



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de grado en Veterinaria

Aspectos reproductivos en delfines

Reproductive aspects in dolphins

Autor/es
Pauline Bordes

Director/es
Antonio del Niño Jesús García

Facultad de Veterinaria

2020-2021

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	8
4. METODOLOGÍA.....	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
5.1. Anatomía del aparato reproductor del macho y de la hembra delfín.....	9
5.1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra.....	10
5.1.1.1. Ovarios y oviductos.....	11
5.1.1.2. Útero y cérvix.....	13
5.1.1.3. Vagina.....	14
5.1.1.4. Vulva y genitales externos.....	15
5.1.1.5. Glándulas mamarias.....	15
5.1.2. Anatomía del aparato reproductor del macho.....	15
5.1.2.1. Testículos y epidídimos.....	16
5.1.2.2. Aparato copulador.....	18
5.1.2.3. Glándulas accesorias.....	18
5.2. Fisiología y parámetros reproductivos en delfines.....	18
5.2.1. El eje hipotálamo-hipofisario.....	19
5.2.2. Foliculogénesis y ovulación.....	19
5.2.3. El ciclo sexual de la hembra.....	20
5.2.4. Parámetros reproductivos.....	21
5.2.4.1. Estacionalidad del ciclo sexual y influencias del ambiente.....	21
5.2.4.2. Madurez sexual.....	22
5.2.4.3. Comportamientos reproductivos.....	22
5.2.5. Gestación, parto y lactación en delfines.....	23
5.2.5.1. Diagnóstico de gestación	23
5.2.5.2. Seguimiento de la gestación.....	23
5.2.5.2.1. Mediante mediciones de hormonas circulantes.....	25
5.2.5.2.2. Por método de ultrasonido.....	25
5.2.5.2.2.1. Materiales y métodos ecográficos.....	25
5.2.5.2.2.2. Procedimiento y lectura de imágenes.....	26

5.2.5.3. Parto.....	26
5.2.5.4. Neonatología en delfines.....	27
5.2.5.5. Manejo de la lactancia materna y características de la leche.....	29
5.2.5.5.1. Principios de la lactancia.....	29
5.2.5.5.2. Valores energéticos y composición de la leche.....	29
5.3. Biotecnologías reproductivas en delfines.....	30
5.3.1. Técnicas de control de los ciclos sexuales.....	30
5.3.1.1. Sincronización del estro.....	30
5.3.1.1.1. Uso de gonadotropinas.....	31
5.3.1.1.2. Uso de progestágenos.....	31
5.3.1.1.3. Uso de prostaglandinas.....	32
5.3.1.2. Detección de ovulación mediante hormonas sexuales.....	32
5.3.1.3. Detección de ovulación mediante ecografía.....	33
5.3.2. Tecnología seminal.....	33
5.3.2.1. Recolección de semen.....	34
5.3.2.2. Contrastación seminal o espermiograma.....	34
5.3.2.3. Sexado de gametos.....	36
5.3.2.4. Almacenamiento del semen.....	36
5.3.2.4.1. Semen refrigerado.....	36
5.3.2.4.2. Semen congelado.....	36
5.3.2.5. Inseminación artificial.....	37
5.3.2.5.1. Descongelación del semen criopreservado.....	37
5.3.2.5.2. Protocolo de inseminación.....	37
6. CONCLUSIONES.....	39
7. VALORACIÓN PERSONAL.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imágenes 1 y 2. Imágenes microscópicas de un ovario entero (1) y de la corteza (2) de un ovario de <i>T. truncatus</i>	12
Imagen 3. Imagen ecográfica de la sección transversal del ovario izquierdo en un delfín mular.....	12
Imagen 4. Tracto reproductivo disecado de un delfín mular hembra.....	13
Imágenes 5 y 6. Genitales externos de una hembra gestante (5) y clítoris (6) de una hembra adulta <i>T. truncatus</i>	15
Imágenes 7 y 8. Epidídimos (7) y testículos (7 y 8) de un delfín <i>T. truncatus</i>	16
Imagen 9. Pene y músculo retractor de <i>S. coeruleoalba</i>	18
Imagen 10. Feto de un delfín <i>T. truncatus</i> visto a través de la bolsa alantoidea.....	28

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Evaluación de la ciclicidad de una hembra delfín midiendo la concentración sérica de progesterona.....	21
Gráfica 2. Concentración de progesterona en la leche de un delfín mular durante la lactancia.....	21
Gráfica 3. Perfil endocrinológico (centrado en la ovulación) del ciclo sexual de la hembra delfín.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la ubicación de las aberturas genitales del delfín mular macho y hembra en vista ventral.....	9
Figura 2. Corte transversal del abdomen de un delfín.....	10
Figura 3. Esquema del sistema reproductor femenino de un delfín en vista lateral.....	11
Figura 4. Tracto genital de una hembra delfín mular.....	14
Figura 5. Comparación de imágenes ecográficas del abdomen caudal de tres delfines en diferentes etapas de madurez sexual e interpretaciones esquemáticas.....	17
Figura 6. Imágenes ecográficas e interpretaciones esquemáticas de fetos de delfines mulares.....	24
Figura 7. Vista dorsal del útero de un delfín mular durante la gestación.....	27
Figura 8. Esquema de la sincronización de la ovulación y planificación de la inseminación en delfines mulares con un progestágeno (Altrenogest).....	32
Figura 9. Secciones sagital y transversal de un espermatozoide de delfín mular a través del microscopio electrónico (x15.000)	35
Figura 10. Paso del cuello uterino y depósito del semen en el tracto genital femenino del delfín.....	38

1. RESUMEN

El presente trabajo, llamado "Aspectos reproductivos en delfines", aborda una descripción de la anatomía del aparato reproductor de la hembra y del macho delfín con el fin de poder comprender las especificidades relacionadas con la vida en un medio acuático y los desafíos para la reproducción asistida. La fisiología y la descripción de los parámetros reproductivos permiten analizar cómo funciona el sistema reproductivo del delfín y observar sus similitudes y diferencias con los mamíferos terrestres. Los parámetros reproductivos son importantes para llevar a cabo una gestación correcta e incluyen la estacionalidad del ciclo, las influencias del ambiente, la madurez sexual y los comportamientos reproductivos. Por otra parte, este trabajo se ha centrado en las características del desarrollo de la gestación, del parto y de la lactación en estos mamíferos, donde se debe de llevar a cabo un control del seguimiento y del diagnóstico de gestación, tanto con hormonas circulantes como ecográficamente. El manejo de la lactancia es importante ya que determinará el crecimiento de la futura cría. Los protocolos de reproducción asistida en delfines son similares a los utilizados en los mamíferos terrestres, con el uso de la monitorización ecográfica del ciclo ovárico y de protocolos de sincronización de estro. También se realiza la detección de la ovulación, tanto mediante hormonas sexuales como con ultrasonidos. La búsqueda bibliográfica ha podido demostrar que el método de elección actual para la reproducción asistida para los delfines es la inseminación artificial, constituida por la recolección de semen, la contrastación seminal, el almacenamiento del semen y el proceso de inseminación. Las biotecnologías en estos animales se usan con el fin de preservar la diversidad genética y el mantenimiento de las diferentes especies de delfines.

ABSTRACT

This work, called "Reproductive aspects in dolphins", addresses a description of the anatomy of the reproductive system of the female and male dolphin in order to understand the specificities related to life in an aquatic environment and the challenges for reproduction assisted. The physiology and description of the reproductive parameters allow us to analyze how the dolphin reproductive system works and observe its similarities and differences with terrestrial mammals. Reproductive parameters are important to carry out a correct gestation and include the seasonality of the cycle, environmental influences, sexual maturity and reproductive behaviors. On the other hand, this work has focused on the characteristics of the development of gestation, parturition and lactation in these mammals, where a control of the monitoring and pregnancy diagnosis must be carried out, both with circulating hormones and sonographically.

Lactation management is important as it will determine the growth of the future calf. Assisted reproduction protocols in dolphins are similar to those used in land mammals, with the use of ultrasound monitoring of the ovarian cycle and estrous synchronization protocols. Ovulation detection is also performed, both using sex hormones and ultrasound. The bibliographic search has been able to demonstrate that the current method of choice for assisted reproduction for dolphins is artificial insemination, consisting of semen collection, seminal testing, semen storage and the insemination process. Biotechnologies in these animals are used in order to preserve genetic diversity and the maintenance of different species of dolphins.

2. INTRODUCCIÓN

En su trabajo “Teoría de la Evolución”, Darwin describe la extinción de especies como un proceso natural (Darwin, 1859) pero, hoy en día, sin embargo, las tasas de extinción de las especies actuales son mil veces más altas que las naturales, y las futuras probablemente serán a medio plazo 10.000 veces más elevadas de lo normal (De Vos *et al.*, 2014). Esta aceleración del proceso de extinción es consecuencia de varios factores incluyendo el calentamiento global y la acidificación de los océanos. Este último afecta principalmente a los mamíferos marinos que suelen ser sensibles a cambios en la temperatura y en la composición del agua (St. Aubinand y Dierauf, 2001).

El estudio de la biología de los cetáceos ha despertado un gran interés en la comunidad científica y ofrece una oportunidad para aprender más acerca de los delfines y del camino de su evolución. Se trata de animales con un alto atractivo para la sociedad lo que puede ser útil a la hora de concienciar a la población sobre la situación de los océanos y de los mamíferos que habitan en ellos. Estos últimos años, gracias a la colaboración de los centros zoológicos, el conocimiento sobre la fisiología y la biología de los delfines ha podido conocer un gran avance (Dierauf y Gulland, 2001; Robeck *et al.*, 2005) y el ámbito de la reproducción es de interés fundamental.

La estricta forma de vida acuática de estos animales, incluida la reproducción, conduce a una gran dificultad para poder observar y entender su fisiología en la naturaleza y suele ser difícil acercarse a ellos sin alterar su comportamiento natural. Aunque no refleja con precisión la biología de estos cetáceos en su hábitat, la observación de delfines en cautiverio y su cría ha permitido entender muchos fenómenos fisiológicos y ha desempeñado un papel importante en los avances en el conocimiento de su anatomía y supone una alternativa para evitar su extinción y conservar a las especies en peligro. Sin embargo, el número de animales necesarios para poder garantizar la variabilidad genética es inmenso y debido a las limitaciones de espacio en los centros zoológicos, la conservación de gametos constituye una alternativa para conservar la diversidad genética y aumentar el número de especies conservadas con los programas de cría en cautividad.

Estos permiten también la posibilidad de realizar la reproducción asistida de delfines, mediante la utilización de espermatozoides, ovocitos y embriones, entre individuos separados a cientos de miles de kilómetros de distancia, sin interferir en su bienestar (Holt y Lloyd, 2009). El uso de tecnologías reproductivas supone una herramienta muy interesante, asegurando su conservación a largo plazo mediante la utilización selectiva de reproductores, evitando problemas de consanguinidad y garantizando la diversidad genética (Yuen *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La realización de este trabajo de fin de grado responde a la necesidad de aprender más acerca de la reproducción en los delfines, ya que es un ámbito en él que aún queda mucho por descubrir y que a la vez es curioso por los numerosos puntos en común y diferencias que tienen con el resto de mamíferos terrestres. Como objetivos específicos de este trabajo de fin de grado nos planteamos:

- a. Describir la anatomía básica del aparato reproductor de cada género y la fisiología en los delfines.
- b. Detallar los principales métodos y protocolos de reproducción asistida que más se emplean hoy en día para este tipo de especies.

Con ambos objetivos, se pretende alcanzar como objetivo general aumentar nuestro conocimiento acerca de estos animales, explicando los diferentes procesos presentes en la actualidad para llevar a cabo procedimientos de reproducción asistida que se usan para conseguir el nacimiento de la cría y también para poder conservar las especies de delfines en peligro de extinción.

4. METODOLOGÍA

La información aportada en este trabajo procede de la búsqueda en artículos científicos y libros especializados en cetáceos. Esto se ha realizado haciendo uso del buscador académico Google Scholar, y utilizando bases de datos de Science Direct, Pubmed y Scopus, así como la búsqueda de información en repositorios como IVIS (International Veterinary Information Service). Por otra parte, también a través de otro tipo de material bibliográfico procedente de páginas web especializadas en este tipo de mamíferos. Para realizar la búsqueda bibliográfica se utilizó el método “APA”, y se ha llevado a cabo utilizando una serie de palabras clave: *delfines, delfines nariz botella, reproducción de cetáceos, reproducción de delfines, dolphin, cetacean, reproduction, Todd R Robeck, FIV en delfines, conservación de delfines, reproductive biology, reproductive endocrinology, semen analysis, assisted reproductive technology, etc.* Por otro lado, se ha referenciado el conjunto de citas bibliográficas extraídas de las diversas fuentes consultadas mediante el estilo de citación “Harvard”. Este método de cita consiste en nombrar al autor (o a los autores) con la fecha de publicación y incluye las referencias bibliográficas en forma de listado ordenado alfabéticamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Anatomía del aparato reproductor del macho y de la hembra delfín

En los delfines, los machos suelen tener un tamaño similar al de las hembras y dado que los genitales se mantienen dentro del cuerpo, la superficie del agua dificulta la identificación inmediata del sexo de un individuo dado. Una forma de poder discriminar el sexo se hace observando la región ventral del cuerpo, incluida la hendidura genital y el ano. Las hembras tienen una línea continua casi directa entre la hendidura genital y la hendidura anal, mientras que la separación entre las dos hendiduras es más pronunciada en los machos. Además, las hembras adultas tienen dos surcos adicionales paralelos a cada lado de la hendidura genital, que corresponden a la abertura externa de los pezones. Estos últimos surcos están ausentes en los machos (Figura 1) (Cozzi *et al.*, 2017).

