

# Uso de bombas osmóticas como método alternativo para inducir la maduración en hembras de anguila europea



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

## MÁSTER UNIVERSITARIO EN ACUICULTURA

Curso Académico 2020/21

Tesis de Fin de Máster

**Susana Silva González**

Dirigido por:

**Víctor Gallego Albiach**

**Luz Pérez Igualada**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecerse a mi familia y amigos por ser un apoyo incondicional en todos los proyectos de mi vida. En segundo lugar a Marina, Pablo, Luz y Johnny, por enseñarme los entresijos de la reproducción de peces y acogerme durante estos meses en el departamento. Y por último, a mi tutor Víctor, por todas las horas que ha invertido en enseñarme, pero sobre todo, por confiar en mí para participar en su proyecto.

## **FINANCIACIÓN**

El presente estudio se encuentra enmarcado dentro del proyecto “Aplicación de nuevas técnicas para el control de la reproducción de la anguila europea (ANTRA)”, financiado con la **Ayuda a Primeros Proyectos de Investigación (PAID-06-18), del Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de la Universitat Politècnica de València (UPV), València, Spain**. Este proyecto se encuentra dirigido por el investigador Víctor Gallego Albiach, que realiza su labor investigadora gracias a una ayuda postdoctoral **Juan de la Cierva-Incorporación (IJCI-2017-34200)** concedida por el MICIU.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>2</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
1.1 Biología y ecología de la especie	3
1.2 Amenazas, conservación y producción acuícola	4
1.3 El control de la reproducción: única alternativa sostenible	5
1.4 Nuevos métodos para inducir la maduración sexual en anguila europea	6
<b>2. Objetivos</b>	<b>7</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>7</b>
3.1 Instalaciones y animales de experimentación	7
3.2 Tratamientos hormonales: inyecciones vs bombas osmóticas	8
3.3 Evaluación del estado de maduración e inducción a la puesta	10
3.4 Fecundación, incubación y desarrollo embrionario	11
3.5 Análisis económico	12
3.6 Análisis estadístico	12
<b>4. Resultados</b>	<b>12</b>
4.1 Porcentaje de respuesta a los tratamientos	12
4.2 Evolución del peso de las hembras durante la maduración sexual	14
4.2.1 Evolución del peso de las hembras a lo largo del tratamiento	14
4.2.2 Incremento del peso durante la maduración	15
4.3 Índice gonadosomático (IGS) e índice de puesta	15
4.4 Desarrollo embrionario	16
4.5 Análisis económico	17
<b>5. Discusión</b>	<b>19</b>
5.1 Inducción a la maduración con bombas osmóticas	19
5.2. Análisis económico de los tratamientos hormonales	22
<b>6. Conclusiones</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>24</b>

## Resumen

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) es una especie con un elevado interés acuícola a nivel mundial y con una alta producción en el contexto de la acuicultura europea. Sin embargo, la piscicultura de anguilas se presenta como una actividad no sostenible en el tiempo, debido fundamentalmente a que las empresas dependen del abastecimiento de juveniles del medio natural. Además, actualmente se encuentra catalogada como especie en peligro crítico de extinción (UICN) debido a la reducción drástica de su población en las últimas décadas. Por lo tanto, la reproducción en cautividad de esta especie se presenta como una pieza clave para su conservación, lo que ayudará a reducir la presión sobre las poblaciones naturales, facilitará el abasteciendo a las anguilifactorías, y permitirá repoblaciones en zonas en las que históricamente se localizaba la anguila.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la aplicación de métodos alternativos de inducción de la maduración sexual (sistemas de liberación controlada, SLC) en hembras de anguila europea. Con la finalidad de desarrollar protocolos capaces de inducir la ovulación en anguila europea la evaluación se realizó tanto en términos biológicos como económicos. Los resultados mostraron que la implantación de bombas osmóticas indujo la maduración en el del 80% de las hembras, reduciendo la duración del tratamiento hormonal en un 50% de ellas, que alcanzaron la madurez en las primeras 4-10 semanas de tratamiento. Con respecto a la evolución del peso de las hembras durante la maduración se observó un incremento en la semana previa del  $16\pm 6\%$  en el grupo OP-2ML4 y del  $20\pm 14\%$  en el grupo control. En cuanto al índice gonadosomático (IGS), las hembras implantadas con bombas osmóticas presentaron valores similares al grupo control,  $49.5\pm 2.8\%$  y  $51.2\pm 9.8\%$ , respectivamente. Asimismo, se obtuvo un total de 6 puestas alcanzando el estado de embrión formado con la cabeza, ojos y somitas distinguible como máximo desarrollo embrionario.

Finalmente, este estudio demuestra que el uso de bombas osmóticas cargadas con extracto de hipófisis de carpa (CPE) se presenta como un método eficaz para inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea, generando maduraciones tempranas (semanas 4-10) en el 50% de hembras con una bomba implantada. No obstante, el análisis económico demuestra que las inyecciones semanales de CPE se presentan como un método más rentable para inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea.

**Palabras claves:** Reproducción; acuicultura; maduración sexual; bomba osmótica; CPE.

## Summary

The European eel (*Anguilla anguilla*) is a species with high aquaculture interest worldwide and with a high production in the context of European aquaculture. However, eel fish farming is presented as an unsustainable activity over time, mainly due to the fact that companies depend on the supply of juveniles from the natural environment. In addition, it is currently listed as a critically endangered species (IUCN) due to the drastic reduction in its population in recent decades. Therefore, the captive reproduction of this species is presented as a key element for its conservation, which will help reduce the pressure on natural populations, facilitate the supply of eel farms, and allow repopulation in areas where historically the eel was found.

The objective of the present study was to evaluate the application of alternative methods of induction of sexual maturation (controlled release systems, CRS) in female European eels. In order to develop protocols capable of inducing ovulation in European eel, the evaluation was carried out both in biological and economic terms. The results show that the implantation of osmotic pumps induced maturation in 80% of the females, reducing the duration of hormonal treatment in 50% of them, which reached maturation in the first 4-10 weeks of treatment. Regarding the evolution of the weight of the females during maturation, an increase in the previous week of  $16\pm 6\%$  in the OP-2ML4 group and  $20\pm 14\%$  in the control group. Regarding the gonadosomatic index (GSI), the females implanted with osmotic pumps presented similar values to the control group,  $49.5\pm 2.8\%$  and  $51.2\pm 9.8\%$ , respectively. Likewise, a total of 6 clutches were obtained, reaching the embryo state formed with distinguishable head, eyes and somites as maximum embryonic development.

Finally, this study shows that the use of osmotic pumps loaded with carp pituitary extract (CPE) is an effective method to induce sexual maturation in female European eels, generating early maturations (weeks 4-10) in 50% of females with an implanted pump. However, economic analysis shows that weekly injections of CPE are presented as a more cost-effective method to induce sexual maturation in female European eel.

**Keywords:** Reproduction; aquaculture; sexual maturation; osmotic pump; CPE.

# 1. Introducción

## 1.1 Biología y ecología de la especie

Las anguilas son peces teleósteos del orden Anguiliforme, de la familia Anguillidae, que cuenta únicamente con el género *Anguilla*. Las 19 especies que forman este género se encuentran distribuidas en los océanos Atlántico, Pacífico e Índico, y en el caso de la anguila europea (*Anguilla anguilla*), su área de distribución abarca todo el Mediterráneo y el Atlántico oriental desde Marruecos hasta Noruega (Van Ginneken *et al.*, 2005). 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). Además, 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.

La anguila europea es una especie migratoria de tipo catádromo, es decir, vive en aguas dulces durante la mayor parte de su vida y migra al mar para reproducirse, por lo que presenta un complejo ciclo vital (Figura 1). Después de vivir la mayor parte de su ciclo vital en agua dulce (9-20 años las hembras; 6-12 años los machos) (Pérez *et al.*, 2004), entran en un período de metamorfosis denominado “plateamiento” o “*silvering*”, que es una fase de preparación para su migración hacia el mar. En esta etapa la cabeza se vuelve puntiaguda, los ojos se agrandan, las aletas aumentan de tamaño y el color de su piel varía tomando tonos metalizados brillantes en la zona ventral, por lo que se las llama entonces anguilas plateadas o “*silver eels*”. Es entonces cuando la anguila europea comienza una migración en la que atravesará todo el Océano Atlántico hasta llegar al Mar de los Sargazos, donde realizará el desove (Van Ginneken *et al.*, 2005). De los huevos nacen unas larvas aplanadas denominadas leptocéfalos, que volverán a las costas europeas y africanas nadando activamente ayudados por la corriente del Golfo de Méjico. Cuando se aproximan a la plataforma continental, los leptocéfalos sufren una metamorfosis en la que disminuye su longitud, los órganos varían de lugar y de forma, pierden los dientes originales, y el cuerpo, antes aplanado, adopta una forma redondeada. El nuevo estadio es de menor longitud (6-7 cm) que la larva de la que procede, carece de dientes y es aún algo transparente: es la conocida anguila sin pigmentar o *glass eel*.

Las anguilas entran en los ríos o canales por la noche, en grandes grupos, coincidiendo en general con las fases de luna nueva, en las que son menos detectables por los predadores. En este momento comienzan a alimentarse y a crecer, adquieren nuevos dientes y su piel adopta la pigmentación grisácea característica de las anguilas. Pasados los 12 cm de longitud, se denominan angulones. Cuando alcanzan mayores tamaños empiezan a denominarse anguilas amarillas, ya que la pigmentación

durante toda su vida en las aguas dulces es amarillenta en el vientre y parda o verdosa en la zona dorsal. Esta fase de crecimiento puede prolongarse de 6 a 20 años, dependiendo del sexo (entre 6-12 años en los machos y entre 10-20 años en las hembras) y las condiciones del entorno. Los machos crecen hasta alcanzar normalmente entre 30-50 cm de longitud total y 200 g de peso, y las hembras entre 55-150 cm de longitud total y 2000 g de peso. Su permanencia en el río finaliza en la fase de plateamiento, que corresponde al inicio de su maduración sexual. En esta fase la pigmentación del animal vuelve a cambiar, la zona lateral y ventral adquiere un tono plateado y el dorso se oscurece.



