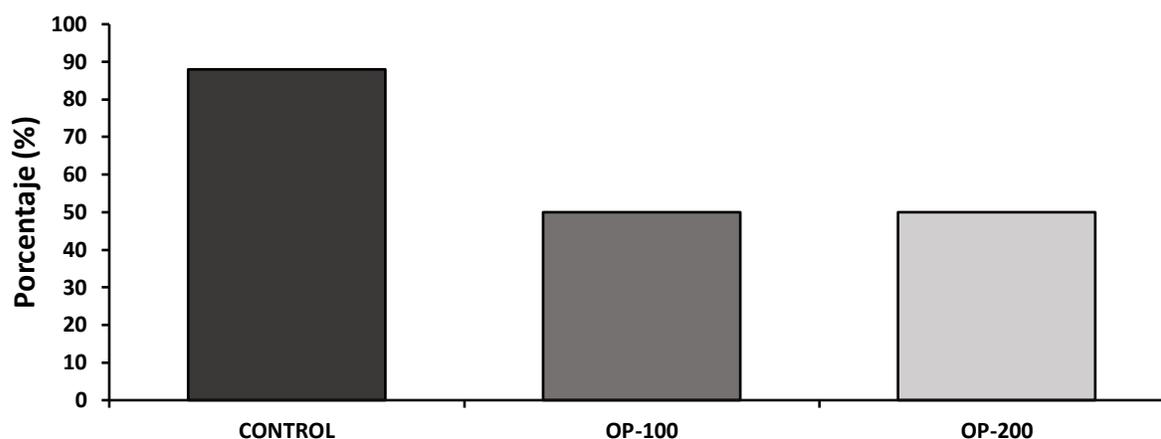


Figura 13. Porcentaje de animales maduros al finalizar el experimento para cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200).

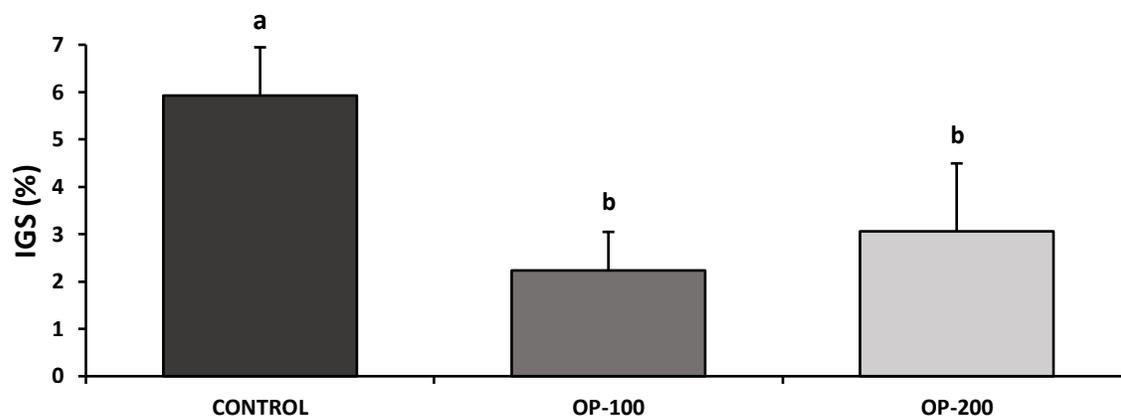


Figura 14. Media del índice gonadosomático (%) de todos los animales al finalizar el experimento, para cada uno de los grupos (Control, OP-100 y OP-200). Las letras indican diferencias significativas entre los grupos experimentales.