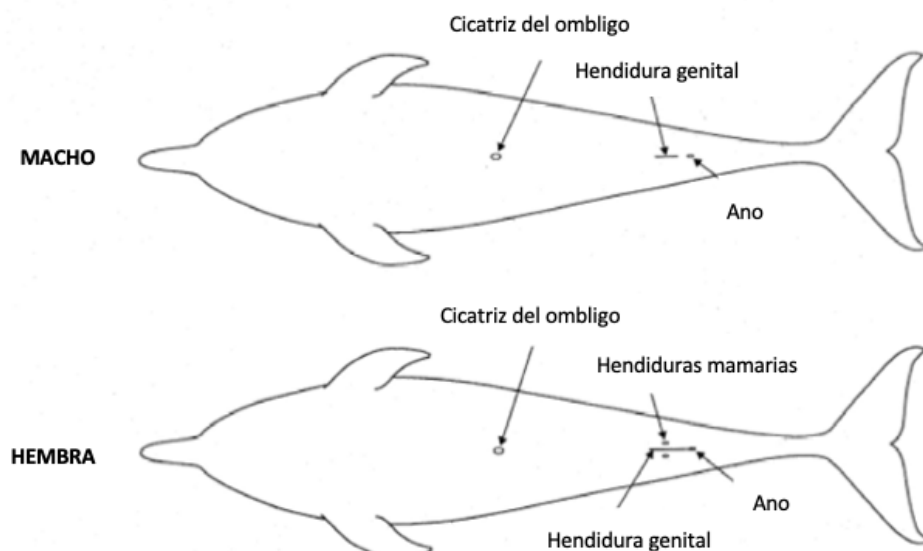


Figura 1. Comparación de la ubicación de las aberturas genitales del delfín mular macho y hembra en vista ventral (Modificado de Miller, 2007).

La anatomía del sistema reproductivo de los delfines es muy similar a la de sus homólogos terrestres más cercanos que son los rumiantes. Como ejemplo, el pene de estos mamíferos se mantiene mediante los músculos retractores del pene dentro de un largo pliegue prepucial a lo largo del borde ventral del abdomen y de la pelvis, excepto durante el apareamiento. Muchos aspectos de la anatomía femenina de los rumiantes también se parecen a los de los delfines, incluida la forma y estructura del útero y de los ovarios (Cozzi *et al.*, 2017).

En los mamíferos terrestres, el equilibrio térmico es posible gracias a la delicadeza de los músculos del abdomen y de la piel de la madre. Sin embargo, en los mamíferos marinos, el grosor de los músculos axiales del abdomen y la capa de grasa impiden que se produzca el intercambio de calor (Rimet, 2012). La red venosa periférica que irriga las aletas dorsal y caudal transporta la sangre fresca al interior del abdomen y permite la termorregulación a través del sistema vascular de intercambio de calor por corriente retrógrada (Contercurrent Heat Exchanger: CCHE). El plexo venoso lumbocaudal viaja en contra de la corriente del plexo arterial y permite el enfriamiento de la sangre destinada a los órganos reproductores. Durante un aumento de la temperatura corporal (natación vigorosa, etapa de gestación, etc.), el volumen sanguíneo dirigido a las aletas aumenta por vasodilatación periférica, intensificando así el flujo de sangre fresca transportada en contacto con los plexos arteriales útero-ovárico o testicular (Miller, 2007).

5.1.1. Anatomía del aparato reproductor de la hembra

La organización del tracto genital de la hembra es muy similar al de los mamíferos terrestres: la vagina se abre cranealmente al ano, en continuidad con el útero (Rimet, 2012). El orificio urogenital de la hembra se sitúa de manera más caudal que en el macho (Miller, 2007). El aparato reproductor femenino de los delfines consiste en un par de ovarios de forma ovalados y de unos oviductos conectados a un útero bicornio con un cuello uterino relativamente largo que se abre hacia la vagina. La abertura externa de la vulva aparece como una hendidura alargada en la que se oculta el clítoris. Las hembras tienen unos labios vulvares modificados y un pliegue de la hendidura genital apretado que permite evitar que el agua entre en la vulva y en el resto del sistema genital (Cozzi *et al.*, 2017). Para realizar un examen ecográfico del aparato reproductor de la hembra, la sonda se coloca a nivel de la hendidura genital, debe subirse craneal y lateralmente hasta alcanzar una depresión notable a nivel del ángulo formado por el músculo hipoaxial y el músculo recto del abdomen (Figura 2). También podemos encontrar los ovarios detrás del polo caudal de los riñones (Robeck *et al.*, 1998; Brook, 2001).

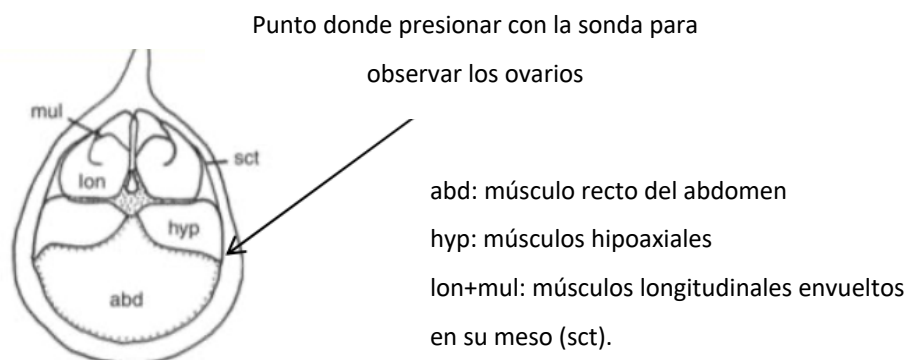


Figura 2. Corte transversal del abdomen de un delfín (Berta *et al.*, 2005).

La sonda se puede girar 90° para ver el eje longitudinal del ovario y a veces parte del ovario queda oculto por el músculo hipoaxial. Para poder localizar el útero, la sonda se debe de colocar en el plano longitudinal, dorsal a la hendidura genital y se tiene que mover dorsalmente hasta poder visualizar el cuello uterino justo dorsal a la vejiga urinaria. A continuación, el transductor se puede mover cranealmente, con barridos dorsoventrales cortos para poder examinar el cuerpo uterino y el cuerno ipsilateral (Brook, 2001).

5.1.1.1. Ovarios y oviductos

En los delfines, los ovarios suelen tener una forma ovoide, pero también pueden aparecer doblados o en forma de “U” y suelen tener un aspecto liso (Cozzi *et al.*, 2017). Están situados contra la pared abdominal y se encuentran de manera superficial en el delfín mular (Figura 3). La distancia que los separa de la hendidura genital varía de un individuo a otro (Robeck *et al.*, 2004).

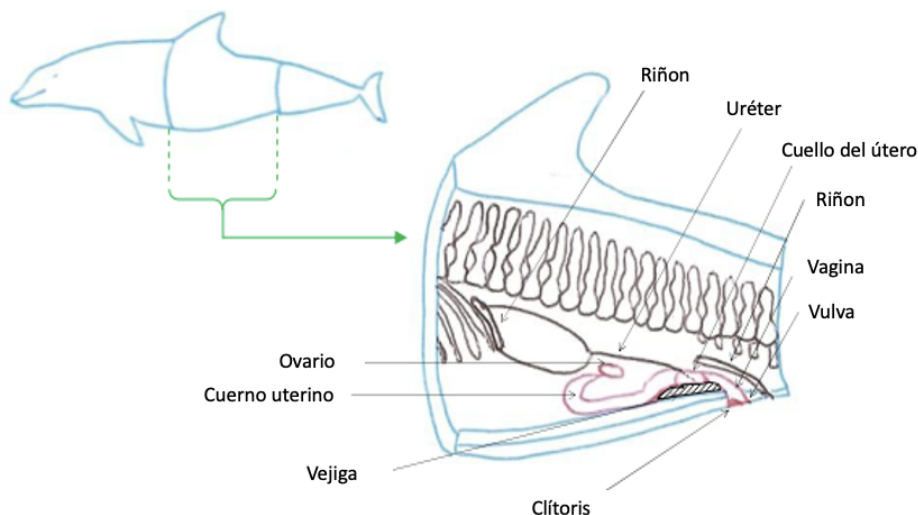
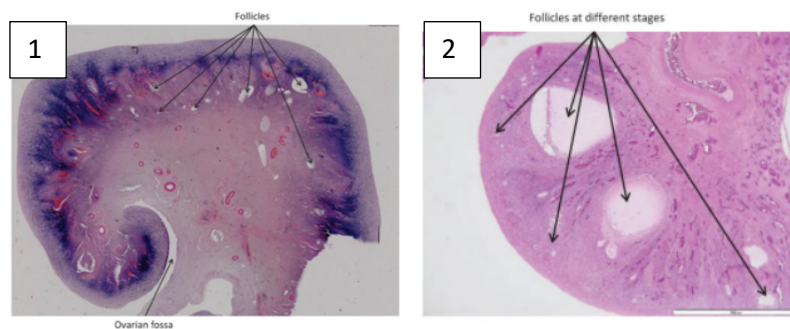


Figura 3. Esquema del sistema reproductor femenino de un delfín en vista lateral (Modificado de Rimet, 2012).

Los ovarios están envueltos por una expansión del mesosálpinx que constituye la bolsa ovárica, cerca de la ampolla de las trompas uterinas, y se mantienen en su lugar por los ligamentos específicos llamados mesovario y conectados a los ligamentos anchos del útero. El aspecto de los ovarios puede variar según la edad y con las gestaciones posteriores. En la mayoría de las especies, el ovario izquierdo es la gónada activa (o al menos el primero en activarse), aunque el ovario derecho también es completamente funcional, pero suele ovular más tarde o tener una función solamente en caso de fallo del izquierdo. La estructura anatómica de los ovarios de los delfines es muy similar a la de algunos mamíferos terrestres como por ejemplo la yegua ya que macroscópicamente es posible reconocer una fosa ovárica en el ovario activo (Cozzi *et al.*, 2017).

La corteza ovárica tiene aproximadamente 2 mm. de grosor y su estroma basófilo contiene células conectivas entrelazadas. El ovario fetal incluye varios ovocitos primarios y también muestra restos de “rete ovarii”. Los folículos a lo largo de sus diferentes etapas y tamaños, dependiendo de la especie, se ven fácilmente en la corteza (Imágenes 1 y 2). La médula del ovario contiene menos células y más vasos sanguíneos y fibras de colágeno. Los ovarios suelen ser esféricos en individuos sexualmente maduros, elipsoides en inmaduros y la densidad del tejido ovárico aumenta gradualmente durante la adquisición de la madurez sexual (Dierauf y Gulland 2001; Miller 2007).



Imágenes 1 y 2. Imágenes microscópicas de un ovario entero (1) y de la corteza (2) de un ovario de *T. truncatus* (Cozzi *et al.*, 2017).

Ecográficamente, la corteza ovárica es relativamente ecolúcida y está delimitada por un borde ecogénico que probablemente representa la túnica albugínea (Imagen 3). El uso de ultrasonidos puede proporcionar información sobre la madurez sexual del animal. El examen ecográfico suele ser más difícil en hembras viejas o gordas, o cuando los ovarios están inactivos debido a la lactancia o períodos prolongados de anestro. Las hembras mayores (más de 25 años) tienen una corteza ovárica más ecogénica que en hembras jóvenes y suelen tener un contorno del ovario más irregular (Brook, 2001).



ram: Músculo recto del abdomen
hlm: Músculo hipoaxial
mo: Mesovario

Las flechas delimitan el ovario, redondo, hipocogénico y situado entre el músculo recto del abdomen (ram) y el músculo hipoaxial (hlm).

Imagen 3. Imagen ecográfica de la sección transversal del ovario izquierdo en un delfín mular (Brook, 2001).

Los folículos de las hembras sexualmente maduras suelen ser redondos y muestran una cavidad anecoica similar a la de otros mamíferos. El cuerpo lúteo puede ser hipoecoico (raramente), isoecoico o hiperecoico al parénquima ovárico. Un cuerpo amarillo hipoecoico debe distinguirse de un folículo por su tamaño, que es más grande, y sus contornos, más irregulares. Los ovarios suelen estar un poco más largos durante los períodos de actividad ovárica y disminuyen de tamaño durante los períodos prolongados de anestro. También pueden variar de longitud en función de la del cuerpo del delfín. (Brook, 2001).

5.1.1.2. Útero y cérvix

El útero de los delfines es bicornes, asimilándose al de los mamíferos ungulados terrestres y tiene una parte semicilíndrica que representa el cuerpo del útero. Se divide rostralmente en los dos cuernos uterinos que continúan con las trompas uterinas (Imagen 4) (Cozzi *et al.*, 2017).

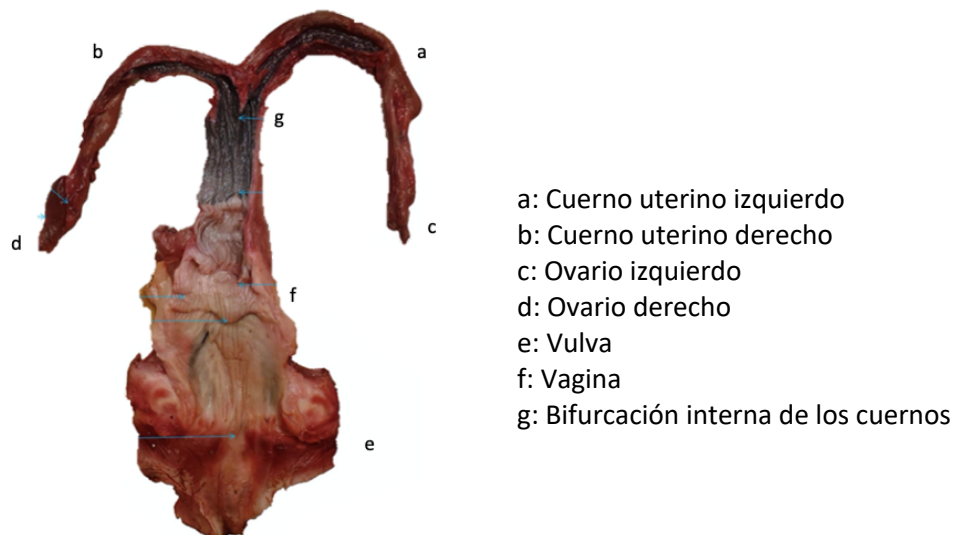


Imagen 4. Tracto reproductivo disecado de un delfín mular hembra (Modificado de Orbach, 2016)

Estos últimos están fijados en la cavidad abdominal en una posición dorsolateral por el ligamento ancho (Rimet, 2012) y el lado ventral del cuerpo del útero se fija a la pared de la vejiga. La conformación del útero del delfín indica una derivación filogenética de un útero doble y un remanente de esta estructura primitiva dividida se puede encontrar como un tabique que corre a lo largo del eje del cuerpo del órgano y divide parcialmente la cavidad uterina en dos. Las trompas uterinas flexibles u oviductos, rara vez descritas en los cetáceos, son mucho más pequeñas en calibre que los cuernos uterinos (Cozzi *et al.*, 2017). El cuello del útero (o cérvix) mide en promedio 5 cm. en los delfines mulares, es tónico y se cierra fuera de los períodos de celo (Miller 2007). Este se abre hacia la vagina con una forma muy similar a la del cuello uterino humano o equino. Las paredes del cérvix son muy gruesas con haces de músculos y su lumen interno está muy reducido.