**Figura 1.** Esquema del ciclo biológico de la anguila europea (*Anguilla anguilla*). (A) Larva leptocéfalo. (B) Anguila sin pigmentar o *Glass eel*. (C) Anguila amarilla. Fuente: EPGGráficos.

## 1.2 Amenazas, conservación y producción acuícola

La anguila era una especie relativamente abundante hasta la década de los 70. Desde entonces, sus stocks se han reducido de manera vertiginosa, y se estima que la población actual podría representar únicamente un 1,4% del stock existente en los años 60-80 (ICES 2019). La sobrepesca (tanto en su fase de anguila como en su fase adulta), junto con otros factores como la contaminación, la construcción de barreras que impiden su migración, la pérdida de hábitat, cambio climático, etc., han sido la causa de este marcado descenso poblacional (ICES 2019). Estas amenazas han situado a la especie con unos niveles poblacionales críticos, por lo que actualmente se encuentra catalogada como especie en peligro crítico de extinción (UICN). A pesar de su delicado estatus de conservación, la anguila europea sigue siendo una especie de elevado interés acuícola a nivel mundial, con una elevada producción en el contexto de la acuicultura europea (7760 Tm, FAO 2018). A pesar de que su consumo se extiende desde países del Mediterráneo (España, Francia o Italia) hasta las regiones escandinavas (Noruega, Suecia o Dinamarca), es en el continente asiático donde la anguila se presenta como un producto estrella de la gastronomía, y donde se consume la mayor parte de la producción mundial.

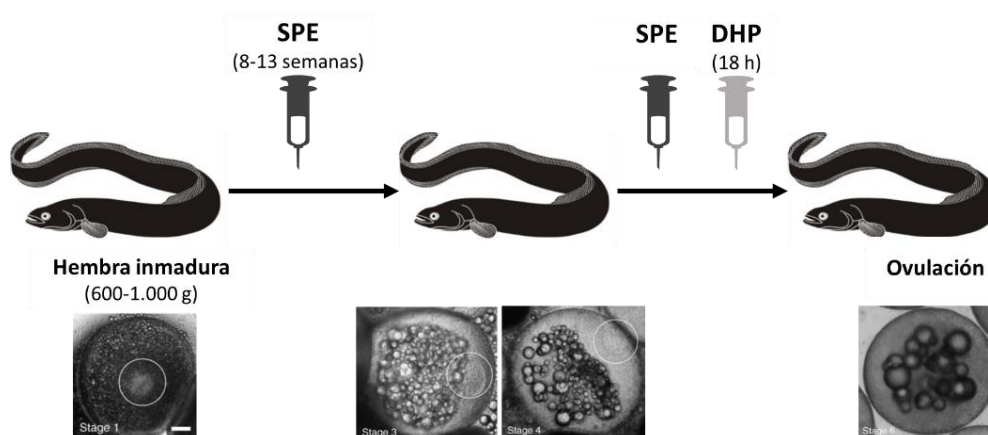
No obstante, la piscicultura de anguilas se presenta como una actividad no sostenible en el tiempo, debido fundamentalmente a que las empresas dependen del abastecimiento de juveniles (angulas) para su engorde hasta talla comercial. En este sentido, la reproducción en cautividad de esta especie se presenta como una pieza clave para su conservación, lo que ayudará a reducir la presión sobre las poblaciones naturales, facilitará el abasteciendo a las anguilifactorías, y permitirá repoblaciones en zonas en las que históricamente se localizaba la anguila.

### 1.3 El control de la reproducción: única alternativa sostenible

Uno de los problemas fundamentales en la producción de cualquier especie acuícola es el abastecimiento de alevines de forma regular y sostenible en el tiempo. A pesar del interés económico y medioambiental, actualmente todavía no se ha podido completar el ciclo reproductivo de la anguila en cautividad, debido posiblemente a las particularidades de su migración transoceánica y al desconocimiento de las condiciones reales de freza en el Mar de los Sargazos.

La manipulación de la temperatura y del fotoperiodo ha servido para romper la estacionalidad en la reproducción de diversas especies de teleósteos de latitudes templadas (dorada, lubina, etc.). Sin embargo, las peculiaridades del ciclo reproductivo que presenta esta especie han hecho difícil la experimentación de este tipo de variables ambientales, por lo que en la actualidad la maduración de anguilas se lleva a cabo mediante tratamientos hormonales de larga duración (Figura 2).

Los primeros experimentos de inducción hormonal de la maduración en la anguila europea se realizaron por Fontaine *et al.* (1964) en el Museo Nacional de Historia Natural de París. Por primera vez se obtuvieron huevos maduros de anguila aplicando tratamientos de extractos de hipófisis de carpa (CPE, del inglés carp pituitary extract). Desde entonces cabe destacar algunos estudios como el Boetius *et al.* (1980) en el que, aplicando tratamientos combinados de gonadotropina coriónica humana (hCG, del inglés human corionic gonadotropin) y CPE, lograron inducir índices gonadosomáticos (IGS) máximos de 60.7%.



**Figura 2.** Esquema del protocolo de inducción hormonal para la maduración sexual de hembras de anguila japonesa (Modificación de Ohta *et al.*, 1997 y Palstra *et al.*, 2005).



Además, diversos grupos de investigación han realizado ensayos de fecundación e incubación con hembras de anguila europea (Pérez *et al.*, 2000, 2011; Palstra *et al.*, 2005), pero la calidad de las puestas es muy variable. El grupo GAB-UPV logró en 2012 producir las primeras larvas de anguila en España, y también se ha logrado producir larvas en Dinamarca, Italia y Países Bajos. El grupo de investigación del Instituto Danés para la Investigación Pesquera de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU-Aqua) es el que mayores avances ha realizado, ya que ha logrado recientemente obtener larvas de anguila que sobreviven durante 56 días, aunque aún no se ha publicado con detalle el método empleado para ello. En el caso de hembras de anguila, la administración semanal de CPE o extractos de hipófisis de salmón (SPE) ha sido el tratamiento hormonal más utilizado para la inducción de la maduración ovárica y la puesta en distintas especies de anguila (Okamura *et al.*, 2014).

#### **1.4 Nuevos métodos para inducir la maduración sexual en anguila europea**

En este tipo de tratamientos hormonales es posible encontrar hembras que nunca responden a los tratamientos o bien, hembras que producen oocitos de baja calidad y que motivan una baja supervivencia larvaria. En este sentido, la continua manipulación de los animales (anestesia, marcaje, inyección, etc.) semana tras semana, podría inducir efectos negativos en el proceso de maduración, generando una alta variabilidad en las respuestas a los tratamientos y por tanto, en la calidad de los gametos. Por otro lado, es importante tener en cuenta que la manipulación semanal de las hembras es mucho más costosa en tiempo y esfuerzo que la de los machos, ya que estas presentan un peso mucho mayor (>1 kg) y su manejo semanal resulta más complicado. En este sentido, el estudio de técnicas alternativas que minimicen el estrés de los animales durante el tratamiento de inducción de la maduración (implantes, bombas osmóticas, etc.) debe ser una herramienta esencial para optimizar los protocolos de maduración en esta especie.

En los últimos años, uno de los sistemas de liberación controlada (SLC) que se están estudiando para inducir la maduración sexual en distintas especies de peces son las bombas osmóticas (Mylonas *et al.*, 2001; Zohar *et al.*, 2001). Se trata de un dispositivo de administración a largo plazo de medicamentos y hormonas que reduce la manipulación de los animales, disminuyendo así el estrés. En 2013 Kagawa *et al.*, estudiaron los efectos de administrar hCG, SPE y GnRHa (del inglés gonadotropin-releasing hormone antagoniste) a través de una bomba osmótica para inducir la maduración sexual en las hembras de la anguila japonesa, *Anguilla japonica*. Su estudio concluyó que los tratamientos de SPE administrados mediante bombas osmóticas son un método eficaz para inducir la vitelogénesis en esta especie. Actualmente los tratamientos de inducción hormonal en hembras tienen un elevado coste, ya que la hipófisis de carpa o salmón cuesta 290 €/g y se necesita una media de 164 g para un tratamiento de 14 semanas. Por lo tanto, para conseguir la reproducción en cautividad de la anguila son necesarios tratamientos de inducción a la maduración más baratos y eficaces.

## 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”, trata de evaluar la aplicación de métodos alternativos de inducción de la maduración en hembras 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 oogénesis en esta especie. Los objetivos específicos a desarrollar fueron:

- i. Aplicar y validar el uso de bombas osmóticas para inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea.
- ii. Analizar la rentabilidad económica del uso de bombas osmóticas como método alternativo para la inducción de la maduración sexual en hembras de anguila europea.

## 3. Material y métodos

### 3.1 Instalaciones y animales de experimentación

Un total de 21 hembras de anguila europea (peso medio de  $740.8 \pm 146.4$  g) capturadas durante su migración al mar fueron compradas a la Cofradía de Pescadores del Palmar (Valencia). Las anguilas se transportaron a las instalaciones del laboratorio de acuicultura en el Universidad Politécnica de Valencia y, antes de su introducción en los tanques, se sometieron a una desinfección previa con un baño de formol (formalina comercial, 1:5000 v/v) y a una inyección de antibiótico (septrin, 20 mg/kg).

Los animales se repartieron en 4 tanques de fibra de vidrio de 250 l (agua dulce). La instalación cuenta con un equipo de última generación desarrollado por IRTAmar® que permite estudiar y controlar múltiples variables de manera continuada a lo largo del tiempo, además de tener un sistema de refrigeración y recirculación independientes. Los tanques se mantuvieron tapados con cubiertas negras para mantener la máxima oscuridad posible. Las hembras se marcaron con microchips (ID-100A Microtransponder, Trovan), que se insertaron en el músculo dorsal cercano a la aleta pectoral para su identificación individual. Finalmente, se incrementó la salinidad de forma progresiva durante 8 días, hasta alcanzar 37 g/l. El incremento se realizó por mezcla con agua de mar procedente de la costa, almacenada en un depósito del Laboratorio de Acuicultura. Durante el tiempo de cambio de salinidad, la temperatura del agua se mantuvo a 15 °C.