4.6 ANÁLISIS ECONÓMICO

En la Tabla 1 se muestra una valoración económica de los diferentes tratamientos utilizados. En ella se evalúa la rentabilidad de madurar machos de anguila europea mediante inyecciones semanales de hCG_{rec} (grupo Control) y mediante sistemas de liberación controlada (OP-100, OP-200, cargadas con hCG_{rec}). Esta valoración se realizó en base a 10 semanas de experimento, sin incluir la inversión del tratamiento con inyecciones adicionales de hCG_{rec} que se aplicó después de la semana 10 a los grupos bombas osmóticas (OP-100, OP-200), ni las 5 semanas restantes de tratamiento con inyecciones de hCG_{rec} al grupo Control. Los resultados mostraron que la inversión necesaria para obtener un lote de 10 machos maduros de anguila europea fue mucho más alta mediante el uso de SLC (OP-100 y OP-200), con un balance total de 1027.2 € para todo el tratamiento, que mediante el uso de inyecciones semanales (grupo Control), con un coste total de tratamiento de 596.7 €.

Tabla 1. Coste económico para un grupo de 10 machos (120 g por animal) durante 10 semanas de tratamiento incluyendo material fungible, inventariable y costes del personal.

Tipo de Coste			Control	OP-100/OP-200
Fungible	Dosis	UI/g pez	1.5	1.5
	Precio hCG _{rec}	€/UI	0.008	0.008
	Nº semanas		10	10
	Nº machos		10	10
	Peso por macho	g/macho	120	120
Total			140.2 €	140.2 €
Inventariable	Jeringas	10 uds.	12.5	
	Bombas	10 uds.		798
	Total			12.50 €
Personal	Técnico Superior	2 personas	2	2
	Salario	€/hora	8.9	8.9
	Horas invertidas		25	5
Total			444 €	89 €
Total/Tratamiento			596.7 €	1027.2 €

*No se incluye la inversión del tratamiento de inyecciones de hCG_{rec} aplicado en los grupos bombas osmóticas (OP-100, OP-200) después de la semana 10, ni las 5 semanas restantes de tratamiento con inyecciones de hCG_{rec} al grupo Control.

5 DISCUSIÓN

Los estudios sobre tratamientos hormonales alternativos para mejorar la producción de esperma y los parámetros de calidad deben realizarse constantemente para optimizar las herramientas para la inducción de la maduración gonadal en peces (Mylonas *et al.*, 2017), y especialmente en especies con problemas reproductivos, como la anguila europea (Peñaranda *et al.*, 2018). Esta especie no madura espontáneamente en cautividad, por lo que la maduración sexual de machos y hembras debe inducirse mediante tratamientos hormonales. La administración de estas hormonas se realiza habitualmente mediante inyecciones intraperitoneales semanales, lo que supone un manejo repetitivo de los animales, que incurre en costos de mano de obra, de tiempo y de materiales, y además podría tener efectos negativos en el proceso de maduración de los peces como consecuencia del estrés que se les causa. Por lo tanto, los sistemas de liberación controlada (SLC) se han utilizado ampliamente en las últimas décadas, principalmente para controlar la maduración de los ovocitos en las hembras, pero también para mejorar la espermiación en los machos de distintas especies de peces (Mylonas *et al.*, 2010, 2017).

Los SLC disponibles están en forma de gránulos de colesterol, acetato de etileno-vinilo, microesferas biodegradables (revisado por Mylonas *et al.*, 2017) siendo utilizados eficazmente para controlar las funciones reproductivas, y teniendo cada tipo de implante ventajas específicas. En 1994 se implantaron mini bombas osmóticas cargadas con una hormona gonadotrópica en mamíferos (Gibson *et al.*, 1994), en 2002 se experimentó con bombas osmóticas cargadas con gonadotropina sérica de yegua preñada en aves (Girling *et al.*, 2002), en 2009 se utilizaron por primera vez las bombas osmóticas en teleósteos, más concretamente en la anguila japonesa (*Anguilla japonica*), obteniendo resultados favorables (Kagawa *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta la fecha no se había evaluado la eficacia de las bombas osmóticas para inducir la maduración sexual en machos de anguila europea. Este es el primer estudio que evalúa la implantación y eficacia de bombas osmóticas (ALZET; OP-100 y OP-200) en machos de anguila europea sexualmente inmaduros.