El cuello uterino tiene varios pliegues internos y, a menudo, está lleno de moco cuya fluidez va variando durante el ciclo estral. Las posibles funciones de los pliegues y haces musculares del cérvix del delfín incluyen la acomodación activa del pene, el transporte del líquido seminal y el sellado poscoital inmediato de la entrada uterina (Cozzi *et al.*, 2017). La implantación del óvulo fecundado y el desarrollo de la placenta tienen lugar en el endometrio de los cuernos uterinos, más a menudo al nivel del cuerno ipsilateral en el momento de la ovulación (Dierauf y Gulland, 2001). Ecográficamente, el útero puede estar enmascarado por las asas intestinales, el miometrio es delgado y difícil de visualizar y el endometrio no se percibe. El cuello uterino se puede visualizar, en ángulo dorsal, detrás y generalmente a un lado de la vejiga urinaria. A veces, hay suficiente moco en el canal cervical para delinear la arquitectura interna y visualizar el pseudocérvix y el receso espermotecal. El útero no se suele visualizar en su totalidad, debido al intestino circundante y el miometrio es delgado y no está bien delimitado. El útero normal es blando, maleable y presenta una masa de tejido blando amorfa en la ecografía (Brook, 2001).

5.1.1.3. Vagina

La pared de la mucosa vaginal de la hembra es gruesa, está revestida de pliegues circulares y longitudinales y la vagina del delfín mular mide en promedio 11,7 cm. de longitud (Figura 4).

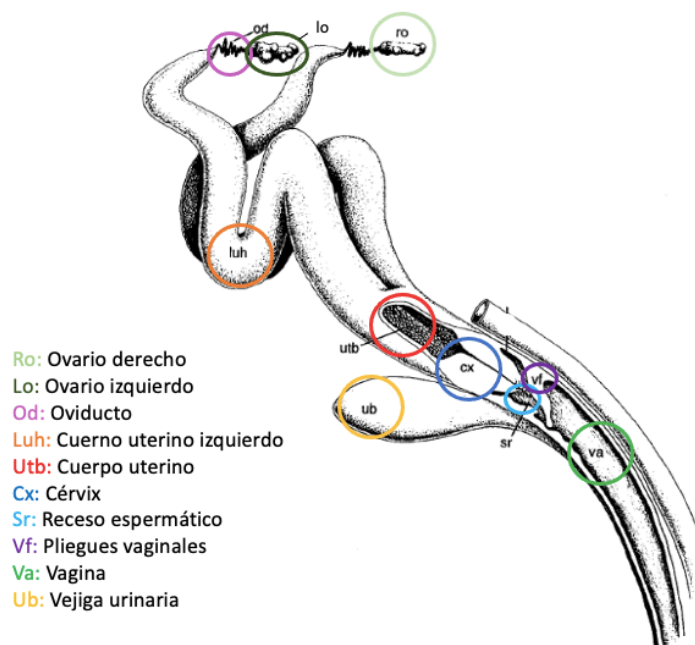


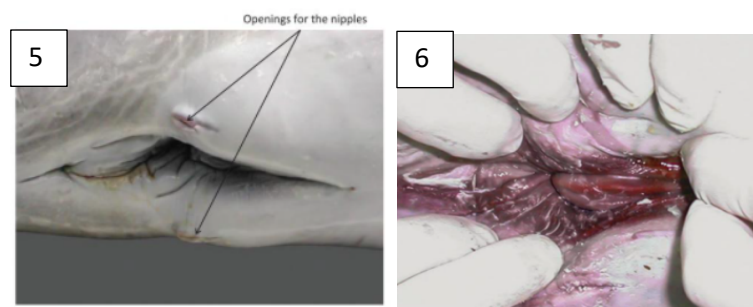
Figura 4. Tracto genital de una hembra delfín mular (Modificado de Robeck *et al.*, 1994)

En muchas especies, termina cranealmente en 6 a 12 pliegues de la mucosa vaginal, de los cuales los 2 principales se denominan pseudocérvix.

Estos pliegues permiten la retención de espermatozoides y promueven el reflujo seminal (Robeck *et al.*, 1994). También pueden retener el semen en el receso espermático y evitar la entrada masiva de agua durante el coito (Rimet, 2012) ya que se ha visto que el contacto con el agua del mar altera fuertemente la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Andersen, 1969).

5.1.1.4. Vulva y genitales externos

La vulva está en posición ventrocaudal y delimita la hendidura urogenital. En la parte craneal de esta misma hendidura encontramos el clítoris, bien desarrollado (Imágenes 5 y 6) (Miller, 2007).



Imágenes 5 y 6. Genitales externos de una hembra gestante (5) y clítoris (6) de una hembra adulta *T. truncatus* (Cozzi *et al.*, 2017)

5.1.1.5. Glándulas mamarias

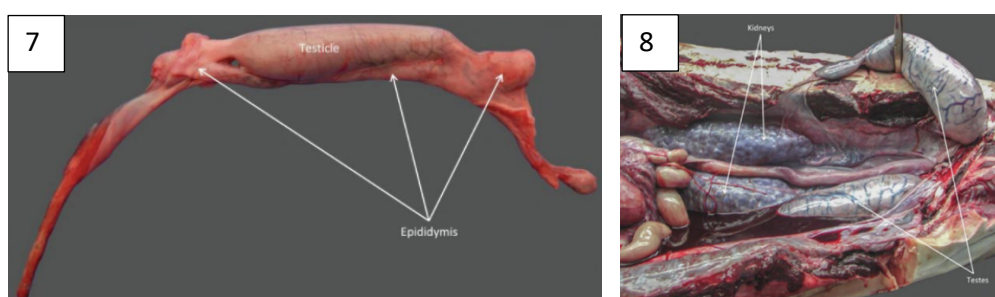
Las glándulas mamarias de los cetáceos son de tipo túbulo-alveolar. Al colocar a la hembra en decúbito prono, estas últimas se observan a ambos lados de la hendidura urogenital. El tamaño y el grosor de las glándulas mamarias aumentan durante la lactancia y las ubres pueden aparecer por las hendiduras mamarias (Miller, 2007).

5.1.2. Anatomía del aparato reproductor del macho

La organización del sistema reproductor masculino del delfín mular es similar a la de otras especies acuáticas y terrestres. La principal diferencia que podemos observar en estos animales es la posición de los testículos que es intraabdominal (Rimet, 2012). Otra particularidad es que los testículos de delfines carecen de escroto por una adaptación morfológica a la natación (cuerpo fusiforme, hidrodinamismo) (Dierauf y Gulland, 2001).

5.1.2.1. Testículos y epidídimos

Los testículos son de forma ovoide y en los delfines adultos, representan del 0,5 al 1% del peso corporal del animal (Imágenes 7 y 8). Están ubicados en el abdomen caudal y descansan sobre los músculos locomotores axiales del abdomen (Rimet, 2012). El peso máximo de un testículo de delfín mular se ha estimado en 983 gramos (Perrin y Reilly, 1984). Durante el desarrollo, los testículos de delfines pasan por estadios similares a los de los mamíferos terrestres con testículos en el escroto, ya que se ha descrito un “gubernaculum testis” fetal en varias especies. Esta evidencia sugiere que un mecanismo vestigial para el descenso testicular todavía está presente durante la vida fetal de los delfines (Cozzi *et al.*, 2017).



Imágenes 7 y 8. Epidídimos (7) y testículos (7 y 8) de un delfín *T. truncatus* (Cozzi *et al.*, 2017).

La envoltura testicular se adhiere a la cara lateral del testículo y permite su fijación dorsolateral en la pared abdominal. El epidídimo se expande a lo largo de la cara dorsolateral del testículo y la cola del epidídimo da lugar al conducto deferente que se une en la parte distal de la uretra. La ausencia de ampolla del conducto deferente dentro del tracto genital masculino de los delfines mulares hace que la capacidad de almacenamiento del epidídimo y del canal deferente sea mayor para mantener la cantidad de volumen de semen necesario para la reproducción en esas especies (Yuen *et al.* 2009). Los islotes intertubulares contienen las células intersticiales (o de Leydig), responsables de la producción de testosterona. Estas células son más delgadas que las de los mamíferos terrestres y no contienen pigmentos. Son menos llamativas que en otros animales y su presencia es algo difícil de detectar (Cozzi *et al.*, 2017). En *T. truncatus aduncus*, se ha determinado que el diámetro del epidídimo varía de 2-3 mm. a 3-5 mm. El diámetro de los túbulos suele disminuir considerablemente (hasta 2 mm.) después de la eyaculación (Brook *et al.*, 2000). En los mamíferos terrestres (testículos extra-abdominales), los intercambios de calor entre el plexo venoso pampiniforme y la arteria testicular permiten el enfriamiento de los tejidos reproductivos y su funcionalidad (Dierauf y Gulland, 2001). Sin embargo, en los mamíferos marinos (testículos intra-abdominales), no existe un plexo pampiniforme sino una red venosa y arterial adaptada: el CCHE (Miller 2007).

La temperatura es un factor importante para la maduración de los espermatozoides y una temperatura de 37°C puede ser fatal para una adecuada maduración y provocar infertilidad o patologías. Como los testículos de los delfines están dentro de la cavidad peritoneal, la reducción de su temperatura es fundamental (Cozzi *et al.*, 2017) ya que los tejidos reproductores están expuestos a la temperatura corporal del animal, que suele ser en promedio de 38°C en los cetáceos. A estas temperaturas, se inhibe la espermatogénesis y se destruyen los espermatozoides almacenados en el epidídimo. Por esa razón, la termorregulación de los órganos reproductores es importante y está permitida por el CCHE. Se trata de una transferencia de calor entre las arterias testiculares (sangre a temperatura corporal central) y el plexo venoso lumbocaudal (sangre fresca proveniente de la irrigación superficial de las aletas dorsal y caudal). Al reducir la temperatura corporal en relación con los testículos, el CCHE contribuye a la espermatogénesis (Rimet, 2012). Ecográficamente, los testículos están en una posición caudoventral a los riñones, entre la línea media y el lado ventral del músculo hipoaxial. La sonda se coloca al nivel de la hendidura genital, perpendicular al flanco y debe moverse craneal y dorsalmente. Los testículos son de forma ovalada, delimitados por una cápsula hiperecoica en el parénquima testicular (Brook *et al.*, 2000).

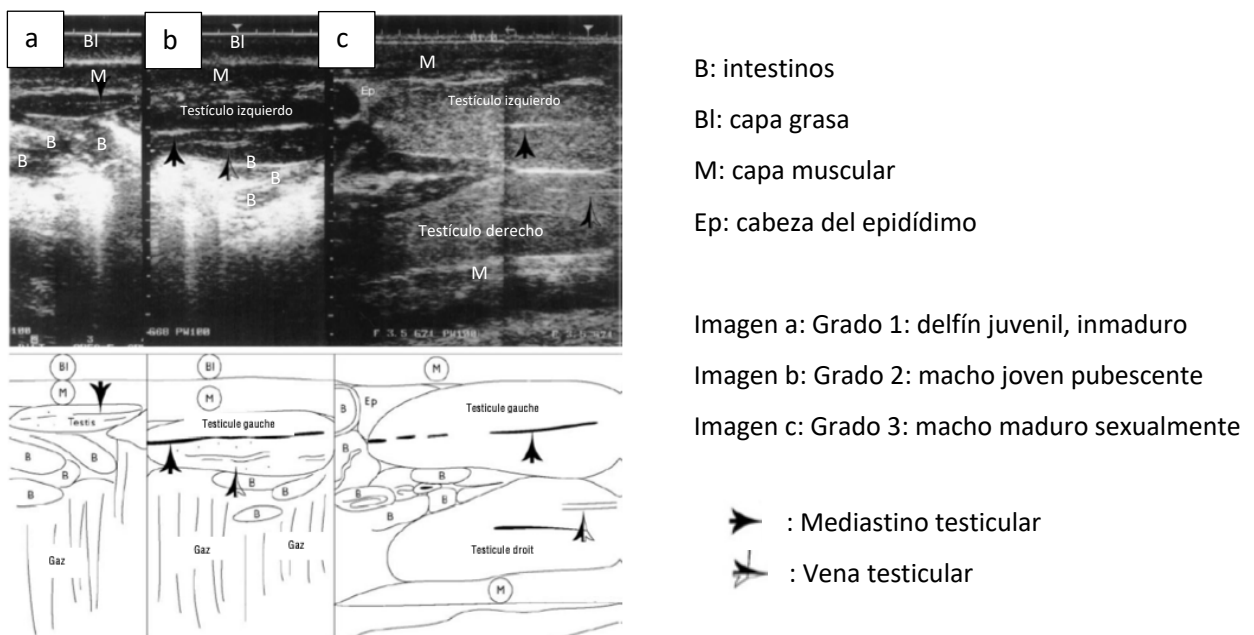


Figura 5. Comparación de imágenes ecográficas del abdomen caudal de tres delfines en diferentes etapas de madurez sexual e interpretaciones esquemáticas (Modificado de Brook *et al.*, 2000).