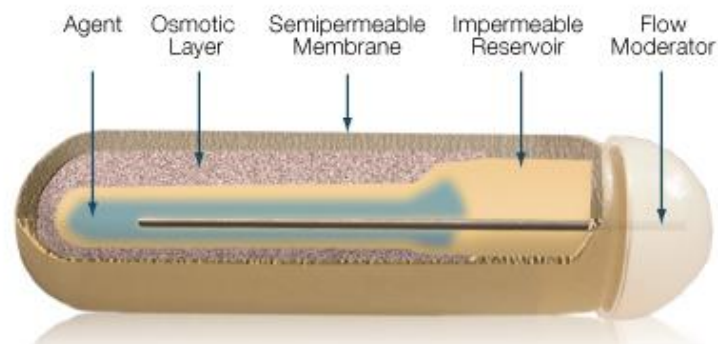
### 3.2 Tratamientos hormonales: inyecciones vs bombas osmóticas

Las anguilas se dividieron en 2 grupos: un grupo control (n=11) y un grupo experimental (n=10). Las hembras del grupo control fueron maduras mediante inyecciones semanales con extracto de hipófisis de carpa (CPE, Catvis, Ltd), en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal. La preparación previa de CPE se realizó por dilución en suero fisiológico (NaCl 0.9 g/100 ml), en una concentración de 0.1 g CPE/ml suero (Figura 3). Tras agitación, la mezcla se centrifugó (3000 rpm, 10 minutos) y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso. La dosis usada para cada pez (20 mg/kg peso corporal) se ajustó semanalmente en función del peso de cada animal.



**Figura 3.** Preparación de la dilución de CPE usada en las inyecciones semanales. (A) y (B) Imágenes del material utilizado para la preparación de CPE. (C) Inyección semanal de CPE en la zona ventral.

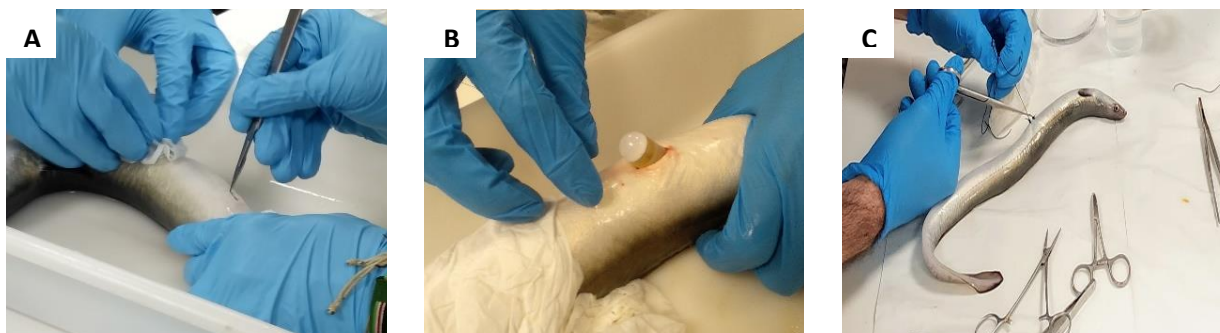
Para inducir la maduración en las hembras del grupo experimental (OP-2ML4) se utilizaron bombas osmóticas (Alzet Osmotic Pumps) como sistema de liberación controlada, las cuales se implantaron intraperitonealmente al inicio del experimento. A partir de la semana 10, este grupo experimental siguió recibiendo inyecciones intraperitoneales de CPE de la misma manera que el grupo control (20 mg/kg de peso corporal). La bomba osmótica utilizada es del tipo Alzet-OP-2ML4, que tiene una duración de 10 semanas, un volumen de depósito de 2000  $\mu$ l (2 ml) y presenta una tasa de liberación de 2.5  $\mu$ l/h (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema descriptivo de las distintas partes de una bomba osmótica tipo Alzet OP-2ML4. (Fuente: ALZET®)

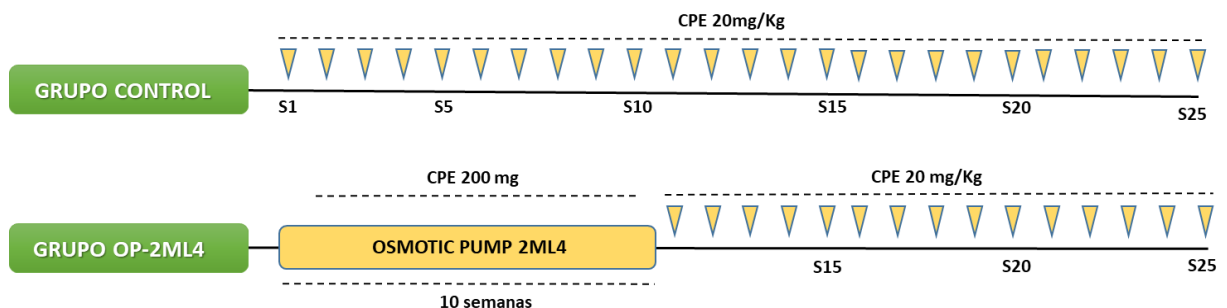
Para el llenado de la bomba osmótica se preparó una dilución de CPE en suero fisiológico (NaCl 0.9 g/100 ml), en una concentración de 0.1 g CPE/ml suero. Tras agitación, la mezcla se centrifugó (3000 rpm, 10 minutos) y se usó el sobrenadante para el llenado del depósito de la bomba osmótica. El proceso se realizó usando una jeringa pequeña (3 ml) e inyectando lentamente la dilución con la bomba dispuesta verticalmente para evitar introducir burbujas de aire en el depósito. Se realizó un pesaje de la bomba osmótica antes y después del llenado para calcular el peso neto de la dilución.

Las bombas osmóticas fueron implantadas intraperitonealmente al inicio del experimento (Figura 5). Los animales se anestesiaron con benzocaína (60 ppm), se limpió la zona de implantación con alcohol y se les realizó una abertura de aproximadamente 8 mm en el abdomen con un bisturí fino. La herida fue suturada con puntos quirúrgicos y adhesivo cutáneo. Al grupo control se le realizó la misma cirugía y se le introdujo un objeto similar en forma y tamaño a las bombas osmóticas Alzet OP-2ML4.



**Figura 5.** Procedimiento de la inserción de las bombas osmóticas. (A) Apertura para la implantación de la bomba osmótica. (B) Implantación de la bomba osmótica. (C) Suturación con puntos quirúrgicos.

Cada semana se realizaba un muestreo del grupo control y del grupo experimental OP-2ML4. Para ello, en primer lugar se extraían todas las hembras de un determinado tanque/tratamiento a otros depósitos menores (cubos de 50 l) con agua de mar, benzocaína (60 ppm) y aireación. Posteriormente se leía el chip con un lector (Trovan Ltd.) y se preparaba la dosis de CPE correspondiente a esa hembra. Durante todo el experimento se registró el peso de cada pez, para comprobar los cambios de peso relacionados con la maduración. La Figura 6 muestra de manera gráfica el diseño experimental.



**Figura 6.** Esquema de la distribución de las dosis de CPE en el grupo control y OP-2ML4. Los triángulos representan las inyecciones semanales de CPE (dosis de 20 mg/kg de peso corporal). (Fuente: propia).

### 3.3 Evaluación del estado de maduración e inducción a la puesta

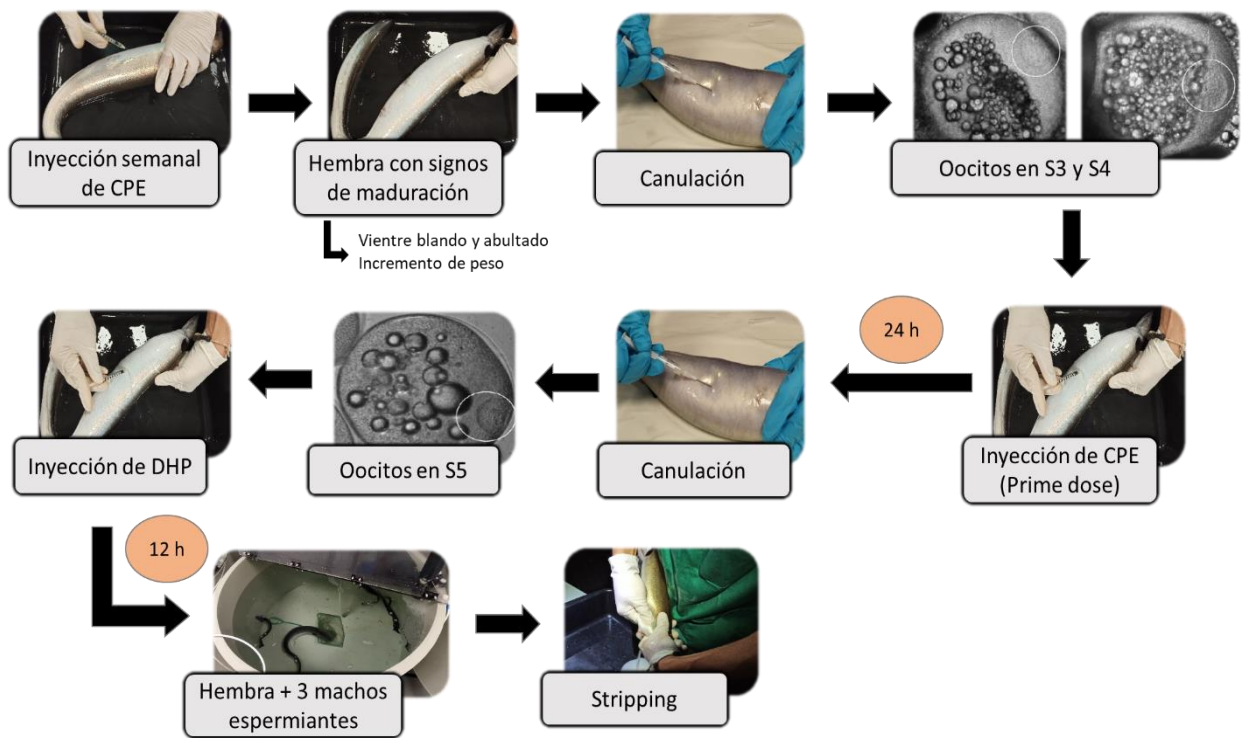
Las hembras que, en el momento de la inyección semanal de CPE mostraron el vientre abultado acompañado por un incremento de peso, se mantuvieron en un tanque aparte, para realizar un seguimiento de su evolución en los días posteriores, sin perturbar al resto de peces. Si el grado de abultamiento del vientre era importante, se realizaba una canulación por medio de jeringas con una abertura de 1.6 mm de diámetro. Se extraía una muestra de oocitos, que se observaban de inmediato en una lupa Leica MZ16F, con cámara FullHD modelo MOTICAM 1080.