Es importante señalar que la cantidad de esperma producido es un factor clave para la reproducción controlada, lo que hace necesario inducir la producción de volúmenes razonables de muestras de alta calidad para poder fertilizar el máximo número de huevos (Migaud *et al.*, 2013). En este contexto, aunque ambos grupos tratados con bombas osmóticas fueron capaces de inducir machos espermiantes (50%), hubo diferencias significativas en los volúmenes producidos entre estos grupos y el grupo Control. Así, durante la mayoría de las semanas del tratamiento, los machos del grupo

Control, tratados con inyecciones hCG_{rec}, produjeron aproximadamente el doble o hasta el triple del volumen de esperma producido por los machos con los que se utilizaron bombas osmóticas (OP-100, OP-200). En este contexto, Herranz-Jusdado *et al.* (2019) encontraron resultados similares en esta especie, utilizando hCG_{rec} (12 semanas), obteniendo resultados notables (hasta 4 mL/100 g pez).

Además de estas diferencias en cuanto a volúmenes de esperma producidos, los valores de densidad espermática alcanzados por los machos de los grupos tratados con bombas osmóticas, no fueron lo suficientemente altos para compensar los menores volúmenes producidos en la mayoría de las semanas de tratamiento. Butts *et al.* (2014) calcularon que en la anguila europea la ratio mínima para garantizar la fertilización *in vitro* es de 25000 espermatozoides / huevo. Si nos basamos en una puesta media, una hembra pone aproximadamente 250000 huevos y se necesitaría una densidad de 6.25×10^9 espermatozoides/mL. Teniendo en cuenta esto y según los valores máximos de densidad de los grupos bombas osmóticas, para realizar una fertilización exitosa, sería necesario un volumen de esperma mínimo aproximado de 0.625 mL (OP-100) o de 1.25 mL (OP-200). Sin embargo, los grupos tratados con bombas osmóticas no alcanzaron los niveles de esperma necesarios para ser considerado éste como un método eficaz para la reproducción controlada, y resultando el Control un mejor tratamiento según ambos parámetros de producción de esperma.

Además del número de espermatozoides, la calidad de los mismos es crucial para los ensayos de fertilización. Las tasas de fertilización y/o eclosión suelen utilizarse para valorar esa calidad de los gametos de otras especies, pero esto resulta muy difícil en el caso de la anguila europea, dadas las limitaciones actuales para su reproducción en cautividad. Así pues, en el caso de la anguila se recurre al uso de varios parámetros cinéticos que caracterizan la motilidad y la velocidad de los espermatozoides, y que se consideran entre los mejores biomarcadores de calidad de espermatozoides de peces, incluidos los de esta especie (Gallego y Asturiano, 2018). En este experimento, las muestras de esperma del grupo OP-200, no presentaron motilidad durante las semanas del experimento, sin embargo, las muestras de grupo OP-100 comenzaron a presentar motilidad a partir de la semana 10, y alcanzaron su valor más alto (en torno a 20% de células móviles) en la semana 15. En su estudio previo, (Kagawa *et al.*, 2009) utilizaron bombas osmóticas tipo Alzet-2002, con volumen de depósito de 200 µl (similar a las utilizadas en el grupo OP-200), cargadas con diferentes dosis (1, 5, 10, 25 y 50 UI/día) de hCG con la finalidad de encontrar la dosis correcta que estimulara la maduración de machos inmaduros de anguila japonesa; los resultados mostraron que los animales tratados con una dosis de 1 UI/día no presentaron motilidad, de forma similar a lo