Ecográficamente, podemos distinguir tres morfotipos testiculares en función del grado de madurez sexual del delfín (Figura 5). La ecogenicidad de los testículos aumenta con la edad del animal y con el diámetro de los túbulos seminíferos (Brook *et al.*, 2000).

5.1.2.2. Aparato copulador

Los delfines poseen un pene de tipo fibroelástico, similar al de los rumiantes (Cozzi *et al.*, 2017) y con una flexura sigmoidea (Imagen 9) (Rimet, 2012).

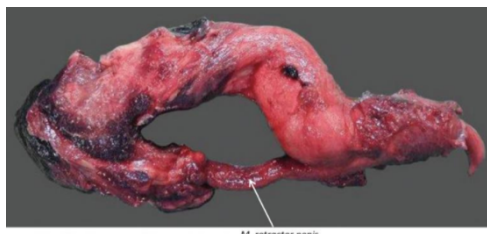


Imagen 9. Pene y músculo retractor de *S. coeruleoalba* (Cozzi *et al.*, 2017).

El órgano copulador muestra una forma de S en reposo debido a los músculos retractores emparejados y logra la erección por la entrada de sangre en los cuerpos cavernosos, la relajación de los músculos retractores y la consiguiente distensión del ángulo sigmoide. Durante la erección, dos tercios de la longitud total del pene se exteriorizan desde la hendidura genital y la curvatura del pene ya no es observable (Dierauf y Gulland, 2001). En los delfines no hay existencia de un glándula definido y no hay presencia de hueso peneano (Miller, 2007). La parte más adelantada del pene (ápice) tiene forma de cono y contiene la abertura uretral externa. Una de las principales ventajas del pene fibroelástico en S es el ocultamiento total del órgano en reposo, una característica muy útil para la hidrodinámica (Cozzi *et al.*, 2017).

5.1.2.3. Glándulas accesorias

La gran mayoría de los delfines no tienen vesículas seminales ni ampollas del conducto deferente. La próstata es la única glándula accesoria descrita y se encuentra en el base del pene, entre los restos de los huesos pélvicos (Rimet, 2012). La próstata está rodeada por un músculo fuerte que comprime el órgano durante la eyaculación (Yuen *et al.* 2009).

5.2. Fisiología y parámetros reproductivos en delfines

El entorno acuático de los delfines dificulta el estudio de la biología y fisiología de estos animales, especialmente en el medio natural. Los primeros datos relativos a la reproducción de los cetáceos se obtuvieron mediante examen directo de gónadas extraídas de animales varados. Posteriormente, se ha descrito la endocrinología a partir de animales cautivos (Robeck *et al.*, 1994). La reproducción está controlada por el funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisario y de las gónadas.

El fotoperiodo, así como ciertos estímulos presentes en el ambiente, pueden influir en el funcionamiento del eje y en la actividad reproductiva del animal. Este fenómeno se debe a la síntesis de hormonas por el hipotálamo que actúan sobre la hipófisis a través del sistema portal hipotalámico-hipofisario. Las hormonas involucradas en el funcionamiento del aparato reproductor son similares en todas las especies de mamíferos, marinos y terrestres (Dierauf y Gulland, 2001).

5.2.1. El eje hipotálamo-hipofisario

El hipotálamo produce una hormona de gran importancia para la regulación endocrina de la función reproductiva llamada hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La fijación de la GnRH a los receptores de la hipófisis anterior permite controlar la síntesis de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH). La secreción de GnRH no es continua y está habilitada por un generador hipotalámico pulsátil ubicado en el hipotálamo mediobasal. En función de las concentraciones de GnRH, los receptores de la hipófisis anterior inducen la formación de LH antes de disminuir en número y sensibilidad, imposibilitando la producción de hormonas hipofisarias (base para el uso de agonistas de GnRH como agente de anticoncepción) (Rimet 2012).

5.2.2. Foliculogénesis y ovulación

Durante la fase folicular temprana, la producción de FSH aumenta gradualmente. Este aumento en la FSH circulante resulta en el crecimiento y reclutamiento folicular, con un aumento en el número de receptores de LH dentro de los folículos. Las células de la teca y de la granulosa de los folículos son responsables de la producción de estrógenos. A medida que uno de los folículos se acerca a la etapa preovulatoria, la concentración de estrógenos se vuelve máxima, lo que ejerce un control de retroalimentación positiva sobre el hipotálamo con un aumento en la amplitud y frecuencia de secreción de la propia GnRH que origina una oleada de LH. El aumento del número de receptores asegura una respuesta adecuada al pico de LH y permite la ovulación. La hembra entra en fase folicular cuando la concentración urinaria de estrógenos excede 0.93 ng/mg. Cr (nanogramo por miligramo de creatinina) durante al menos dos días consecutivos (Robeck *et al.*, 2005). El crecimiento de los folículos se acompaña de un aumento gradual en la tasa de estrógenos séricos del día 5 al día 7 del ciclo, al origen del pico de LH y de la ovulación. Poco después de la ovulación, las células del folículo dominante se organizan en el cuerpo lúteo que producirá progesterona para ejercer una retroalimentación negativa sobre el hipotálamo al inhibir la producción de GnRH y, por tanto, la secreción de LH y FSH. Si el ciclo no es fértil, el útero produce y libera descargas de prostaglandinas PGF2 α que originaran la lisis del cuerpo lúteo y la reanudación de un nuevo ciclo.

La fase luteal señala la evolución del folículo ovulatorio hacia el cuerpo lúteo (Rimet, 2012). Esta fase comienza cuando la concentración de progesterona excede, durante al menos dos días consecutivos, los siguientes umbrales:

- En sangre: concentración superior a 1,00 ng/mL.,
- En orina: concentración superior a 0,56 ng/mg. Cr durante dos días consecutivos,
- En heces: concentración superior a 10 pmol/g.

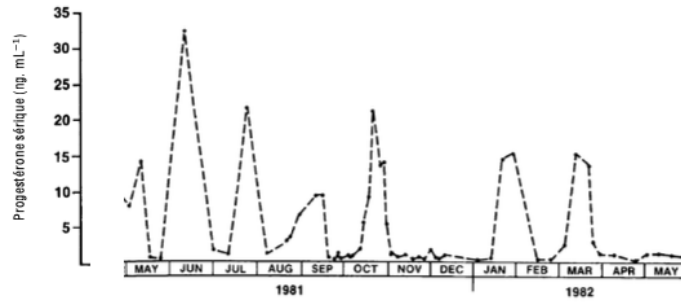
En una hembra no gestante, la concentración de progesterona sérica varía de 1 a 50 ng/mL. de sangre a lo largo de la fase luteal. Las concentraciones de FSH, LH y estrógenos son mínimos durante este período (Robeck *et al.*, 1998).

5.2.3. El ciclo sexual de la hembra

El ciclo sexual se centra en el estro que corresponde al período de aceptación del macho por la hembra y se refleja en la sucesión de varias etapas en el ovario: la fase folicular, la ovulación y la fase luteal. La duración del ciclo estral se estima por la duración separando dos picos de LH o de estrógenos consecutivos. El ciclo de celo del delfín dura en promedio 27 días (21 a 42 días) y las fases folicular y luteal duran aproximadamente 2 semanas cada una (Leatherwood *et al.*, 1990). En cautiverio, la fase folicular es cercana a los 8 días y la fase luteal a los 19 días (Robeck *et al.*, 2005).

Los delfines son animales poliéstricos estacionales, con ovulaciones espontáneas que suelen ser únicas por cada ciclo estral, lo que lleva a gestaciones únicas (Rimet, 2012). El cuerpo lúteo permite la secreción de progesterona con el fin de mantener la gestación si ocurre la fertilización, o retrocede lentamente en ausencia de gestación y deja un tipo de cicatriz blanca-grisácea ("cuerpo albicans"). En estudios post-mortem, los ciclos sexuales y la edad de un delfín se pueden determinar contando las cicatrices permanentes de los cuerpos amarillos presentes en los ovarios. Sin embargo, estas no pueden certificar que el óvulo haya sido debidamente expulsado o fértil ya que la presencia de cuerpos lúteos accesorios también puede confundir el recuento (Perrin y Reilly, 1984).

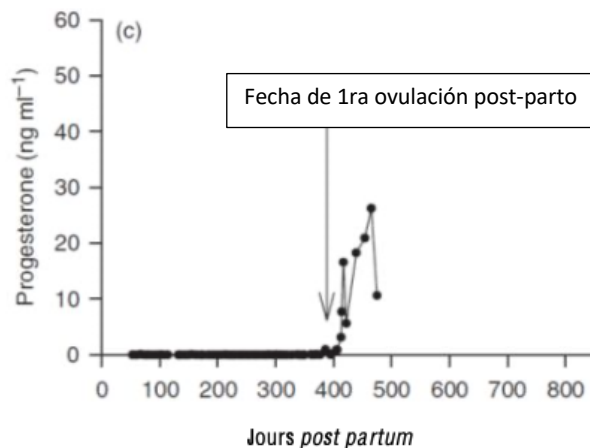
La ciclicidad se altera debido a la lactancia y al amamantamiento, pero, sin embargo, cuando la succión disminuye, los ovarios actúan nuevamente (West *et al.*, 2000). El anestro estacional tiene una duración variable, mientras que el anestro de la lactancia post-parto puede ser largo ya que la lactancia es prolongada en el tiempo. En consecuencia, el intervalo interestro puede, a veces, superar el año. La medición semanal de estrógenos o progesterona en sangre, orina o leche permite confirmar la ciclicidad de una hembra durante una temporada de cría y poner en evidencia la alternancia de período de estro y anestro (Gráfica 1) (Cozzi *et al.*, 2017).



Gráfica 1. Evaluación de la ciclicidad de una hembra delfín midiendo la concentración sérica de progesterona. (Leatherwood *et al.*, 1990).

En la gráfica 1, observamos la sucesión de siete ciclos regulares durante un período de 13 meses y se puede ver un episodio de anestro en los meses de noviembre y diciembre de 1981.

En una hembra lactante, un valor de progesterona superior a 8 ng/mL de leche indica el final del periodo de anestro post-gestacional y la reanudación de la ciclicidad (Gráfica 2) (Leatherwood *et al.*, 1990).



Gráfica 2. Concentración de progesterona en la leche de un delfín mular durante la lactancia (West *et al.*, 2007).

5.2.4. Parámetros reproductivos

5.2.4.1. Estacionalidad del ciclo sexual y influencias del ambiente

La mayoría de los delfines tienen una actividad sexual estacional, lo que refleja la adaptación al clima, al fotoperiodo y a los recursos alimentarios (Dierauf y Gulland, 2001). La estacionalidad es necesaria especialmente en las especies migratorias para garantizar que los recién nacidos enfrenten las mejores condiciones ambientales al nacer. En el hemisferio norte, la mayoría de los ciclos estrales ocurren durante dos períodos: desde la primavera hasta los principios del verano y hasta el otoño.

En cautiverio, la mayoría de las hembras son poliéstricas permanentes (Perrin *et al.*, 2008). La actividad testicular también se encuentra sometida a variaciones estacionales: por ejemplo, existen concentraciones máximas en testosterona durante los meses de abril, mayo y junio (54,4 ng/mL.) (Schroeder y Keller, 1989) y la producción máxima de espermatozoides ($1,587 \times 10^6$ espermatozoides por mililitro) suele ocurrir en septiembre y octubre. Este retraso podría representar el tiempo necesario para la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides en delfines (Cozzi *et al.*, 2017). La epífisis (o glándula pineal) puede influir en la función reproductiva al traducir un mensaje de luz (fotoperíodo) en un mensaje químico. El ganglio cervical superior es un tejido nervioso que, en respuesta a cambios en el fotoperíodo, produce melatonina. Un aumento de la melatonina circulante inhibe la función reproductiva en los delfines, al interrumpir la producción pulsátil de LH. La síntesis de melatonina es nocturna y su producción puede inhibirse mediante la exposición artificial a la luz (Rimet, 2012).

5.2.4.2. Madurez sexual

Se dice que una hembra es sexualmente madura después de su primera ovulación, pero, sin embargo, la madurez sexual en los machos es más difícil de definir y se suele basar en criterios histológicos. Un macho es sexualmente maduro si la espermatogénesis tiene lugar en sus testículos, si el lumen de los túbulos seminíferos sufre un cambio rápido de diámetro y si los espermatozoides están presentes en el epidídimo. También se puede evaluar midiendo el tamaño del delfín, igual que para estimar su edad y su peso y en general, el animal debe haber alcanzado del 80 al 95% de su tamaño adulto para adquirirla. En las hembras, el gasto energético vinculado al crecimiento del individuo es incompatible con el desarrollo de un feto hasta que la hembra haya alcanzado el 90% de su tamaño adulto (Miller 2007). La madurez sexual del delfín mular se da entre los 5 y 13 años en las hembras, cuando alcanzan la longitud de 220 cm. y los machos suelen alcanzar la madurez más tarde, entre los 9 y los 14 años, con una altura promedio de 260 cm. En individuos cautivos, la madurez sexual se puede objetivar midiendo esteroides sexuales sanguíneos. En las hembras, suele ocurrir cuando la concentración de la progesterona en suero excede el umbral de 1 ng/mL. (Rimet, 2012) y en el macho se adquiere cuando el nivel de testosterona sérica alcanza por primera vez el valor de 10 ng/mL. (Robeck *et al.*, 1994).

5.2.4.3. Comportamientos reproductivos

En los delfines mulares se puede observar la cópula entre un macho y una hembra, en estro, anestro o durante la gestación. La misma hembra puede aparearse con varios machos sucesivos durante el cortejo. En medio natural, el acto de la cópula tiene lugar después de un largo cortejo amoroso y el comportamiento reproductivo se expresa principalmente en las primeras horas de la mañana.