Los estados de maduración alcanzados se clasificaron de acuerdo con la escala publicada por Palstra *et al.*, 2005. Si los oocitos de una determinada hembra se encontraban en estado de migración nuclear, es decir, en fase 3 o 4, se procedía al protocolo de inducción de la maduración final de dicha hembra que aparece resumido en los siguientes puntos:

- i. Inyección de CPE (Prime Dose, PD) con la misma dosis que la inyección semanal (20 mg/kg peso corporal) y dos días tras la dosis semanal.
- ii. Transcurridas 24 horas tras la segunda inyección de CPE (PD), se pesaban y canulaban de nuevo; los oocitos se observaban a la lupa.
- iii. Si el estado de maduración de los oocitos correspondía con un estado de migración nuclear avanzada (fase 5 según la escala publicada por Palstra *et al.*, 2005 ) se administraba a la hembra una inyección de DHP (dihidroxiprogesterona), diluida en etanol y agua 1:1 v/v, a una dosis de 2 mg/Kg de peso corporal (Ohta *et al.*, 1997).
- iv. Tras la inyección de DHP, las hembras se transferían a otro tanque de 1500 l a 20°C hasta el momento de la puesta.
- v. Durante este periodo, las hembras se mantuvieron con 3 machos espermiantes.
- vi. Aproximadamente 12 horas tras la inyección de DHP se esperaba la puesta.
- vii. Transcurridas 9h tras la dosis de DHP, las hembras se trasladaban a un cubo, también a 20 °C, desde donde pudiera palparse su vientre y observar la expulsión de oocitos al exterior.

Las hembras se observaron y palparon de forma periódica desde las 11 h tras la inyección de DHP hasta el momento de la ovulación. Cuando la hembra comenzaba a liberar oocitos al ser presionada ligeramente en el abdomen, se procedía al *stripping* o masaje abdominal. En primer lugar, se sedaba muy ligeramente a la hembra. Antes de comenzar la recolección de huevos, se limpiaba la superficie abdominal con agua destilada para evitar la activación de los huevos con agua de mar. Sobre una bandeja de plástico previamente tarada, se realizaba el *stripping* y se anotaba el peso total de los huevos obtenidos.

A continuación, en la figura 7 se muestra un esquema detallado de los pasos del protocolo usado para la inducción de la maduración de la anguila durante este proyecto y que se ha descrito anteriormente.



**Figura 7.** Esquema que muestra el protocolo usado para inducción de la maduración gonadal de hembras de anguila durante este proyecto. (Fuente: propia).

### 3.4 Fecundación, incubación y desarrollo embrionario

La fecundación y la incubación de los huevos fertilizados se realizó según el protocolo descrito por Butts *et al.*, (2014). Dos horas antes de la hora prevista de la puesta, se seleccionó el esperma de 3-4 machos, se evaluó su calidad mediante un sistema CASA (*Computer Asisted Sperm Analysis System*) y se conservó diluido (1/100 en medio P1, Peñaranda *et al.*, 2010) a 4 °C.

Tras el *stripping* (Figura 8A), parte de la puesta se fecundaba en placas Petri, y el resto en la propia bandeja de recolección. En primer lugar, se añadía esperma diluido (Figura 8B) a los huevos y se realizaba una mezcla suave. Tras este paso, se añadió agua de mar (Figura 8C) y pasados 5 minutos, los huevos se transfirieron a los distintos sistemas de incubación. Los huevos fertilizados en la placa Petri se transfirieron a vasos de precipitados de 250 ml y los huevo fertilizados en la bandeja se repartieron entre vasos de precipitados (5000 ml), botellas de incubación (500 ml) e incubadores troncocónicos con flujo ascendente.



**Figura 8.** Proceso de fecundación. (A) *Stripping*. (B) Fecundación con esperma. (C) Adición de agua de mar.

La temperatura de incubación osciló entre 19 y 21°C, según las puestas. Tras 4-6 horas post-fecundación (h.p.f.), se tomaron muestras de los oocitos flotantes de cada puesta, y se observaron en una lupa Leica MZ16F, con una cámara FullHD modelo MOTICAM 1080 acoplada, para posteriormente evaluar la tasa de fecundación y la evolución del desarrollo embrionario. Durante la incubación, se retiraron de forma periódica los huevos muertos (opacos) y se realizaron renovaciones del agua.

### 3.5 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.

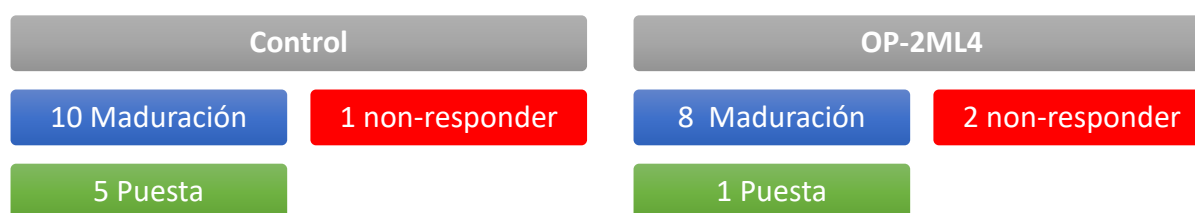
### 3.6 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante SPSS, donde las medias se compararon mediante la realización de un análisis T-student. Los datos que no presentaron una distribución normal se evaluaron mediante una 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 respuesta a los tratamientos

En la figura 9 se muestra la respuesta al tratamiento del grupo control y OP-2ML4. De las 11 hembras del grupo control, 10 llegaron al estado de maduración y 1 no respondió al tratamiento. De las 10 hembras que maduraron, a 5 de ellas se les indujo la ovulación. Por otra parte, de las 10 hembras sometidas al tratamiento mediante bombas osmóticas (OP-2ML4), 8 llegaron al estado de maduración y 2 no respondieron al tratamiento. Tan solo a una de las 8 hembras que maduraron se le pudo inducir la ovulación. En resumen, en el tratamiento control se produjo la maduración del 91% de las hembras, y en el grupo OP-2ML4, del 80% de las hembras.



**Figura 9.** Representación esquemática de la respuesta al tratamiento del grupo control y grupo OP-2ML4.



En las Tablas 1 y 2 se muestra el resumen de las distintas maduraciones (color azul) y puestas (color verde) obtenidas en ambos grupos. En el grupo control se realizaron 5 puestas mediante *stripping* y en el grupo OP-2ML4 la única puesta obtenida fue espontánea, es decir, que la hembra comenzó a liberar huevos en el tanque sin necesidad de masaje abdominal.

**Tabla 1.** Parámetros preovulatorios (incremento de peso), ovulatorios (tipo de puesta y peso de los huevos ovulados) del grupo control.

Grupo Control						
Hembra	Semanas de tratamiento	Incremento de peso (%)	Puesta	Tipo de puesta	Peso gónada o huevos (g)	IGS o Índice de puesta
CO-1	15	38	No	-	330	49.3
CO-2	16	29	No	-	450	46.6
CO-3	13	68	Sí	<i>Stripping</i>	132	19.3
CO-4	14	8	Sí	<i>Stripping</i>	280	40.9
CO-5	13	26	No	-	-	-
CO-6	13	13	Sí	<i>Stripping</i>	232	29.2
CO-7	16	40	No	-	353	55.1
CO-8	17	32	No	-	449	53.8
CO-9	13	-4	Sí	<i>Stripping</i>	282	33.4
CO-10	13	34	Sí	<i>Stripping</i>	439	43.8

% Incremento de peso= peso final\*100\* peso inicial<sup>-1</sup>; IGS= peso gónada\*100\* peso animal<sup>-1</sup>; Índice de puesta= peso huevos\*100\* peso animal<sup>-1</sup>.

**Tabla 2.** Parámetros preovulatorios (incremento de peso), ovulatorios (tipo de puesta y peso de los huevos ovulados) del grupo OP-2ML4.