obtenido en el grupo OP-200, mientras que los animales tratados con dosis de 5 o 10 UI/día presentaron valores de motilidad en torno al 20% de células móviles, similares a los observados en el grupo OP-100 en la semana 15 de nuestro experimento. Por último, los animales que (Kagawa *et al.*, 2009) trataron con dosis de 25 o 50 UI/día presentaron motilidades más elevadas (>35%), las cuales superaron los valores de motilidad de los grupos OP-100 y OP-200 durante todo el tratamiento. En cuanto al grupo Control, los valores de motilidad fueron más elevados, proporcionando valores superiores al 40% durante la mayor parte del experimento. En este contexto, cabe resaltar que uno de los factores esenciales para llevar a cabo cría en cautividad de anguila europea es la capacidad de obtener esperma de alta calidad durante un periodo lo más largo posible (preferentemente a lo largo de varias semanas) para poder sincronizar la producción del esperma con las puestas de huevos por parte de las hembras (Asturiano, 2020).

Por otro lado, hemos considerado importante evaluar qué grado de progresión ha alcanzado la maduración sexual al finalizar el experimento, por lo que después de sacrificar a los animales, se tomaron muestras para evaluar parámetros biométricos (IGS y color de aleta). El valor medio de IGS alcanzado por los machos del grupo OP-100 (2.23 ± 0.81) y grupo OP-200 (3.06 ± 1.43) presentaron diferencia significativa con el mostrado por los del grupo Control (5.92 ± 1.02), sin embargo, ambos grupos (OP-100, OP-200) presentaron machos maduros y espermiantes, lo que supone que la implantación de una bomba osmótica cargada con hCG_{rec} tiene la capacidad de inducir la maduración sexual en machos de anguila europea. Por otro lado, aunque todos los grupos presentaron animales maduros al finalizar el experimento, nuestros valores resultan muy inferiores a los IGS >10 obtenidos en anguila japonesa en el trabajo de Kagawa *et al.* (2009) utilizando bombas osmóticas cargadas con hCG (50 UI/ día), y que se acercaron a los valores de IGS (9.5 ± 1.5) obtenidos con inyecciones de hCG (330 UI/semana) en el mismo experimento. Por lo tanto, al no presentar diferencias significativas de IGS entre los grupos bombas osmóticas, los bajos niveles de volumen y calidad espermática pueden estar influenciados por la dosis utilizada (1.5 UI/g pez) y no por el tipo de bomba (Alzet-1004, Alzet-2002).

En cuanto al color de aleta, a medida que los animales van alcanzando la madurez, la aleta se va tornando progresivamente mas oscura, volviéndose casi completamente negra. Los resultados muestran que el mayor porcentaje de animales con aleta negra lo alcanzo el grupo control (88%), seguido por el grupo OP-100 (50%) y el grupo OP-200 (33%). Estos datos tienen relación con los porcentajes de machos espermiantes alcanzados en cada grupo, grupo Control (>80%), grupo OP-

100 (50%) y OP-200 (40%). Estos resultados son comparables con lo reportados por Peñaranda *et al.*, (2018) , en el cual también relaciona la madurez con el color final de aleta.

Desde un punto de vista aplicado/práctico, un tratamiento hormonal debe proporcionar una gran cantidad (volumen y densidad) de muestras de alta calidad (motilidad) durante el mayor número posible de semanas. Sin embargo, desde el punto de vista económico, una disminución de los costes de los tratamientos hormonales es fundamental para obtener tratamientos más asequibles y suficientemente eficaces (Mylonas *et al.*, 2017). Por lo tanto, decidimos incluir una valoración económica de los tratamientos, considerando el coste de los materiales fungibles, inventariables, y coste del personal para luego compararlos con los volúmenes de esperma producido y sus parámetros de calidad espermática. En este sentido, en base a nuestro análisis económico (10 semanas), la inversión total necesaria del tratamiento para madurar machos con inyección de hCG_{rec} (grupo Control) fue de 596.7 €, mientras que la inversión total necesaria para madurar machos mediante SLC (OP-100, OP-200) fue de 1027.2 € para cada tipo de bomba (Alzet-1004 o Alzet-2002), ya que el precio por bomba muy es similar. En este sentido, es importante mencionar que a pesar de que los grupos experimentales tratados con SLC (OP-100, OP-200) minimizaron el coste de personal (89 €) respecto al grupo control (444 €), los elevados costes de las bombas osmóticas (Alzet-1004 o Alzet-2002) no compensaron el abaratamiento inicial en los costes de personal. Además, basándonos en la escasa producción de volumen, baja calidad espermática a lo largo de todo el experimento resulta más rentable inducir la maduración en machos de anguila europea mediante la aplicación de inyecciones semanales de hCG_{rec}, coincidiendo con lo concluido por Gallego *et al.* en 2012.