El macho persigue obsesivamente a la hembra en todos sus movimientos, rueda contra ella, y frota sus aletas contra su abdomen. Si la hembra acepta los avances, los dos delfines juntan sus dos abdómenes. Durante el coito, parece que la hembra emite vocalizaciones y expulsa una gran cantidad de aire a través de su respiradero. Esta actividad puede repetirse varias veces y durante muchas horas (Andersen, 1969). En los delfines cautivos, el cortejo suele ser más corto, el comportamiento sexual se expresa con menos claridad y a veces usan sus penes como órgano sensorial por lo que su extrusión no siempre se asimila al comportamiento reproductivo (Robeck *et al.*, 2005).

5.2.5. Gestación, parto y lactación en delfines

5.2.5.1. Diagnóstico de gestación

Tras la inseminación, se debe de establecer el diagnóstico de gestación y la evaluación de la viabilidad del feto. Saber estimar la fecha del parto y detectar sus signos constituyen herramientas para preparar en la mejor medida el nacimiento de la cría. Múltiples cambios fisiológicos ocurren durante una gestación con el fin de sostener tanto al feto como para sustentar las necesidades básicas de la madre (Barratclough *et al.*, 2020). La duración de la gestación se determina en función de la tasa de crecimiento del feto, de su tamaño y de su peso al nacimiento (Perrin y Reilly, 1984) y suele durar 12 meses. En el medio natural, las hembras reproductoras pueden encontrarse gestantes desde el primer o segundo estro (Andersen, 1969). El intervalo entre dos partos es de 3 a 6 años en medio natural y suele ser de 2 años en medio cautiverio. Las hembras mayores y las más jóvenes tienen el intervalo entre partos el más largo. A veces, las hembras pueden estar gestantes y en período de lactancia simultáneamente, lo que genera una gran demanda energética, pero, sin embargo, son sucesos fisiológicos inusuales debido al estímulo de la succión que inhibe la ovulación mediante la supresión de GnRH. En la mayoría de las gestaciones de delfines, el feto se encuentra en el cuerno izquierdo y el derecho contiene solo la cola y parte del alantoides. En las hembras, los órganos reproductores están aislados por una gran cantidad de grasa. Durante la gestación, el metabolismo del tejido fetal puede ser más del doble que el del tejido materno. El exceso de calor producido debe eliminarse constantemente para poder mantener una temperatura fetal estable ya que la regulación térmica es fundamental para el correcto desarrollo del feto (Rimet 2012).

5.2.5.2. Seguimiento de la gestación

El seguimiento de la hembra durante la gestación debe ser riguroso para poder asegurar que el curso de la gestación esté correcto y es fundamental para la supervivencia del recién nacido. Los análisis de sangre periódicos (hemogramas, parámetros bioquímicos, etc.) permiten determinar el estado de salud de la futura madre (Asper *et al.*, 1988).

Varios de los cambios hematológicos y bioquímicos difirieren de los cambios presentes en otros mamíferos terrestres, lo que podría estar relacionado con la expansión del volumen plasmático menor de lo esperado observado en la preñez del delfín. Contrariamente a otros mamíferos donde la hemodilución es el hallazgo predominante debido a la expansión del volumen plasmático, en delfines, se ha visto presencia de hemoconcentración en el tercer trimestre, probablemente debido a un aumento en el hematocrito, proteína total y recuento de glóbulos rojos (Barratclough *et al.*, 2020). Durante las diferentes etapas de la gestación, se realizan varias ecografías midiendo la sección torácica, el diámetro del cráneo y la longitud del rostro del feto (Figura 6).

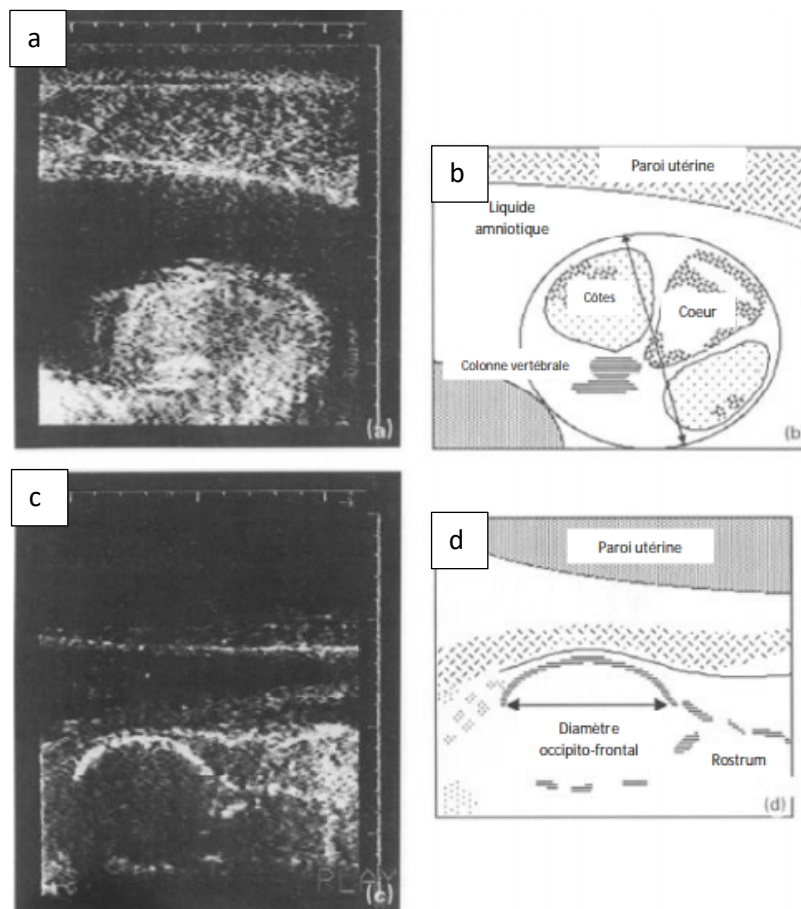


Figura 6. Imágenes ecográficas e interpretaciones esquemáticas de fetos de delfines mulares (Williamson *et al.*, 1990)

En las imágenes (a) y (b) (Figura 6) observamos la medida del diámetro torácico, a nivel del segundo o tercer espacio intercostal de un feto de 17 semanas antes del parto. En las imágenes (c) y (d) (Figura 6), la medición del diámetro del cráneo se realiza a lo largo del eje occipito-frontal del feto, 26 semanas antes de nacer. Usando las medidas ecográficas tomadas, se pueden dibujar curvas de crecimiento y calcular la tasa de crecimiento del feto.

Además, al igual que en medicina humana, las medidas del diámetro torácico y del eje occipito-frontal del feto pueden permitir predecir por regresión lineal la fecha del parto (se deben obtener al menos 4 mediciones durante la gestación) (Williamson *et al.*, 1990).

5.2.5.2.1. Mediante mediciones de hormonas circulantes

En los delfines mulares, el diagnóstico de gestación se puede confirmar con concentraciones de progesterona sérica superior a 5 ng/mL. a partir de 28 días después de la inseminación artificial (I.A.) (Robeck *et al.* 2013). Durante la gestación, los niveles de progesterona son de 25 ng/mL. con variaciones de 10 a 50 ng/mL. Si la concentración de progesterona sérica permanece por debajo de 1 ng/mL. durante dos semanas después de la I.A., significará que el diagnóstico de gestación es negativo. Este proceso también se puede realizar en hembras lactantes, mediante medición de progesterona en el suero de la leche y el diagnóstico de gestación se establece para una concentración de progesterona superior a 8 ng/mL. durante más de un ciclo sexual. Después del parto, una concentración inferior a 1ng/mL. de leche es un signo de anestro fisiológico y el aumento de la concentración de progesterona en la leche es un signo de reanudación de la ciclicidad y de la ovulación (West *et al.*, 2007). Un alto nivel de progesterona en la sangre o la leche (más de 8 ng/mL. durante varios meses) seguido de una caída repentina (menos de 1 ng/mL.) puede indicar la presencia de una reabsorción fetal o de un quiste lúteo (también llamado cuerpo lúteo persistente o "pseudogestación") (West *et al.*, 2000). La concentración media de progesterona vuelve a un valor menor a 1ng/mL. doce horas después del parto (Leatherwood *et al.*, 1990) y unos niveles bajos de progesterona son incompatibles con el curso de una gestación. Como las mediciones de la progesterona circulante no permiten juzgar la viabilidad del feto, se usan los ultrasonidos como herramienta de elección ya que además, resultan menos invasivos que la toma de muestras para la determinación hormonal (Rimet, 2012).

5.2.5.2.2. Por método de ultrasonido

La ecografía de diagnóstico en tiempo real proporciona un medio para obtener imágenes de la morfología de los órganos reproductores en hembra vivas y proporciona un medio valioso para evaluar sus estados reproductivos. La ecografía permite valorar la morfología ovárica, la fisiología de la ovulación y el manejo de la gestación en muchas especies (Brook, 2001).

5.2.5.2.2.1. Materiales y métodos ecográficos

En delfines, las ecografías suelen realizarse utilizando un transductor lineal de 3,5 Megahercio (MHz) o curvilíneo de 5 MHz.

Debido a la naturaleza de la piel del delfín, no se suele usar gel ecográfico durante el proceso. Como no existe una capa de aire entre la superficie y el transductor, se origina una disminución de la impedancia y una atenuación de la señal acústica. En general, se suele enseñar a todos los delfines hembras a cooperar para el examen, lo que permite realizar fácilmente exámenes de rutina. Inicialmente, se les enseña a acercarse a la orilla y a girar a ambos lados para presentar el flanco y se debe de sostener la cola para permitir la estabilización del animal en el agua (Brook, 2001).

5.2.5.2.2. Procedimiento y lectura de imágenes

El diagnóstico de gestación se puede hacer mediante ecografías semanales o cada 2 semanas después de la I.A. y se confirmará por la presencia de una vesícula embrionaria y por la aparición de un feto viable (Robeck *et al.* 2013). Al principio de la gestación, la sonda se coloca entre la hendidura genital y el ombligo. Más tarde, durante la gestación, la sonda se coloca a lo largo del flanco, de 10 a 20 cm. lateralmente a la línea blanca. En las primeras etapas de la gestación (a partir de la semana 14), aparece un cuerpo lúteo de tipo hipoecoico con contornos bien definidos y aumentando de tamaño, con fluidos fetales que se reconocen fácilmente. En delfines mulares, el diagnóstico más temprano de gestación suele ser entorno a la semana 17 de gestación, donde los latidos del corazón se observan fácilmente y demuestran la viabilidad del feto (Williamson *et al.*, 1990).

5.2.5.3. Parto

En la naturaleza, los nacimientos tienen lugar de abril a julio y las hembras tienen su primer delfín a los 8 años en promedio (West, 2000). En cautiverio, los nacimientos suceden durante todo el año y las hembras tienen su primera cría entre los 7 a 10 años. Los individuos del grupo social juegan un papel importante durante el parto, con el rol de asistente y ayudan en el cuidado de los jóvenes durante los primeros momentos de vida (Dierauf y Gulland, 2001). Los partos distócicos son frecuentes y provocan a menudo la muerte del recién nacido. En general, este problema suele ocurrir con madres jóvenes fértiles pero cuyo crecimiento no está completo (Robeck *et al.*, 1994). Dos semanas antes del parto, la observación cuidadosa del abdomen de la hembra permite resaltar los movimientos del feto.

Las glándulas mamarias se desarrollan y pueden aparecer excreciones de leche. Durante los 10 días previos al parto, la hembra se posiciona frecuentemente en la superficie del agua y realiza breves movimientos con la aleta caudal. Una semana antes del parto, la consistencia de la leche excretada aumenta y la vulva se hincha y durante las horas previas al parto, la hembra huye del contacto humano, baja su consumo de pescado (Eastcott y Dickinson, 1987), realiza poderosos movimientos de ventroflexión y su frecuencia respiratoria aumenta a 9 movimientos respiratorios cada 5 minutos (contra 3 a 7 en un estado fisiológico normal) (Asper *et al.*, 1988).

La placentación se desarrolla en el cuerno izquierdo y el cordón umbilical se envuelve alrededor de la cola del feto (Figura 7). Las dos venas y arterias umbilicales son de gran diámetro (Miller, 2007) y el cordón umbilical es corto (aproximadamente el 40% de la longitud del recién nacido) en comparación con la longitud del cordón umbilical del resto de mamíferos terrestres (en humanos, puede llegar a representar del 60 al 200% de la longitud del recién nacido) (Durand *et al.*, 1996).



Figura 7. Vista dorsal del útero de un delfín mular durante la gestación (Rimet, 2012)

En el 98,1% de los nacimientos en delfines, el parto tiene lugar principalmente en presentación caudal. El parto suele durar en promedio de 1 a 4 horas después de la exteriorización de la aleta caudal o de la cabeza fetal desde la vulva de la madre. Como los delfines no tienen pelvis (huesos vestigiales), puede haber una distocia durante el paso del feto, a nivel del cuerpo uterino y de la vulva. Si el parto resulta demasiado laborioso, otra hembra puede tomar la aleta caudal del feto en su boca y retirarlo de la hendidura vaginal. Si la hembra está aislada durante el parto, los cuidadores pueden ayudar a la expulsión del feto en caso de dificultad. Una vez salido el feto, se expulsa una gran cantidad de líquido amniótico y de sangre (Durand y col., 1996) y la placenta se suele expulsar de 4 a 7 horas después del parto (Eastcott y Dickinson, 1987).

5.2.5.4. Neonatología en delfines

Los delfines suelen tener una placenta de tipo epiteliocorial difusa (Barratclough *et al.*, 2020), al igual que muchos mamíferos, pero, sin embargo, carecen de cotiledones. Este tipo de placenta permite la transferencia de la inmunidad al feto principalmente con el calostro y suele asociarse con un período de gestación prolongado y el nacimiento de una descendencia bien desarrollada y casi independiente. La placenta del delfín es un órgano endocrino (como en primates y en équidos), y la producción de gonadotropina coriónica es mayor que en el hombre. Un gran saco alantoideo no vascularizado envuelve la cavidad amniótica (Imagen 10). El epitelio del alantoide suele ser de naturaleza plana o escamosa, y el epitelio del amnios puede contener células pigmentadas queratinizadas.