Grupo OP-2ML4						
Hembra	Semanas de tratamientos	Incremento de peso (%)	Puesta	Tipo de puesta	Peso gónada o huevos (g)	IGS o Índice de puesta
OP-1	4	24	No	-	-	-
OP-2	4	11	No	-	-	-
OP-3	10	31	No	-	-	-
OP-4	20	4	No	-	530	51.5
OP-5	23	3	No	-	411	47.5
OP-6	8	20	No	-	-	-
OP-7	6	36	No	-	-	-
OP-9	23	-1	Sí	Espontánea	258	26.9

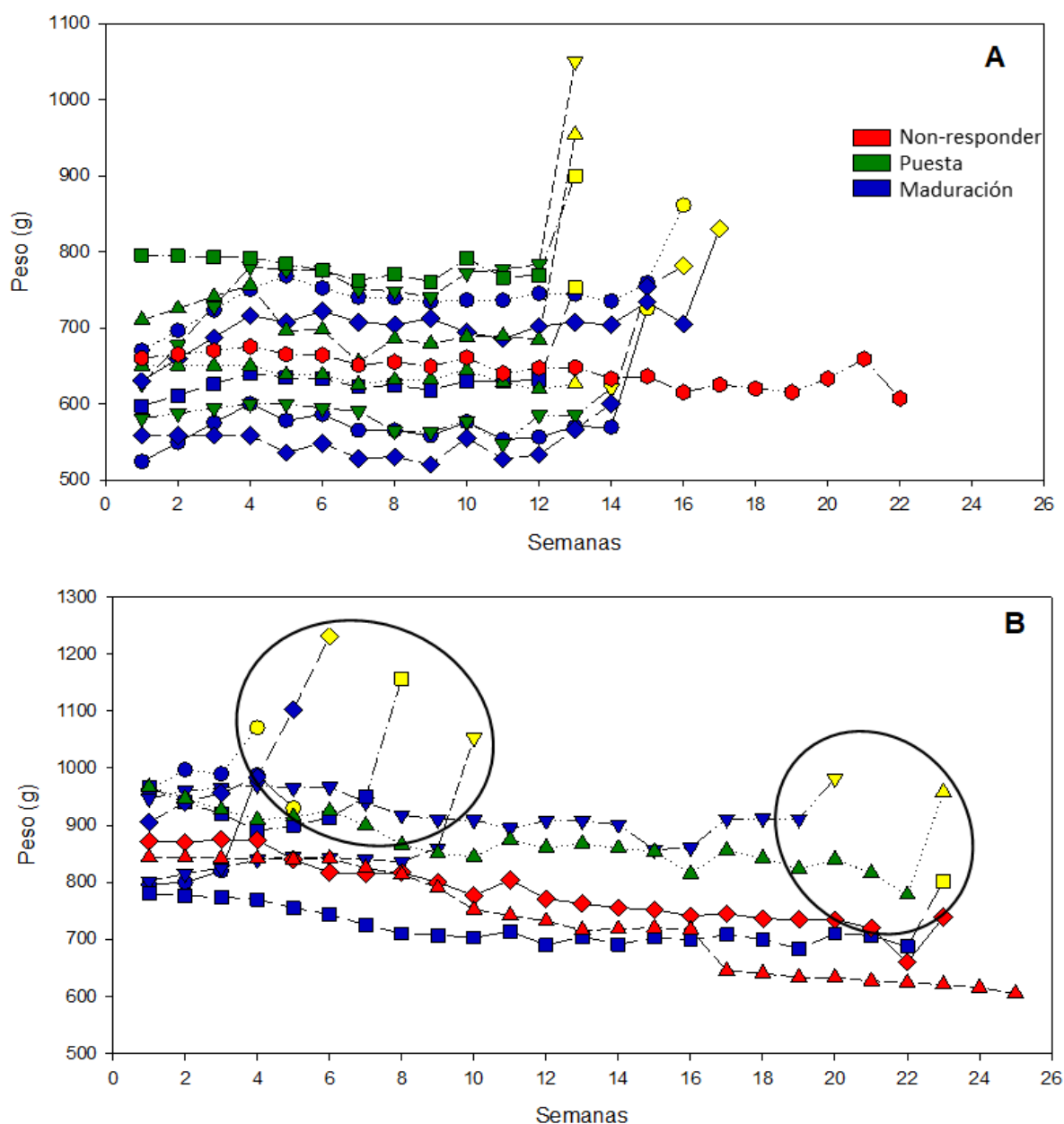
% Incremento de peso= peso final\*100\* peso inicial<sup>-1</sup>; IGS= peso gónada\*100\* peso animal<sup>-1</sup>; Índice de puesta= peso huevos\*100\* peso animal<sup>-1</sup>.



## 4.2 Evolución del peso de las hembras durante la maduración sexual

### 4.2.1 Evolución del peso de las hembras a lo largo del tratamiento

Según muestra el gráfico (Figura 10), en general todas las hembras que han respondido al tratamiento han mostrado un incremento de peso en las semanas previas a la maduración, tanto en el grupo control como en el grupo OP-2ML4, con un aumento medio de  $20\pm 14\%$  en las hembras control y de  $16\pm 6\%$  en las hembras OP-2ML4. No obstante, es importante resaltar que algunos animales (p. ej. CO-9) maduraron y ovularon sin mostrar un incremento de peso significativo en las semanas previas. En las hembras que no respondieron al tratamiento se pudo apreciar una disminución de peso progresivo (CO-11 en el grupo control; OP-8 y OP10 en el grupo OP-2ML4).



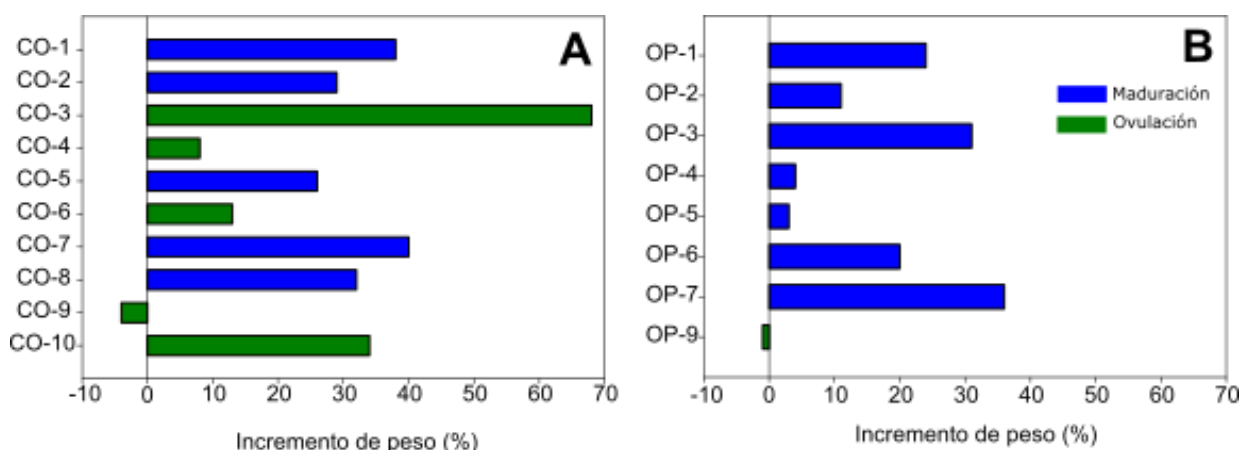
**Figura 10.** Evolución del peso individual en gramos del grupo control (A) y grupo OP-2ML4 (B). Los símbolos en amarillo marcan el final de la maduración u ovulación de cada animal.

En cuanto al número de semanas de tratamientos, observamos que en el grupo control, todas las hembras maduraron entre las semanas 13-17 de tratamiento. Sin embargo, en el grupo OP-2ML4 aparecieron dos fases de maduración: una fase temprana (con hembras maduras entre 4-10 semanas), y una fase de maduración tardía (20-23 semanas).

#### 4.2.2 Incremento del peso durante la maduración

Hubo diferencias significativas ( $p\text{-value}\leq 0.05$ ) en el incremento de peso (con respecto al inicio del tratamiento hormonal) entre ambos grupos experimentales (Figura 11). El grupo control presenta un incremento de peso medio de  $28\pm 20\%$ , con un máximo del 68% (CO-3) y un mínimo del 8% (CO-4), mientras que el incremento de peso medio del grupo OP2ML4 es de  $16\pm 14\%$ , con un máximo de 36% (OP-7) y un mínimo de 3% (OP-5).

En general, se observó un incremento de peso (con respecto al inicio del tratamiento hormonal) a lo largo de todo el periodo de maduración. Sin embargo, algunas hembras (CO-9 y OP-9) presentaron una disminución del 4% y 1%, respectivamente. Se trata de un caso particular en el que las hembras maduraron y ovularon sin mostrar un incremento de peso previo a la maduración.



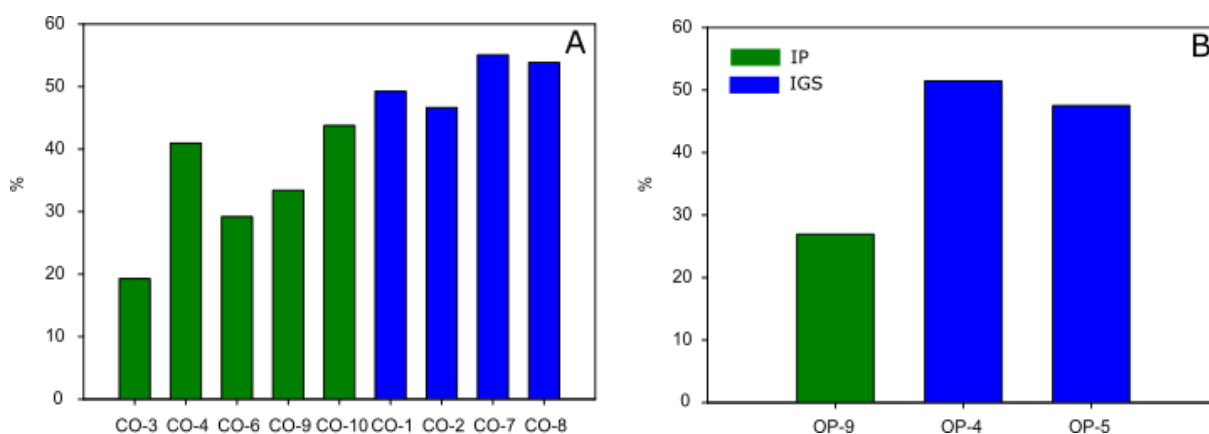
**Figura 11.** Incremento de peso en porcentaje del grupo control (A) y grupo OP-2ML4 (B).

Todas las hembras que se inyectaron con DHP presentaron respuesta ovulatoria, sin excepción. Además, el 95% de las hembras que maduraron sobrevivieron y se mantuvieron posteriormente en el laboratorio durante un período mínimo de 6-7 semanas.