6 CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que la utilización de sistemas de liberación controlada (bombas osmóticas ALZET®) induce la maduración y espermiación en machos de anguila europea, pero sin la capacidad necesaria para producir una cantidad suficiente de gametos (volumen, densidad) con parámetros de calidad espermática (motilidad) aceptables que puedan satisfacer las necesidades de una *hatchery* de anguilas a nivel comercial. Además, el análisis económico demostró que el grupo Control presentó mayor rentabilidad en comparación con el grupo OP-100 y OP-200, demostrando así, que las inyecciones semanales de hCG_{rec} son un método eficaz para inducir la espermiación en machos de anguila europea, desde un punto de vista aplicado (cantidad y calidad de gametos) y económico.

AGRADECIMIENTOS

Primero, darle las gracias a Dios por la oportunidad de ganarme una beca y poder realizar un Máster Universitario en Acuicultura en la Universidad Politécnica de Valencia en conjunto con la Universidad de Valencia. Segundo, darles las gracias a mis dos tutores, Víctor Gallego y Juan F. Asturiano, a los cuales nunca voy a tener las palabras ni la manera de agradecerles toda la paciencia y apoyo brindado durante las clases de reproducción y sobre todo en la realización del TFM. Muchas gracias a los dos y cualquier cosa, cuando se den su vuelta por Panamá estamos a la orden.

BIBLIOGRAFÍA

- Asturiano, J. F. (2020). Improvements on the reproductive control of the european eel. In *Reproduction in Aquatic Animals: From Basic Biology to Aquaculture Technology* (pp. 293–320). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2290-1_15
- Asturiano, J. F., Pérez, L., Pérez-Navarro, F. J., Garzón, D. L., Martínez, S., Tomás, A., Jover, M. (2004). Optimization trial of methods for induction of spermiation in European eel (*Anguilla anguilla*) and test of different sperm activation media. *Aquaculture Europe*, 130–131.
- CMS. (2014). Proposal for the inclusion of the european eel (*Anguilla anguilla*) on convention on migratory species (cms) appendix ii. https://www.cms.int/sites/default/files/document/Doc_24_1_18_Prop_II_12_Rev.1_Anguilla_anguilla_%28European_eel%29_MCO_E.pdf
- Dekker, W. (2003). Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology*, 10(6), 365–376. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x>
- Di Biase, A., Lokman, P. M., Govoni, N., Casalini, A., Emmanuele, P., Parmeggiani, A., Mordenti, O. (2017). Co-treatment with androgens during artificial induction of maturation in female eel, *Anguilla anguilla*: Effects on egg production and early development. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.030>
- Gallego, V., Asturiano, J. F. (2018). Sperm motility in fish: Technical applications and perspectives through CASA-Mot systems. In *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 30, Issue 6, pp. 820–832). CSIRO. <https://doi.org/10.1071/RD17460>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.041>
- Gibson, M. J., Kasowski, H., Dobrjansky, A. (1994). Continuous Gonadotropin-Releasing Hormone Infusion Stimulates Dramatic Gonadal Development in Hypogonadal Female Mice¹. *Biology of Reproduction*, 50(3), 680–685. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.3.680>
- Girling, J. E., Bennett, E. J., Cockrem, J. F. (2002). Administration of pregnant mare serum gonadotropin to Japanese quail (*Coturnix japonica*): Dose response over seven days and comparison of delivery by daily injection or osmotic pump. *New Zealand Veterinary Journal*, 50(3), 115–121. <https://doi.org/10.1080/00480169.2002.36293>
- Gómez-Juaristi, M., Salvador, A. (2011). En: *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. <http://www.vertebradosibericos.org/>