Tanto el alantoides como el amnios están contenidos dentro del saco coriónico. Las gestaciones gemelares suelen ser excepcionales en los cetáceos. Esto puede explicarse por la naturaleza difusa de la placenta epiteliocorial ya que, en este tipo de gestaciones, las dos placentas están fusionadas al menos en algunas partes y, por lo tanto, las vellosidades coriales no pueden desarrollarse en toda la superficie de la placenta (Cozzi *et al.*, 2017).



Imagen 10. Feto de un delfín *T. truncatus* visto a través de la bolsa alantoidea (Cozzi *et al.*, 2017)

A diferencia de los mamíferos terrestres, en los delfines, el recién nacido suele ser grande. Poco después del nacimiento, la cría puede nadar, debe poder huir de posibles depredadores y debe aprender a distinguir la interfaz entre el agua y el aire para poder respirar correctamente (Andersen, 1969). Al nacer, el delfín joven mide de 130 a 150 cm. aproximadamente. El macho siempre es un poco más largo que la hembra. Las crías alcanzarán su tamaño adulto al final del período de lactancia, a la edad de un año y medio a 2 años y pesan al nacer del 10 al 15% del peso de su madre. Se deben realizar análisis hematológicos y bioquímicos para conocer el estado de salud del recién nacido (Dierauf y Gulland, 2001).

Las necesidades de las crías en cautiverio aún no se conocen suficientemente. Parece ser que las instalaciones desempeñan un papel en la supervivencia de la cría y las estructuras deben de ser lo suficientemente grande para permitir nadar tanto a la madre como al recién nacido, y su aislamiento del resto del grupo en el caso de que sea necesario. También, la calidad del agua y de los alimentos distribuidos a la madre forman unos parámetros determinantes de la salud de las crías (Asper *et al.*, 1988).

Durante los primeros días de vida, el recién nacido adopta un nado rápido y entrecortado y suele nadar a nivel de la aleta dorsal de su madre. La presencia de otros animales representa un estrés para la madre y su cría si comparten el mismo entorno y ambos nadan más rápido que otros individuos y evitan el contacto social durante las tres semanas que siguen el parto (Eastcott y Dickinson, 1987).

5.2.5.5. Manejo de la lactancia materna y características de la leche

5.2.5.5.1. Principios de la lactancia

Al igual que en los mamíferos terrestres, la lactancia es una etapa muy importante en el ciclo de la reproducción del delfín y se puede utilizar como un refuerzo social entre la cría y su madre. Cuando un parto se desarrolla de forma correcta, la cría tendrá una primera alimentación dentro de una hora después de su nacimiento (Eastcott y Dickinson, 1987). Las crías suelen mamar de 5 a 10 veces por hora durante la primera semana de vida y después, de 2 a 4 veces por hora. Para estimular la expulsión de la leche, las crías pueden dar golpes ligeros en la zona del pecho con la cabeza, antes y durante el amamantamiento (Leatherwood *et al.*, 1990).

La riqueza de la leche materna permite un rápido crecimiento de las crías y una adaptación a nadar en agua fría. Su composición y su valor energético se adaptan a las necesidades metabólicas de las crías y a la duración de la lactancia (Perrin *et al.*, 2008). La lactancia dura en promedio de 2 a 3 años en medio natural y de 12 a 18 meses en cautiverio y algunas hembras salvajes amamantan a sus crías durante casi 9 años. El destete ocurre de una manera lenta y gradual y en medio natural, el animal debe adquirir las técnicas de caza de su grupo y la ingesta de alimentos sólidos comienza alrededor de los 6 meses de edad. En cautiverio, los peces muertos se distribuyen a los delfines a partir de las 10 semanas (Dierauf y Gulland, 2001).

5.2.5.5.2. Valores energéticos y composición de la leche

La ingesta de calostro es de suma importancia y muy poca o ninguna inmunoglobulina atraviesa la barrera placentaria. El calostro contiene casi 18% de proteínas, principalmente inmunoglobulinas (IgG) y 20% de lípidos. Las crías que no han recibido ingesta de calostro pueden recibir, por vía parenteral, 1 mg/kg. de IgG, extraído del suero de su madre. La duración de la permeabilidad de la mucosa digestiva a las IgG maternas siendo desconocida, es mejor realizar este procedimiento lo antes posible, sobre todo si el recién nacido no ha tenido acceso al calostro de su madre (Dierauf y Gulland, 2001). A mitad de la lactancia, aproximadamente un año después del parto, el valor energético de la leche es de 1,76 kcal/g. aproximadamente. La leche de delfines es más rica en lípidos, proteínas y hierro que la leche de los mamíferos terrestres, pero, sin embargo, es baja en carbohidratos (Rimet, 2012). Como ocurre con la mayoría de los mamíferos terrestres, los primeros chorros de una ubre llena (antes de la succión de la cría) darán menos leche rica en grasa (hasta un 33% menos de grasa) que la leche residual (después de la lactancia de las crías) (West *et al.*, 2007).

5.3. Biotecnologías reproductivas en delfines

Las tecnologías de reproducción asistida son un componente fundamental de las herramientas de manejo para asegurar la sostenibilidad a largo plazo de las poblaciones de delfines (Robeck *et al.*, 2013) y de su gestión e incluyen la criopreservación de semen, I.A. y la preselección del sexo mediante la clasificación de espermatozoides (O'Brien y Robeck, 2010). La procreación medicamente asistida (P.M.A.) reúne principalmente dos técnicas: la I.A. que consiste en depositar semen en el útero de la hembra, y la fertilización *in vitro* que corresponde a la fertilización entre un espermatozoide y un óvulo, en el laboratorio, después de la colección de gametos. La I.A. incluye, en el macho, la recolección de semen y su posterior conservación y, en las hembras, la sincronización del estro y la detección de ovulación antes de que el semen se deposite en el tracto genital (Dierauf y Gulland, 2001). Sin embargo, la fecundación *in vitro* no se suele usar en delfines (Rimet, 2012).

5.3.1. Técnicas de control de los ciclos sexuales

Las técnicas actuales permiten la determinación de gonadotropinas, estrógenos, esteroides y sus metabolitos y se pueden medir en sangre, en orina, en leche, en heces o en saliva. La formación médica posibilita la intervención veterinaria sin restricción física o química para realizar diagnósticos, profilaxis o abordajes terapéuticos (Asper *et al.*, 1988) y permite actuar de forma segura, reduciendo el tiempo, el coste y los riesgos asociados con un protocolo anestésico. También, minimiza considerablemente el estrés del animal durante la toma de muestras lo que es de gran importancia en animales preñados o gestantes (Rimet, 2012). Los metabolitos de la progesterona son los esteroides más importantes en delfines y permiten proporcionar información sobre la madurez sexual y establecer un diagnóstico de gestación (Miller, 2007).

5.3.1.1. Sincronización del estro

En delfines, la inseminación no se puede planificar simplemente observando el celo. El edema de la vulva, el aumento de las secreciones vaginales y los cambios en el comportamiento femenino son signos de celo presentes. Sin embargo, pueden ser inconsistentes ya que a veces estas características no se expresan en cautiverio y su observación puede verse dificultada por la vida en medio acuático. Por lo tanto, la evaluación del estado sexual de las hembras implica la medición de las hormonas circulantes. Antes de planificar la I.A., se debe asegurar que la hembra esté teniendo ciclos regulares y la detección de la ovulación se realiza midiendo las concentraciones de LH y estrógenos diariamente. Las muestras de rutina son principalmente de sangre u orina, porque no son invasivas (Rimet, 2012).

Puede haber variaciones en la estacionalidad y en el número de ciclos durante el año según las hembras y pueden estar en anestro o en pseudogestación. Debido a estas variaciones individuales, es difícil determinar con antelación la aparición del ciclo y poder predecir la I.A. Para eso, los programas de sincronización del estro permiten evitar problemas en cuanto al inicio de la ovulación (Leatherwood *et al.*, 1990).

5.3.1.1.1. Uso de gonadotropinas

En delfines, se permite el reclutamiento folicular por inyección de gonadotropina de suero de yegua gestante (PMSG). La ovulación puede ser inducida por la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) (Rimet, 2012). Ecográficamente, se puede observar el reclutamiento de muchos folículos así como un aumento gradual de su tamaño a partir de la segunda inyección de PMSG. El número importante de folículos en cada ovario dificulta la predeterminación de la fecha de ovulación. La I.A. tiene lugar de 8 a 24 horas después de la inyección de hCG (Leatherwood *et al.*, 1990).

5.3.1.1.2. Uso de progestágenos

El Altrenogest (Régumate®) es un análogo de la progesterona cuya administración repetida imita la presencia de un cuerpo lúteo e inhibe la liberación pulsátil de GnRH y su dosis en delfines suele ser de 0.044 mg/kg. por vía oral durante 27 a 77 días. Esta molécula también se utiliza como anticonceptivo y el ciclo se suele reanudar una vez que se acaba la terapia con progestágenos. En los cetáceos, las prostaglandinas no se utilizan para la lisis del cuerpo lúteo persistente. Se puede realizar un seguimiento mediante ecografía el día de la interrupción del tratamiento, 10 días después y todos los días hasta la ovulación (Robeck *et al.*, 2013). Después de suspender el tratamiento, debemos de observar (Figura 8):

- Del 7 al 17 día: inicio de la fase folicular,
- El día 19 en promedio: el pico de LH,
- El día 21 en promedio: la ovulación.

El estro ocurre en promedio 17,6 días después de suspender el tratamiento (Rimet, 2012). La I.A. tiene lugar diariamente de 12 a 48 horas después del pico de LH y finaliza cuando el inicio de la ovulación se objetiva por el método de ultrasonido (Robeck *et al.*, 2004). En los mamíferos domésticos, el período de tiempo entre el final del tratamiento y la ovulación corresponde en promedio a la duración de la fase folicular. Sin embargo, en los delfines, esta duración suele triplicarse (21 días en lugar de 8). El modo de reclutamiento folicular o la presencia de anestro al final del tratamiento con progestágenos podría explicar el retraso adicional observado.

El éxito del proceso es mayor durante la temporada de reproducción natural del delfín, en primavera y en otoño. Durante otros períodos del año, las hembras pueden expresar solo una parte de la respuesta al tratamiento (leve aumento de la concentración de estrógenos urinarios sin desarrollo folicular, expresión de celo sin ovulación, etc.) (Robeck *et al.*, 2005).

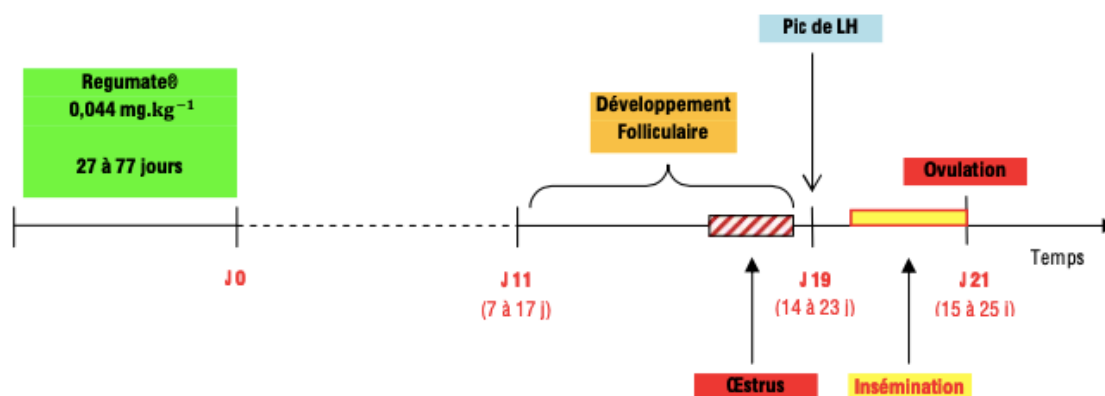


Figura 8. Esquema de la sincronización de la ovulación y planificación de la inseminación en delfines mulares con un progestágeno (Altrenogest) (Rimet, 2012)

5.3.1.1.3. Uso de prostaglandinas

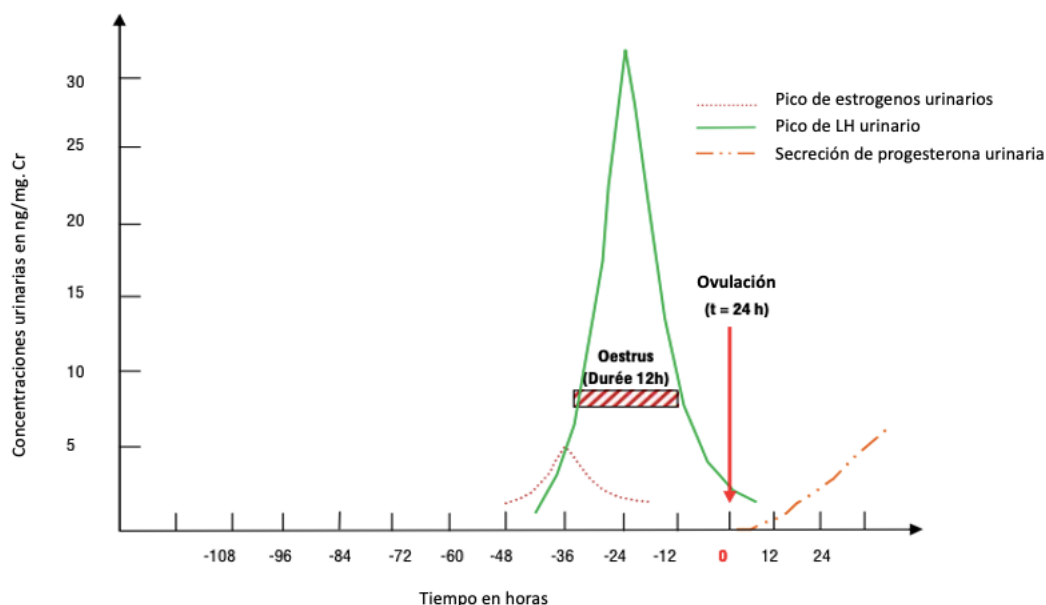
Los protocolos descritos anteriormente no implican la administración de prostaglandinas (PGF2 α) en la sincronización de los celos. Sin embargo, el cuerpo lúteo residual del delfín es sensible a la acción de la PGF2 α . Por lo tanto, las hembras no gestantes con un nivel de progesterona circulante superior a 3ng/mL. pueden someterse a este tratamiento. Los efectos secundarios suelen ser mínimos y de corta duración, sin embargo, las prostaglandinas se utilizan muy poco en la práctica (Dierauf y Gulland, 2001).