### **4.3 Índice gonadosomático (IGS) e índice de puesta**

El índice gonadosomático (IGS) se define como el porcentaje de peso corporal que corresponde a gónada, mientras que, el índice de puesta (IP) se define como el porcentaje de peso corporal que corresponde a huevos. La diferencia entre ambos parámetros es que el IGS usa el peso de las gónadas para calcular el porcentaje final y el IP usa el peso de los huevos. En el presente estudio, el IGS medio

de las hembras maduras del grupo control fue de  $51.2 \pm 9.8\%$  con un máximo de 55.1% (CO-7) y un mínimo de 46.6% (CO-2) (Figura 12-A). Resultados similares se observaron en el grupo OP-2ML4 con un IGS medio de  $49.5 \pm 2.8\%$ , con un máximo y mínimo de 51.5% (OP-4) y 47.5% (OP-5), respectivamente (Figura 12-B). Las hembras del grupo control de las que se obtuvo puesta presentaron un IP medio de  $33.3 \pm 9.8\%$ , siendo el máximo de 43.8% (CO-4) y el mínimo de 19.3% (CO-3). Tan sólo se obtuvo una puesta del grupo OP-2ML4 con un índice de puesta del 26.9% (OP-9).

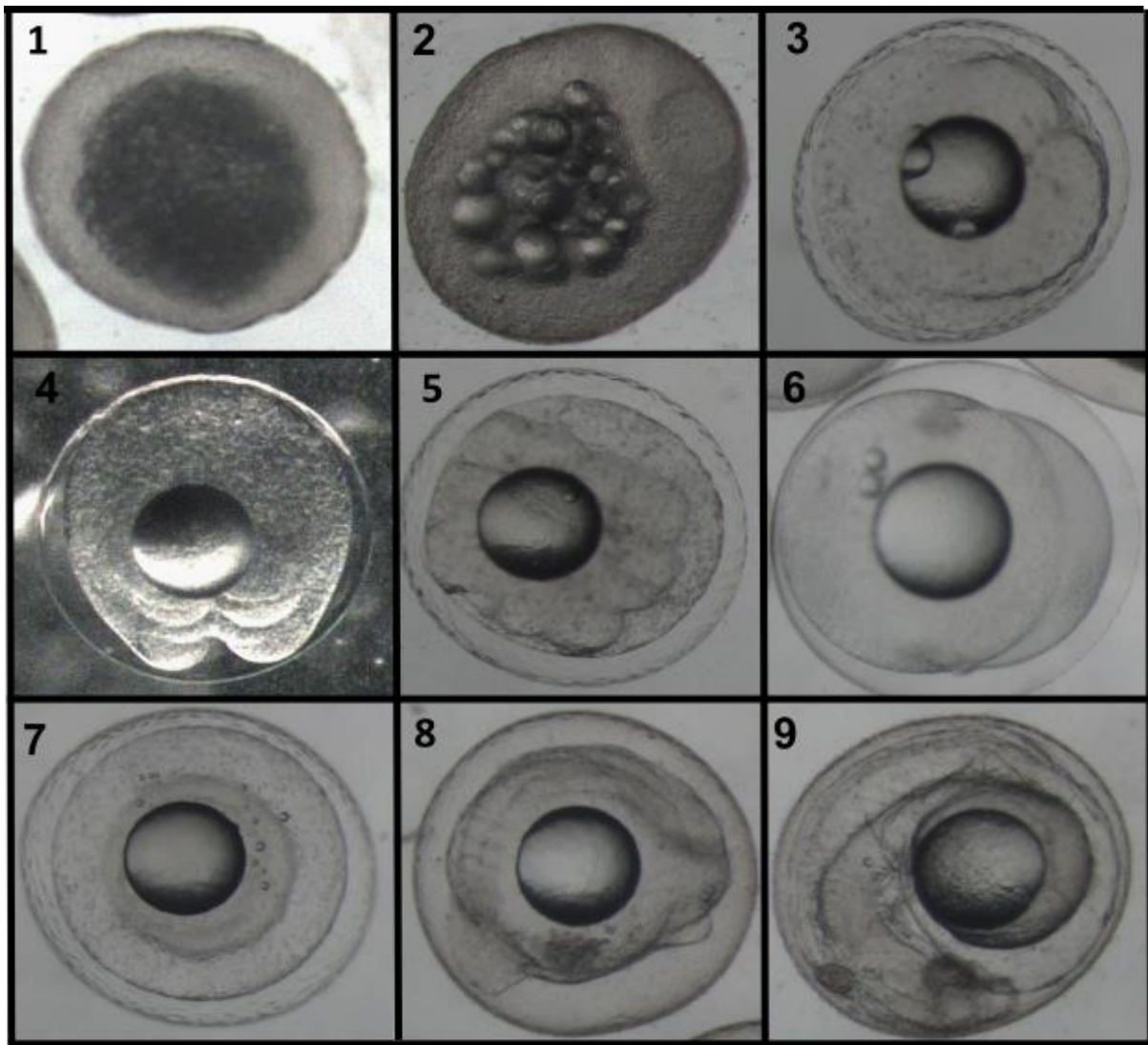


**Figura 12.** Porcentaje de IGS (azul) e índice de puesta (verde) de las hembras a las que se les pudo hacer una disección o llegaron a la ovulación, tanto del grupo control (A) como del grupo OP-2ML4 (B). (IGS= peso gónada x 100 x peso animal-1; Índice de puesta= peso huevos x 100 x peso animal-1)

#### 4.4 Desarrollo embrionario

A lo largo del experimento se obtuvieron un total de 6 puestas (5 en el grupo control y 1 en el grupo OP-2ML4). Todas ellas se llevaron a incubación embrionaria, dónde el máximo desarrollo embrionario que observamos fue el de embrión formado con la cabeza, ojos y somitas claramente distinguibles.

La figura 13 muestra las distintas fases de desarrollo embrionario, desde el oocito sin fertilizar (Fig. 13-1) hasta el máximo desarrollo alcanzado (Fig. 13-9). Los estados de mórula, definidos por un número de células entre 32-64 con formas redondeadas u ovoides (Fig. 13-5), aparecieron entre las 4-5 horas post-fecundación (h.p.f.). Posteriormente, entre las 5-6 h.p.f., aparecieron los estados de blástula (Fig. 13-6), que se definen por un nº de células >128, con aspecto redondeado y células poco visibles. La gastrulación (Fig. 13-7) se observó entre las 7-9 h.p.f. La segmentación, con aparición de somitas y notocorda claramente visible, se observó a las 30 h.p.f (Fig. 13-8). Y a las 30 h.p.f, el embrión presentaba una segmentación más completa y la cola parcialmente libre (Fig. 13-9).



**Figura 13.** Evolución del desarrollo embrionario. (1): oocito inmaduro; (2): estado de migración nuclear avanzada; (3): estado de 4 células (5h 30' p.f.); (4): estado de 8 células (6h 20' p.f.); (5): mórula de células grandes (6h p.f.); (6): blástula, vista lateral (6h 20' p.f.); (7): inicio gastrulación (6h 50' p.f.); (8): estado de segmentación (30h 15' p.f.); (9): embrión con la cabeza, ojos y somitas distinguible (33h p.f.).

#### 4.5 Análisis económico

Para el análisis económico (inyecciones semanales vs bombas osmóticas) se tuvieron en cuenta diversos factores como son el coste de las dosis hormonales de CPE, el número de semanas de tratamiento, el coste de las jeringas o bombas osmóticas y el coste de las horas de personal.

La tabla 3 recoge los costes económicos asociados a la maduración gonadal de hembras de anguila europea. En ella se evalúa la rentabilidad de inducir la maduración gonadal mediante inyecciones semanales durante 10 y 15 semanas de tratamiento (Control-10s y Control-15s, respectivamente), y mediante el uso de bombas osmóticas como sistema de liberación hormonal controlada cuya vida útil es de 10 semanas (OP-2ML4).

Los resultados mostraron que el coste de la inducción a la maduración gonadal mediante el uso de bombas osmóticas (1421 €) fue mucho más elevado en comparación al tratamiento mediante

inyecciones semanales, teniendo en cuenta tanto un tratamiento con una duración de 10 como de 15 semanas (683 € y 984.8 €, respectivamente). La tasa de éxito, medida como el número de hembras que han madurado durante ese periodo de tratamiento, fue mucho más elevada en el tratamiento con inyecciones semanales de CPE (90%), en comparación al tratamiento con bombas osmóticas, con un 50% de éxito durante las primeras 10 semanas. Por tanto, el coste económico por hembra madura fue tres veces superior en el tratamiento con bomba osmótica (284.2 €) en comparación al tratamiento con inyecciones semanales de CPE (109.4 €; Control-15s). No obstante, el tratamiento de bombas osmóticas pudo inducir la maduración gonadal en menos de 10 semanas, mientras que el tratamiento con inyecciones semanales de CPE necesitó un rango de 13 a 17 semanas.

**Tabla 3.** Coste económico de la inducción hormonal a la maduración gonadal para un tratamiento aplicado mediante inyecciones semanales durante 10 o 15 semanas y para un tratamiento aplicado mediante bomba osmótica. Se incluye el coste de material fungible, inventariable y del personal.

Tipo de coste			Control-10s	Control-15s	OP-2ML4
<b>Fungible</b>	Dosis CPE	mg/kg peso	20	20	20
	Precio CPE	€/mg	0.29	0.29	0.29
	Nº semanas		10	15	10
	Nº hembras		10	10	10
	Peso	g/animal	750	750	750
	<b>Total</b>			<b>428.5</b>	<b>603</b>
<b>Inventariable</b>	Jeringas		12.5	18.75	0
	Bombas		0	0	797
	<b>Total</b>			<b>12.5</b>	<b>18.75</b>
<b>Personal</b>	Nº Técnicos		2	2	2
	Salario	€/hora	8.8	8.8	8.8
	Horas invertidas		27.5	41.3	5
	<b>Total</b>			<b>242</b>	<b>363</b>
<b>Coste Tratamiento</b>			<b>683</b>	<b>984.8</b>	<b>1421</b>
Nº hembras maduras			0	9	5
<b>Tasa éxito</b>			<b>0%</b>	<b>90%</b>	<b>50%</b>
<b>Coste/hembra madura</b>			<b>-</b>	<b>109.4</b>	<b>284.2</b>

Además, para hacer un análisis de la rentabilidad económica completo es necesario incluir los costes asociados a la ovulación. Para el cálculo de los costes de ovulación se ha tenido en cuenta el coste de las dosis hormonales de DHP y las horas invertidas por el personal. El coste de DHP para un animal con un peso medio de 750g ha sido de 44.8€ y el coste de personal para una puesta de una duración media de 5h ha sido de 44 €. En consecuencia, el coste total se incrementa considerablemente y se calcula que para obtener una puesta de anguila europea es necesario invertir alrededor de 200 euros entre el proceso de maduración y el proceso de ovulación.