- Herranz-Jusdado, J. G., Rozenfeld, C., Morini, M., Pérez, L., Asturiano, J. F., Gallego, V. (2019). Recombinant vs purified mammal gonadotropins as maturation hormonal treatments of European eel males. *Aquaculture*, 501, 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.015>
- Herranz Jusdado, J. G. (2019). Improvement of techniques for sperm evaluation and cryobanking in European eel. [Universitat Politècnica de València]. <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/130846>
- Ices CM, Acom. (2009). European Inland Fisheries Advisory Commission EIFAC Occasional Paper No. 45 ICES Advisory Committee on Fisheries Management.
- Kagawa, H., Kasuga, Y., Adachi, J., Nishi, A., Hashimoto, H., Imaizumi, H., Kaji, S. (2009). Effects of continuous administration of human chorionic gonadotropin, salmon pituitary extract, and gonadotropin-releasing hormone using osmotic pumps on induction of sexual maturation in male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 296(1–2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.07.023>
- Lecomte-Finiger, R. (1994). The early life of the European eel. In *Nature* (Vol. 370, Issue 6489, p. 424). <https://doi.org/10.1038/370424a0>
- Lokman, P. M., Wylie, M. J., Downes, M., Di Biase, A., Damsteegt, E. L. (2014). Artificial induction of maturation in female silver eels, *Anguilla australis*: The benefits of androgen pre-treatment. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.026>
- Marí Herguido, J. I. (2019). Influencia del tratamiento con Fsh y Lh recombinantes en la espermatogénesis de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/120066>
- 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. *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1), S194–S223. <https://doi.org/10.1111/raq.12025>
- Miura, T., Ando, N., Miura, C., Yamauchi, K. (2002). Comparative Studies between in vivo and in vitro Spermatogenesis of Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Zoological Science*, 19(3), 321–329. <https://doi.org/10.2108/zsj.19.321>
- Mochioka, N., Iwamizu, M. (1996). Diet of anguilloid larvae: Leptocephali feed selectively on larvacean houses and fecal pellets. *Marine Biology*, 125(3), 447–452. <https://doi.org/10.1007/BF00353257>
- Morini, M., Peñaranda, D. S., Vílchez, M. C., Nourizadeh-Lillabadi, R., Lafont, A. G., Dufour, S., Asturiano, J. F., Weltzien, F. A., 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. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.009>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>
- Mylonas, C. C., Fostier, A., Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 516–534. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
- Otake, T., Nogami, K., Maruyama, K. (1993). Dissolved and particulate organic matter as possible food sources for eel leptocephali. *Marine Ecology Progress Series*, 92(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.3354/meps092027>
- Peñaranda, D. S., Gallego, 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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.002>

- 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. *Journal of Fish Biology*, 57(6), 1488–1504. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02227.x>
- Pérez, L., Barrera, R., Asturiano, J. F., Jover, M. (2004). Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *AquaTIC: Revista Electrónica de Acuicultura*, 20, 51–78.
- Riemann, L., Alfredsson, H., Hansen, M. M., Als, T. D., Nielsen, T. G., Munk, P., Aarestrup, K., Maes, G. E., Sparholt, H., Petersen, M. I., Bachler, M., Castonguay, M. (2010). Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, 6(6), 819–822. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0411>
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1098/rstb.1923.0004>
- van Ginneken, V. J. T., Maes, G. E. (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: A literature review. In *Reviews in Fish Biology and Fisheries* (Vol. 15, Issue 4, pp. 367–398). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-0005-8>