5.3.1.2. Detección de ovulación mediante hormonas sexuales

Al final de la fase folicular, las concentraciones de estrógeno son más altas, y se puede observar:

- Una concentración sérica superior a 120 pg/mL.,
- Una concentración media en orina de 5,4 ng/mg. Cr,

Este aumento de estrógenos es seguido, 8 horas después, de un pico de LH cuya concentración urinaria es extremadamente variable de un individuo a otro (70,9 +/- 115,7 ng/mg. Cr). La ovulación ocurre en promedio 24 horas después del pico de LH. El comportamiento relativo al estro, si se observa, ocurre de 12 a 24 horas antes de la ovulación (Robeck *et al.*, 2005).



Gráfica 3. Perfil endocrinológico (centrado en la ovulación) del ciclo sexual de la hembra delfín
(Modificado de Rimet, 2012).

5.3.1.3. Detección de ovulación mediante ecografía

Se pueden realizar ecografías tres veces al día para detectar el inicio de la ovulación (Robeck *et al.*, 1998). El tamaño de los folículos se determina midiendo el tamaño de la zona anecoica que los constituye y para los folículos ovoides se mide el diámetro en ambos lados. El diagnóstico de ovulación se establece cuando el folículo dominante ya no es detectable en el siguiente examen ecográfico (es decir, 8 horas después, para exámenes realizados 3 veces al día) (Robeck *et al.*, 2005). El diámetro de los folículos preovulatorios varía de 16 a 23 mm. y su conocimiento puede constituir un apoyo en la evaluación de la ovulación en los ciclos posteriores. El crecimiento folicular diario se estima en 4,7 mm. en promedio (Brook *et al.*, 2000) y en el 80% de los casos, la ovulación tiene lugar en el ovario izquierdo y ocurre 8 días en promedio después de que el folículo dominante haya alcanzado el tamaño de 10 mm. de diámetro. La I.A. comienza cuando el tamaño del folículo dominante alcanza los 20 mm. de diámetro y se realiza todos los días con semen refrigerado, cada 12 horas si es congelado, hasta que el inicio de la ovulación se pueda evaluar ecográficamente (Brook, 2001).

5.3.2. Tecnología seminal

El objetivo de controlar la recolección y el almacenamiento de semen en machos es de poder disponer de un banco de espermatozoides suministrado por individuos de parques acuáticos del mundo entero, incluso por individuos salvajes varados. Este banco de semen permite garantizar la variabilidad y el mejoramiento genético en poblaciones cautivas.

5.3.2.1. Recolección de semen

La recolección de semen se realizó por primera vez en delfines en 1986 (Perrin *et al.*, 2008). Antes de recolectar el semen de un individuo cautivo, el macho debe ser estimulado por la presencia de una hembra en celo u otro macho. El macho debe de ser entrenado para presentarse en decúbito supino a lo largo de la pared de la pelvis y se debe de inducir la extrusión del pene de la hendidura genital y estimular el pene para provocar la eyaculación, manualmente o por electroeyaculación. Este último método se suele usar poco ya que promueve la dilución de los espermatozoides dentro del líquido seminal y la contaminación de la muestra (Robeck *et al.*, 1994). Una sesión de muestreo en delfines suele durar en promedio 30 minutos durante los cuales el animal puede eyacular de 2 a 20 veces, con un volumen medio de semen obtenido que puede alcanzar los 65,5 mL (Rimet, 2012). Las muestras se pueden tomar dos veces al día máximo y respetando un período mínimo de 6 horas entre cada sesión (Robeck y O'Brien, 2004). Durante un programa de cría, se toman muestras 3 veces por semana que se recogen en recipientes de plástico de 125 mL (Yuen *et al.*, 2009). Se está probando el uso de vaginas artificiales que podría permitir limitar la pérdida de semen y la contaminación de la muestra (Robeck *et al.*, 2004). Cualquier eyaculación debe de ser seguida por un refuerzo positivo del entrenador. Inmediatamente después de la recolección, las muestras se cubren y se mantienen en temperatura ambiente (21-24°C) (Robeck *et al.*, 2011). Por otra parte, la recolección de semen también se puede realizar de manera post-mortem, ya que es una oportunidad para el desarrollo y el enriquecimiento de material genético en poblaciones cautivas. Algunas horas después de la muerte del animal, los espermatozoides contenidos en el epidídimo pueden ser fertilizantes y su estructura y motilidad suelen estar poco afectadas. La concentración y motilidad de los espermatozoides presentes en un cadáver dependen de la causa de la muerte, el momento de la recolección, la calidad de la muestra y su conservación (Dierauf y Gulland, 2001).

5.3.2.2. Contrastación seminal o espermiograma

La evaluación cualitativa del semen debe realizarse dentro de los 30 minutos siguientes al muestreo. Se evalúan el volumen y el pH del eyaculado y, después, la concentración, morfología y motilidad de los espermatozoides (Robeck y O'Brien, 2004). El volumen promedio de eyaculación de un delfín es de 20,4 mL (Rimet, 2012). La concentración del eyaculado de delfín varía entre los estudios de 22,5 a 95,1x10⁷ espermatozoides por mililitro de eyaculado con un máximo de 55x10⁹ espermatozoides/mL de eyaculado (Schroeder y Keller, 1989). Durante una sesión de muestreo, la primera eyaculación está menos concentrada y el volumen de la eyaculación es mayor que en las posteriores (Yuen *et al.*, 2009).

El pH del semen varía de un individuo a otro, suele situarse entre 7.2 y 8.3 y el primer eyaculado suele ser más básico que el siguiente. Las muestras no deben estar contaminadas con orina o agua de mar y solo las muestras con una osmolaridad inferior a 375 mOsm/kg. (miliosmoles por kilogramo) serán guardadas. Como en las especies domésticas, en los espermatozoides de delfines se observa una cabeza (compuesta de un acrosoma y núcleo), una pieza intermedia y una cola (Figura 9). La pieza intermedia contiene fibras longitudinales en continuidad con la cola (axonema) y varios tipos de mitocondrias y la cola consta de un par de microtúbulos (Robeck *et al.*, 2011).

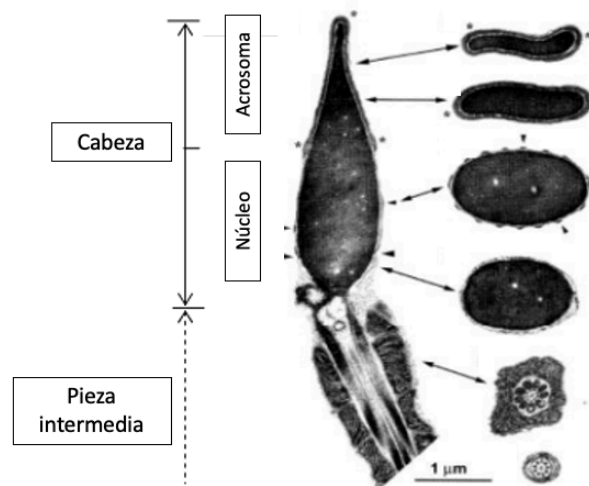


Figura 9. Secciones sagital y transversal de un espermatozoide de delfín mular a través del microscopio electrónico (x15.000) (Modificado de Miller, 2007).

Un espermatozoide de delfín mide en promedio 70,2 µm. de longitud y tiene una cabeza generalmente de forma alargada. En los delfines mulares, la segunda mitad de la cabeza se caracteriza por la presencia de rayas paralelas al eje longitudinal del espermatozoide. Su función no es bien conocida, pero podrían desempeñar un papel en la fusión de la membrana del espermatozoide con el ovocito (Rimet, 2012). Se puede evaluar la viabilidad y la morfología de los espermatozoides utilizando varios medios de coloración y las células vivas no suelen tomar coloración. En delfines, la solución salina Spermac® es la más utilizada para establecer un espermiograma y revela anomalías en la forma del acrosoma, de la pieza intermedia y del flagelo. Esta solución tiñe el acrosoma, la parte intermedia y la cola en verde si la célula es normal, el núcleo y la parte post-acrosomal en rojo. Cualquier modificación del color revelará la presencia de una anomalía estructural. También se pueden realizar pruebas para observar el índice de motilidad de los espermatozoides, observando los que son móviles en el campo, los que tienen una movilidad progresiva y evaluando la tasa de movilidad. La muestra se diluye al 25% y se realiza la observación bajo un microscopio óptico (x400) en 4 a 5 campos del portaobjetos.

El pH debe mantenerse a 7.2 y la temperatura a 35°C con el fin de imitar las condiciones fisiológicas normales (Robeck y O'Brien, 2004).

5.3.2.3. Sexado de gametos

El uso de semen sexado en I.A. permite gestionar mejor la proporción de los diferentes sexos en los parques acuáticos y, por tanto, los recursos disponibles para los animales (grupos de machos o hembras exclusivamente ya que suele ser difícil mantener varios machos dentro del mismo grupo). También permite una repoblación más eficiente dentro de poblaciones amenazadas por promover el nacimiento de futuros reproductores (O'Brien *et al.*, 2009). La citometría de flujo permite distinguir el espermatozoide masculino del femenino por diferencia óptica ya que el cromosoma X tiene más material genético que el Y, con una diferencia cerca del 4% en delfines mulares. Un citómetro de flujo puede actuar diferenciando 14×10^6 espermatozoides de delfín por hora y la eficacia de las muestras así sexadas podría alcanzar el 90% (O'Brien y Robeck, 2006).

5.3.2.4. Almacenamiento del semen

Después de la recolección, el almacenamiento del semen permite su uso diferido en el tiempo. Puede usarse a partir de unas pocas horas a unos días para el semen fresco, y durante años en el caso del semen congelado. Los intercambios de semen entre parques acuáticos pueden tener lugar por transporte aéreo, usando bolsas estériles colocadas en contenedores aislantes (Robeck *et al.*, 2005).

5.3.2.4.1. Semen refrigerado

El semen refrigerado es el que mejor se conserva ya que preserva la motilidad y el poder fertilizante de los espermatozoides (Robeck *et al.*, 2011). Los conservantes más utilizados son la solución Biladyl® y la solución EYC (Egg Yolk Citrate). Un volumen medio de eyaculado de 10 mL. se diluye en una proporción 2:1 usando cualquiera de los dos diluyentes citados. Almacenada a 21°C, esta preparación se puede utilizar en 4 horas y enfriada a 5°C, se puede utilizar en 24 horas (Robeck *et al.*, 2004).

5.3.2.4.2. Semen congelado

La criopreservación es un método importante para la conservación a largo plazo del material genético recolectado en animales, pero, sin embargo, no está exenta de riesgo para la integridad de los gametos.

La formación de cristales en el citoplasma de los espermatozoides, la toxicidad de los medios de criopreservación y el choque osmótico son las principales causas de muerte celular durante este proceso (Miller, 2007). En los delfines se utilizan dos tipos de envases: los "pellets" que contienen 0,03 a 0,86 mL. de semen y las "pajuelas", que contienen de 0,25 a 1,2 mL. de semen y son de mejor calidad. Los pellets corresponden a una congelación lenta de los espermatozoides en un bloque de hielo seco y las pajuelas (viales) se pueden sumergir directamente en nitrógeno líquido a -196°C . Los equipos de investigación han utilizado con éxito la congelación direccional donde el semen se enfría progresivamente siguiendo un gradiente térmico, lineal y pudiendo bajar hasta -196°C . De esta manera, se obtiene un mayor índice de motilidad y una mejor viabilidad de los espermatozoides ya que ayuda a reducir la alteración de las membranas celulares durante la congelación. El glicerol es un crioprotector que se agrega con frecuencia a las soluciones de preservación del semen y puede influir sobre su calidad ya que cantidades superiores al 9%, pueden provocar la desorganización de la membrana y conducir a la muerte de los gametos. La velocidad de enfriamiento constituye otro parámetro que puede influir y en delfines, el protocolo de enfriamiento rápido a $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$. daría los mejores resultados (Robeck *et al.*, 2011).

5.3.2.5. Inseminación artificial

5.3.2.5.1. Descongelación del semen criopreservado

El semen criopreservado se descongela una hora antes de realizar la I.A., siguiendo un protocolo preciso. Uno de los protocolos de descongelación se realiza extrayendo las pajuelas del nitrógeno líquido y colocándolas en un baño a 35°C durante 30 segundos (velocidad de descongelación de $+8,3^{\circ}\text{C}/\text{segundo}$). Después, el semen se diluye con una solución de Biladyl® (1: 1) y posteriormente, es necesario volver a evaluar el índice de motilidad de los espermatozoides previamente a la inseminación (Robeck *et al.*, 2004).

5.3.2.5.2. Protocolo de inseminación

Se debe realizar la I.A. antes del inicio de la ovulación y en el caso de que sea necesario, si esta ocurriera, se llevará a cabo lo antes posible después de la misma. El indicador más fiable para estimar el momento de ovulación y así poder planificar la inseminación es la medición de la LH. Primero, para proceder a la I.A., requerimos del uso de sondas endoscópicas, de un laringoscopio flexible y de un catéter (Robeck *et al.*, 2005). La sedación se realiza en la hembra antes de la I.A. y para ello, se suele utilizar diazepam, con una dosis de 0,1 a 0,2 mg/kg.