## 5. Discusión

Actualmente, el método más utilizado para inducir la maduración gonadal en anguilas es la administración semanal de extractos de hipófisis de carpa (CPE) o salmón (SPE) (Okamura *et al.*, 2014). Se trata de tratamientos hormonales de larga duración que requieren la continua manipulación de los animales (anestesia, marcaje, inyecciones, etc.), lo que podría inducir efectos negativos en el proceso de maduración. Además, es importante considerar que la manipulación semanal de las hembras es mucho más costosa en tiempo que la de los machos, ya que estas presentan un peso mucho mayor (700-1000 g) resultando su manejo más complicado. Por ello, con el objetivo de minimizar la manipulación y abaratar costes de producción, en este trabajo se han utilizado bombas osmóticas como método alternativo para la inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea.

### 5.1 Inducción a la maduración con bombas osmóticas

El uso de bombas osmóticas como método de administración de tratamientos hormonales ha resultado eficaz para inducir la maduración sexual en distintas especies de peces. Por ejemplo, en el bagre (*Clarias batrachus*) se logró la maduración sexual en hembras gracias al uso de bomba osmóticas cargadas de hCG (Muruganankumar *et al.*, 2017). En el mero (*Epinephelus mera*), la combinación de la administración de GnRHa mediante una bomba osmótica y el control del fotoperiodo y la temperatura (25-27 °C y 14L: 10D) fue decisiva para desencadenar la maduración sexual fuera del período reproductivo, donde este tratamiento incrementó un 41% el IGS en comparación con el grupo control (Kanemaru *et al.*, 2012). Además, estudios en hembras de anguila japonesa (*Anguilla japonica*) demostraron que el tratamiento con SPE (extracto de hipófisis de salmón) a largo plazo mediante el uso de una bomba osmótica fue eficaz para inducir la vitelogénesis, obteniendo un incremento de IGS del 14 % y un 63.4% de hembras maduras (Kagawa *et al.*, 2013).

Durante el desarrollo de este estudio se ha obtenido por primera vez la maduración gonadal de hembras de anguila europea mediante el uso de sistemas de liberación controlada. No obstante, únicamente el 50% de estas hembras respondieron al tratamiento durante las primeras 10 semanas de tratamiento (vida útil de la bomba), mientras que la inyección continuada de CPE una vez finalizada su vida útil hizo madurar a un 30% más de hembras. El IGS medio obtenido para este grupo fue de 49.5±2.8%, confirmándose así, que el uso de bombas osmóticas cargadas con CPE se presenta como un método eficaz para inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea.

Los resultados logrados en el presente estudio han mejorado los obtenidos por Kagawa *et al.* (2013) desarrollado en hembras de anguila japonesa, tanto en porcentaje de maduración, donde obtuvimos un 80% de hembras maduras en comparación al 63.4 % de hembras maduras obtenidas por Kagawa; como en valores de IGS, alcanzamos un 49.5 % de IGS en comparación al 13 % de IGS de Kagawa. El objetivo del estudio de Kagawa fue el de demostrar que las bombas osmóticas eran eficaces como

método de administración hormonal para inducir la vitelogénesis en anguila japónica. A diferencia de estos estudio en la especie japonesa, este estudio ha querido avanzar aún más en la validación de sistemas de liberación controlada, no sólo demostrando que las bombas osmóticas son un método eficaz para inducir la maduración gonadal en hembras de anguila europea, sino que además se han llevado a cabo con éxito la fecundación de alguna de las hembras del grupo OP-2ML4.

#### Tiempo de maduración y ovulación

El tiempo de tratamiento hormonal necesario para alcanzar la maduración sexual y ovulación en las anguilas varía en función de la especie de anguila. Por ejemplo, *A. rostrata*, *A. dieffenbachii* y *A. australis* tienen tiempos de maduración similares que varían entre 5 y 13 semanas (6-12, 5-12 y 6-13 semanas, respectivamente) (Lokman *et al.*, 2010 y Oliveira *et al.*, 2010). Por otro lado, la anguila japonesa (*A. japonica*) presenta un rango de tiempo más amplio entre 10-23 semanas (Kim *et al.*, 2007; Ijiri *et al.*, 1998). La anguila europea (*A. anguilla*) es la especie que más semanas de tratamiento hormonal necesita para alcanzar la maduración sexual, entre 16-25 semanas utilizando SPE como tratamiento hormonal (Pedersen, 2003) y 12-25 semanas con un tratamiento hormonal de CPE (Palstra *et al.*, 2005).

Lo datos obtenidos en este estudio mostraron que el número de semanas de tratamiento hormonal (CPE) hasta alcanzar la madurez sexual en el grupo control (inyecciones intraperitoneales) fue de 13-17 semanas, dato que coincide con los resultados de estudios previos (Palstra *et al.*, 2005; Vilchez *et al.* 2013). En el grupo experimental implantado con bombas osmóticas (OP-2ML4), se observó una respuesta diferencial en las hembras. En este sentido, un grupo de hembras presentaron una maduración sexual extremadamente precoz, con un rango de maduración de 4-10 semanas. Este dato representa, hasta la fecha, la maduración sexual más precoz obtenida en esta especie, establecido previamente en 7.5-11.5 semanas mediante una doble dosis de SPE semanal (Pedersen, 2003). En su estudio, Pedersen logró que las hembras a las que se les administró una dosis semanal de SPE maduraran entre las semanas 16-25, mientras que a las que se les administró dos dosis semanales tuvieron un rango de maduración de 7.5-11.5 semanas. Por lo tanto, podría ser posible adelantar aún más la maduración si se carga las bombas osmóticas con una dosis más alta de CPE. Además, podría ser que el efecto positivo, en cuanto a reducir el número de semanas de tratamiento, que obtuvo Pedersen (2013) pueda ser debido a que al aplicar dosis menos espaciadas en el tiempo la hormona se distribuye de mejor forma y su efecto es más continuo. En este sentido, las bombas osmóticas liberan la hormona de forma paulatina, por lo que, los buenos resultados obtenidos en nuestro estudio (maduraciones entre 4-10 semanas), coincide con la idea de que la liberación continuada de hormona se distribuye de mejor forma y produce un mayor efecto. En resumen, sería oportuno realizar un estudio sobre la administración mediante bombas osmóticas de distintas dosis de CPE para evaluar su efecto en el número de semanas de tratamientos hasta alcanzar la maduración gonadal.

Por otra parte, un grupo de hembras implantadas con bombas osmóticas alcanzaron la maduración sexual de forma tardía, entre las semanas 20-23. Este resultado nos indica que las hembras de este grupo no respondieron a la bomba osmótica implantada, ya que alcanzaron la maduración sexual tras la dosis hormonal suministrada por la bomba osmótica más las inyecciones semanales de CPE que se aplicaron pasadas 10 semanas (tiempo de vida de la bomba osmótica).

Finalmente, es importante remarcar que un alto porcentaje de hembras sobrevivieron al proceso de puesta, y fueron mantenidas posteriormente en el laboratorio durante un período mínimo de 6-7 semanas. En este sentido, se considera que la anguila es una especie semélpara caracterizada por tener un único episodio reproductivo antes de morir. A la vista de las observaciones realizadas en este ámbito, sería interesante realizar una investigación sobre la posibilidad de mantener cautivas a esas hembras que han sobrevivido con el objetivo de recuperarlas y poder inducirles de nuevo la maduración sexual en el siguiente período de reproducción.

#### *Incremento de peso previo a la maduración y puesta*

Diversos estudios previos han demostrado que un incremento del 10% de peso (con respecto al inicio del tratamiento hormonal) es una señal para inducir la ovulación en hembras de anguila japonesa (Ohta *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2003). En cambio, estudios desarrollados en la anguila europea mostraron que presentan una respuesta mucho más variable en tiempo y velocidad de maduración en contraste con la anguila japonesa, e indican que usar el incremento de peso como señal para inducir la ovulación no es el método más adecuado (Pedersen, 2003; Palstra *et al.*, 2005). Los datos del presente estudio mostraron un incremento medio de peso previo a la maduración del  $28\pm 20\%$  en el grupo control y de  $16\pm 14\%$  en el grupo OP-2ML4. Sin embargo, en algunos casos este incremento de peso fue menor del 10%, incluso una de las hembras de la que obtuvimos una puesta presentó un incremento de peso negativo, es decir, su peso corporal final fue menor al inicial. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por Pedersen (2003) y Palstra *et al.* (2005), apoyando la idea de que el incremento del 10 % de peso con respecto al inicio del tratamiento no es la señal más adecuada para inducir la ovulación en hembras de anguila europea, ya que esta especie presenta una respuesta de maduración mucho más variable, tanto en tiempo como en velocidad. Además, consideramos que un criterio más fiable para la inducción de la ovulación debería basarse en el incremento de peso respecto a la semana previa y no frente al inicio del experimento ya que nuestros datos mostraron que este incremento es positivo en todas las hembras, con una media del  $20\pm 14\%$  en el grupo control y  $16\pm 6\%$  en el grupo OP-2ML4. Asimismo, sería recomendable realizar canulaciones periódicas y evaluar las etapas de desarrollo del ovocito en el ovario como método para predecir el estado óptimo de maduración e inducir la ovulación. De esta forma no perderíamos la posibilidad de inducir la ovulación a las hembras que no experimentan este incremento de peso.