El animal se retira del agua, se coloca en decúbito lateral y debe de permanecer húmedo y monitorizado durante todo el procedimiento. Las hembras se aíslan de cualquier macho sexualmente maduro un mes antes y 15 días después de la I.A.

La sonda endoscópica se inserta en la vagina y se lleva a cabo una ligera insuflación para visualizar los pliegues vaginales que forman el pseudocérnix y enmascarar el receso espermático y la entrada del cuello uterino. Se introduce el catéter a través del endoscopio que sirve de guía hasta la entrada del cuello uterino y una vez en el útero, puede tener lugar la I.A. Se debe depositar el semen en el cuerpo uterino (Figura 10) o en uno de los dos cuernos (cuerno ipsilateral al lugar de ovulación) o en cada uno de los dos cuernos (Robeck *et al.*, 2013).

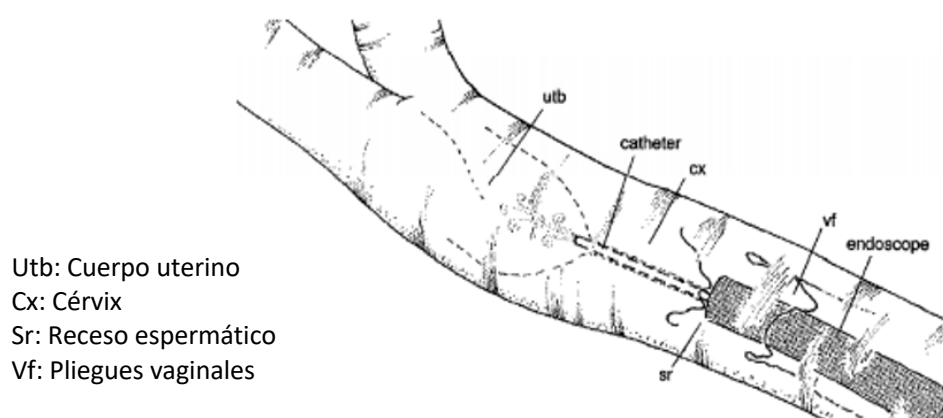


Figura 10. Paso del cuello uterino y depósito del semen en el tracto genital femenino del delfín
(Modificado de Robeck *et al.*, 1994).

Schroeder y Keller, en 1989, fueron los primeros en practicar la I.A. en el delfín mular, depositando el semen a nivel del receso espermático y no permitió la aparición de la gestación. Hoy en día, se realiza un promedio de 1 a 5 inseminaciones por ciclo y por hembra. El número medio de espermatozoides inseminados depende del método de almacenamiento usado y se suelen utilizar en promedio 296×10^7 espermatozoides a partir de semen refrigerado y $62,2 \times 10^7$ espermatozoides a partir de semen criopreservado. La dosis más baja de semen congelado que resulta eficaz en una I.A. se determina a partir de 27×10^7 espermatozoides.

Un alto porcentaje del éxito en la fecundación depende del lugar de depósito en el tracto genital de la hembra y se ha podido determinar que los cuernos uterinos son un lugar de preferencia para la I.A. ante el cuerpo y el cuello uterino o el receso espermático (Robeck *et al.*, 2004). La inseminación suele resultar fértil para el 65 al 70% de las hembras con semen congelado (Perrin *et al.*, 2008).

6. CONCLUSIONES

Tras hacer la revisión bibliográfica, y tratando de cumplir los objetivos planteados al principio de nuestro trabajo, llegamos a las siguientes conclusiones:

La reproducción de los delfines está adaptada a la vida en un medio acuático. Anatómicamente, observamos la presencia de genitales en una posición interna y la presencia de un receso espermático en la hembra que permite proteger los espermatozoides del contacto con el agua de mar. Fisiológicamente, el funcionamiento de las hormonas se asemeja mucho con el de los otros mamíferos.

Los protocolos de reproducción asistida en delfines son similares a los utilizados en los mamíferos terrestres, con el uso de la monitorización ecográfica del ciclo ovárico y de protocolos de sincronización de estro.

El método de elección para la reproducción asistida utilizado en la actualidad para los delfines es la inseminación artificial, permitiendo así poder preservar la diversidad genética y luchar contra el peligro de extinción de estos mamíferos.

CONCLUSIONS

After doing the bibliographic review, and trying to meet the objectives set at the beginning of our work, we reached the following conclusions:

The reproduction of dolphins is adapted to life in an aquatic environment. Anatomically, we observe the presence of genitalia in an internal position and the presence of a sperm recess in the female that protects the sperm from contact with seawater. Physiologically, the functioning of hormones is very similar to that of other mammals.

Assisted reproduction protocols in dolphins are similar to those used in land mammals, with the use of ultrasound monitoring of the ovarian cycle and estrous synchronization protocols.

The method of choice for assisted reproduction currently used for dolphins is artificial insemination, thus allowing to preserve genetic diversity and fight against the danger of extinction of these mammals.

7. VALORACIÓN PERSONAL

La intención final de este trabajo era poder aprender más acerca de los aspectos reproductivos en delfines y observar los procedimientos que existen en la actualidad para poder realizar una reproducción exitosa en estos animales con el fin de proteger las especies presentes en la actualidad. Gracias a este trabajo, pude darme cuenta de mi interés por el ámbito de la reproducción y por lo apasionante que es el mundo de los delfines, además de la importancia de su preservación y conservación. La elaboración de este trabajo me ha enriquecido a nivel profesional, ya que me ha enseñado a establecer unos criterios de búsqueda de información selectivos y usando fuentes de más calidad.

Sin embargo, la búsqueda de artículos resultó difícil ya que se han llevado a cabo una cantidad reducida de trabajos sobre esta especie. Mi idea es seguir investigando sobre los avances reproductivos en delfines ya que, a lo largo de la búsqueda bibliográfica, hemos visto trabajos que apuntan la posibilidad de que, en un futuro, quizás se puedan aplicar otras biotecnologías que hemos estudiado a lo largo de la carrera y se emplean en mamíferos terrestres, como por ejemplo la fecundación *in vitro*, la transferencia de embriones, etc.

Para la realización de este trabajo, he podido contar desde el inicio del trabajo con la ayuda de Antonio del Niño Jesús García, veterinario, profesor y director de este trabajo y de Noelia González Ortí, veterinaria y profesora en la Facultad de Zaragoza. Quería darles las gracias a ambos, por haber aceptado ayudarme durante este trabajo, y por haberme apoyado y aconsejado en todo momento. Gracias por su amabilidad y total sinceridad a la hora de aportar puntos de vista y por facilitarme información que me fue de gran utilidad para poder finalizar este trabajo.

A continuación, quería dar las gracias a Carlos Barros, veterinario del Oceanografic en Valencia, que llevó a cabo unas de las primeras inseminaciones artificiales de delfines en España, por haber contestado a mis dudas y cuestiones sobre el tema del trabajo.

Por último, me gustaría agradecer a mi familia por siempre haberme apoyado en mi sueño de ser veterinaria y por haberme dado su punto de vista sobre mi último trabajo de la carrera.

8. BIBLIOGRAFÍA

Andersen, H. T. (1969). *The biology of marine mammals*. New York, Academic Press, United States of America, pp. 536.

Asper, E. D., Young W. G. y Walsh M. T. (1988). *Observations on the birth and development of a captive-born Killer whale Orcinus orca*. London, International Zoo Yearbook, England, 27 (1), pp. 295–304.

Barratclough, A., Gomez F. M., Morey J.S., Deming A., Parry C., Meegan J. M., Carlin, K.P., Schwacke L., Venn-Watson S., Jensen E. D. y Smith C. R. (2020). “Pregnancy profiles in the common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Clinical biochemical and hematological variations during healthy gestation and a successful outcome”. *Theriogenology*, 142, pp. 92-103.

Berta, A., Sumich, J. L. y Kovacs, K. M. (2005). *Marine Mammals, Second Edition: Evolutionary Biology*, New York, 2nd ed. Academic Press, United States of America, pp. 575.

Brook, F. M., Kinoshita, R., Brown, B. y Metrewell, C. (2000). “Ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncas*.” *Journal of reproduction and fertility*, 119 (2), pp. 233-240.

Brook, F. M. (2001). “Ultrasonographic imaging of the reproductive organs of the female bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncas*.” *Reproduction*, 121 (3), pp. 419-428.

Cozzi, B., Huguenberger, S., Oelschläger A, H. (2017). *Anatomy of Dolphins: Insights into Body Structure and Function*. London, Elsevier, United Kingdom.

Darwin, C. (1859). *The Origin of Species by means of Natural Selection*. London, John Murray, United Kingdom.

De Vos, J.R., Joppa, L.N., Gittleman, J.L, Stephens, P.R. y Pimm, S.L. (2014). “Estimating the normal background rate of species extinction”. *Conservation Biology*, 29 (2), pp. 452-462.

Dierauf, L. A., Gulland, F. M. D. (2001). *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine: Health, Disease, and Rehabilitation*, Florida, 2nd ed. CRC Press, United States of America, pp. 1063.

Durand, et al. (1996). "Mesure in utero de la longueur du cordon ombilical au cours de grossesses à terme." *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction*, 25 (1), pp.78–86.

Eastcott A. y Dickinson T. (1987). "Underwater observations of the suckling and social behavior of a newborn bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*)."
Aquatic Mammals, 13 (2), pp. 51–56.

Holt, W.V. y Lloyd, R.E. (2009). "Artificial insemination for the propagation of CYTES: the reality!"
Theriogenology (71), pp. 228-235.

Leatherwood S., Preissle J., Reeves R. R. y LeCompte (1990). *The Bottlenose dolphin*. California, Academic Press, United States of America, pp. 653.

Miller, D. L. (2007). *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea: Whales, Porpoises and Dolphins*. California, Science Publishers, United States of America, pp. 428.

O'Brien J. K. y Robeck T. R. (2006). "Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)."
Reproduction Fertility and Development, 18 (3), pp. 319–329.

O'Brien, J. K., Steinman K. J. y Robeck T. R. (2009). "Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation." *Theriogenology*, 71 (1), pp. 98–107.

O'Brien, J.K., Robeck, T.R. (2010). "The value of ex situ cetacean populations in understanding reproductive physiology and developing assisted reproductive technology for ex situ and in situ species management and conservation efforts." *International Journal of Comparative Psychology*, 23, pp. 227–248.

Orbach, D.N., Marshall C.D., Würsig B. y Mesnick, S.L. (2016). "Variation in Female Reproductive Tract Morphology of the Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*)."
The anatomical record, 299, pp. 520-537.

Perrin, W. F., Reilly, S. B. (1984). *Reproductive parameters of dolphins and small whales of the family Delphinidae*. La Jolla, Report of the International Whaling Commission, United States of America, Special Issue (6), pp. 97–134.

Perrin, W. F., Wursig B. y Thewissen J. G. M. (2008). *Encyclopedia of Marine Mammals*, Oxford, Second Edition, England, 2nd edition. Academic Press, pp. 1316.

Rimet, C-S. (2012). *Contribution à l'étude de la reproduction chez deux espèces de Cétacés, le grand dauphin (Tursiops truncatus) et l'orque (Orcinus orca) : Application à la procréation assistée*. Trabajo Fin de Grado. Escuela nacional veterinaria de Lyon.

Robeck, T. R., Curry, B. E., McBain, J. F., Kraemer, D. C. (1994). "Reproductive Biology of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) and the Potential Application of Advanced Reproductive Technologies." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 25 (3), pp. 321–336.

Robeck T. R., McBain J. F., Mathey S. and Kraemer D. C. (1998). "Ultrasonographic Evaluation of the Effects of Exogenous Gonadotropins on Follicular Recruitment and Ovulation Induction in the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*)." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 29 (1), pp. 6–13.

Robeck T. R. and O'Brien J. K. (2004). "Effect of cryopreservation methods and precryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa." *Biology of reproduction*, 70 (5), pp. 1340.

Robeck T.R., Steinman K.J, Yoshioka M., Jensen E., O'Brien J.K., Katsumata E., Gili C., McBain J.F., Sweeney J. and Monfort S.L. (2005). "Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen–thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)." *Reproduction*, 129 (5), pp. 659 –674.

Robeck T. R., Gearhart S. A., Steinman K. J., Katsumata E., Loureiro J. D. y O'Brien J. K. (2011). "In vitro sperm characterization and development of a sperm cryopreservation method using directional solidification in the killer whale (*Orcinus orca*)." *Theriogenology*, 76 (2), pp. 267-279.

Robeck T.R., Montano G.A., Steinman K.J., Smolensky P., Sweeney J., Osborn S. y O'Brien J. K. (2013). "Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)." *Animal Reproduction Science*, 139, pp. 168-181.

Schroeder J. P. and Keller K. V. (1989). "Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*." *Journal of Experimental Zoology*, 249 (3), pp. 316–321.

St. Aubinand, D., Dierauf, L. (2001). Stress and Marine Mammals, *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, Florida, CRC Press, United States of America, pp. 253–269.

West K. L., Atkinson S., Carmichael M. J., Sweeney J. C., Krames B. y Krames J. (2000). "Concentrations of progesterone in milk from bottlenose dolphins during different reproductive states." *General and Comparative Endocrinology*, 117 (2), pp. 218–224.

West K. L., Oftedal O. T., Carpenter J. R., Krames B. J., Campbell M. y Sweeney J. C. (2007). "Effect of lactation stage and concurrent pregnancy on milk composition in the bottlenose dolphin." *Journal of Zoology*, 273 (2), pp. 148–160.

Williamson, P., Gales, N.J., Lister, S. (1990). "Use of real-time B-mode ultrasound for pregnancy diagnosis and measurement of fetal growth rate in captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)." *Journal of Reproduction and Fertility* 88, pp. 543–548.

Yuen, Q. W. H., Brook, F. M., Kinoshita, R. E., Ying, M. T. C. (2009). "Semen Collection and Ejaculate Characteristics in the Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*)." *Journal of Andrology*, 30 (4), pp. 432–439.