### Ovulaciones y estado de desarrollo embrionario máximo alcanzado

Durante el presente estudio ovularon el 33% de las hembras maduras, superando los porcentajes alcanzados en otros estudios, 24 % (Pedersen, 2003) y 27 % (Palstra *et al.*, 2005). A pesar de los excelentes resultados obtenidos en relación con las ovulaciones, estos datos habrían sido mucho más elevados de no ser por la falta de DHP al inicio del experimento, que provocó el no inducir la ovulación de las 5 hembras que maduraron de forma precoz en el grupo de las bombas osmóticas. Además, la parte final del experimento se realizó durante el confinamiento impuesto por el Covid-19, lo que conllevó a una reducción del personal de laboratorio implicado en el seguimiento de la maduración de las hembras, perdiéndose así la oportunidad de inducir la ovulación de hembras maduras.

En los últimos años, la tecnología y los métodos de incubación para producir larvas de anguila europea han avanzado de manera considerable, permitiendo la producción de grandes lotes de huevos y larvas viables que alcanzan la primera etapa de alimentación (Tomkiewicz *et al.*, 2013; Mordenti *et al.*, 2013, 2014; Butts *et al.*, 2014). Sin embargo, obtener larvas es difícil para laboratorios convencionales puesto que las etapas tempranas del desarrollo embrionario son muy sensibles a los cambios en los parámetros biofísicos (temperatura, salinidad, densidad de población, turbulencias, etc.) (Politis *et al.*, 2014; Sørensen *et al.*, 2014). En este sentido, los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio por Vélchez *et al.* (2013) mostraron que el cambio de temperatura en las primeras 4 horas tras la fertilización disminuyó la tasa de eclosión. En el presente estudio, se obtuvieron un total de 6 puestas, cuyos huevos embriones fueron incubados alcanzando el estado de embrión formado con la cabeza, ojos y somitas distinguible como máximo desarrollo embrionario. Además, la descripción del desarrollo embrionario que se expone concuerda con la presentada por Sørensen *et al.*, (2016). Sin embargo, y aunque no era uno de los objetivos del proyecto, en este estudio no se obtuvo ninguna eclosión de las puestas, probablemente debido a la no disponibilidad de incubadores para realizar las mismas, ya que estos homogenizan las condiciones de cultivo de manera precisa para un correcto desarrollo embrionario. No obstante, todos los datos obtenidos sobre la ontogenia de la anguila europea proporcionan una información de referencia valiosa para el progreso en el desarrollo de la tecnología de cría de la especie. Aunque aún se necesitan conocimientos sobre el desarrollo embrionario de esta especie, especialmente de las etapas tempranas (desde huevo hasta la primera alimentación), y sobre los parámetros biofísicos óptimos para el buen desarrollo embrionario.

### **5.2. Análisis económico de los tratamientos hormonales**

Desde un punto de vista aplicado y práctico, los estudios económicos sobre tratamientos hormonales representan herramientas útiles que ponen en la balanza los resultados de la maduración y el coste económico de los mismos. Los análisis realizados en este estudio reflejan por primera vez el coste económico que supone madurar un lote de hembras de anguila europea.

Nuestros resultados muestran que el precio de los tratamientos hormonales para obtener hembras maduras es tremendamente elevado, siendo el coste de maduración (para un lote de 10 hembras) mediante inyecciones de CPE de 984.8 € para 15 semanas de tratamiento, y mediante el uso de bombas osmóticas de 1421 €. Además, ese coste se incrementa de manera considerable al incluir el proceso de ovulación, por lo que se ha estimado que madurar una hembra de anguila hasta la puesta puede suponer un coste total de aproximadamente 200 euros/hembra. Es importante destacar que, a pesar de que los grupos experimentales tratados con sistemas de liberación controlada (bombas osmóticas) minimizaron el coste de personal (44 €) respecto al grupo control (363 €), los elevados costes de las bombas osmóticas (OP-2ML4) no compensaron el abaratamiento inicial en los costes de personal.

Por otra parte, es también importante remarcar el coste diferencial que supone la maduración para cada uno de los sexos en esta especie. En este sentido, en el caso de los machos de anguila, el coste para inducir la maduración es mucho más económico, y la inversión necesaria para obtener machos maduros oscila entre 5-12 veces menos (19.5 €/macho con hCG recombinante y 7.5 €/macho con el hCG purificada) (Gallego *et al.*, 2012) que en las hembras. Este factor (inversión en hormona), junto con muchos otros como una manipulación más costosa, mayores tanques para su mantenimiento, más inversión en personal, etc. hacen que la experimentación en hembras de anguila suponga una inversión económica mucho más elevada, por tanto, sea abordada en menor medida por diferentes grupos de investigación.

## **6. Conclusiones**

Este estudio demuestra que el uso de bombas osmóticas cargadas con extracto de hipófisis de carpa (CPE) se presenta como un método eficaz para inducir la maduración sexual en hembras de anguila europea, generando maduraciones tempranas (4-10 semanas) en el 50% de hembras. No obstante, el análisis económico realizado demostró que las inyecciones semanales de CPE se presentaron como un método más rentable que el uso de bombas osmóticas, por lo que la búsqueda de sistemas económicamente viables que garanticen y mejoren los resultados obtenidos debe de ser una tarea obligatoria para garantizar la reproducción en cautividad de esta especie.

## Bibliografía

- Boetius *et al.* 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1, 1–28.
- Butts *et al.* 2014. Standardization of fertilization protocols for the European eel, *Anguilla anguilla*. *Aquaculture* 426–427, 9–13. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.020>
- FAO 2018. Food and Agriculture Organization. Departamento de pesca y acuicultura. Estadísticas. <http://www.fao.org>
- Fontaine *et al.* 1964. Sur la maturation des organes genitaux de l'Anguille femelle et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 259:2907-2910.
- Gallego *et al.* 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>
- Ijiri *et al.* 1998. Pretreatment Reproductive Stage and Oocyte Development Induced by Salmon Pituitary Homogenate in the Japanese Eel, *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 64, 531–537. <https://doi.org/10.2331/fishsci.64.531>
- ICES 2019. Working Group on Eels. Report of the ICES Advisory Committee on Fisheries Management 1:50. <https://doi.org/http://doi.org/10.17895/ices.pub.5545>
- Kagawa *et al.* 2013. Using osmotic pumps to deliver hormones to induce sexual maturation of female Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 388–391: 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.025>
- Kanemaru *et al.* 2012. Induction of sexual maturation of the female honeycomb grouper, *Epinephelus merra*, in the non-breeding season by modulating environmental factors with GnRH analogue implantation. *Aquaculture* 358–359, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.06.026>
- Kim *et al.* 2007. Development of the eggs and pre-leptocephalus larvae by natural spawning of artificially-matured Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Journal of Aquaculture* 20, 160–167. (en Coreano con resumen en Inglés).
- Lokman *et al.* 2010. Induced spawning and early ontogeny of New Zealand freshwater eels (*Anguilla dieffenbachii* and *Anguilla australis*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 34, 135–145. <https://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516921>
- Mordenti *et al.* 2013. Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): two populations compared. *Aquaculture International*. 21, 1045–1063.

- Mordenti *et al.* 2014. A closed recirculating aquaculture system for artificial seed production of the European eel (*Anguilla anguilla*): technology development for spontaneous spawning and eggs incubation. *Aquacultural Engineering* 58, 88–94.
- Muruganankumar *et al.* 2017. In vivo induction of human chorionic gonadotropin by osmotic pump advances sexual maturation during pre-spawning phase in adult catfish. *General and Comparative Endocrinology* 251, 74–84. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.09.015>
- Mylonas *et al.* 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 463–491.
- Ohta *et al.* 1996. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17, 20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139, 291–301. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01167-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01167-6)
- Ohta *et al.* 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology Biochemistry* 17: 163–169. <https://doi.org/10.1023/a:1007720600588>
- Okamura *et al.* 2014. Recent advances in artificial production of glass eels for conservation of anguillid eel populations. *Ecology of Freshwater Fish* 23, 95–110. <https://doi.org/10.1111/eff.12086>
- Oliveira *et al.* 2010. Artificial maturation, fertilization, and early development of the american eel (*Anguilla rostrata*). *Canadian Journal of Zoology* 88, 1121–1128. <https://doi.org/10.1139/Z10-081>
- Palstra *et al.* 2005. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249, 533–547. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.04.031>
- Pedersen, B.H. 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224, 323–338. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00242-4)
- Peñaranda *et al.* 2010. European eel sperm diluent for short-term storage. *Reproduction in Domestic Animals*. 45, 407–415. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01206.x>
- Pérez *et al.* 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. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2000.1411>
- Pérez *et al.* 2004. Producción de anguilas: pasado, presente y futuro. *Aquatic* 20: 51–78.
- Pérez *et al.* 2011. Influence of temperature regime on endocrine parameters and vitellogenesis during experimental maturation of European eel (*Anguilla anguilla*) females. *General and Comparative Endocrinology* 174, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.08.009>

- Politis *et al.* 2014. Light impacts embryonic and early larval development of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 461, 407–415.
- Politis *et al.* 2017. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS ONE* 12(8): e0182726. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182726>
- Sørensen *et al.* 2014. Microbial interference and potential control in culture of European eel (*Anguilla anguilla*) embryos and larvae. *Aquaculture* 426–427, 1–8.
- Sørensen *et al.* 2016. Ontogeny and growth of early life stages of captive-bred European eel. *Aquaculture* 456, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.01.015>
- Tanaka *et al.* 2003. The first production of glass eel in captivity: Fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 28, 493–497. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000030638.56031.ed>
- Tomkiewicz, *et al.* 2013. Reproduction of European eel and larval culture: state of the art. *Communications in Agriculture and Applied Biology Science* 78, 455–456.
- Van Ginneken *et al.* 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, L), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 367–398. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-0005-8>
- Vílchez *et al.* 2013. Effect of thermal regime on the quality of eggs and larval development of European eel. 4th International Workshop on Biology of Fish Gamete. Book of abstracts pp.: 228–229.
- Zohar *et al.* 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: From hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99–136. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00584-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00584-1)