



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Caracterización del eyaculado del delfín mular (*Tursiops truncatus*) a través del estudio de la conservación y morfometría espermática, e identificación de proteínas en espermatozoides y plasma seminal

Dña. María del Carmen Fuentes Albero
2023



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. María del Carmen Fuentes Albero

doctorando del Programa de Doctorado en

BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD REPRODUCTIVA (PLAN 2013)

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Caracterización del eyaculado del delfín mular (*Tursiops truncatus*) a través del estudio de la conservación y morfometría espermática, e identificación de proteínas en espermatozoides y plasma seminal

y dirigida por,

D./Dña. Francisco Alberto García Vázquez

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 2 de noviembre de 2023

Fdo.: María del Carmen Fuentes Albero

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados

Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

El desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se ha realizado en colaboración bajo convenio entre la empresa AVANQUA-OCEANOGRÀFIC S.L. y la Universidad de Murcia, según el Artículo 15 bis del RD 00/2011, de 28 de enero, artículo 34 del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Murcia, y Procedimiento para la obtención de la Mención de Doctorado Industrial, aprobado por el Comité de Dirección de la EIDUM de 14 de junio de 2019 y adaptado al Reglamento de Doctorado de 22 de julio de 2022 por la Comisión General de Doctorado el 21/09/2022.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Francisco Alberto García Vázquez, Profesor Titular de Universidad del Área de Veterinaria en el Departamento de Fisiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Caracterización del eyaculado del delfín mular (*Tursiops truncatus*) a través del estudio de la conservación y morfometría espermática, e identificación de proteínas en espermatozoides y plasma seminal", realizada por D^a. María del Carmen Fuentes Albero, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 19 de octubre de 2023

GARCIA
VAZQUEZ
FRANCISCO
ALBERTO -
48396482C

Firmado digitalmente
por GARCIA
VAZQUEZ
FRANCISCO ALBERTO
- 48396482C
Fecha: 2023.10.19
11:01:09 +02'00'

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, escrita bajo los efectos de una pandemia mundial, varios confinamientos, dos embarazos, dos partos y dos lactancias, ha paralizado por momentos mi cerebro de tal manera que he necesitado varios meses para ponerlo todo de nuevo a funcionar. Y la música me ha acompañado en todo este proceso, por lo que no se entiende el texto sin música, ni la música sin texto. Por eso escribo este apartado como parte de una banda sonora, porque para cada momento, ha habido una canción.

Para empezar, diré que es el final (McLan, 2004), y como todo lo que acaba, me sugiere algo de incertidumbre, de miedo “dulce”. Miedo a terminar esta etapa de doctoranda, donde cada uno de mis días ha tenido un trozo de ciencia en mi cabeza, incorporándose a mi vida cotidiana y haciéndome sentir despierta. Durante este camino, he estado muy bien acompañada, por ello dedico las próximas líneas a agradecer a esas personas que han estado de una u otra manera pendientes de que esto se materializara.

A mis tutores Francisco Alberto García Vázquez y Daniel García Párraga. Me siento privilegiada por haber podido compartir tiempo y espacio con personas tan inteligentes. Fran, me has enseñado, no sólo a hacer un trabajo científico, sino a hacerlo de la manera más perfeccionista, paciente y eficiente posible. Gracias por hacerme sacar fuerzas de donde ni yo sabía que tenía. Trabajar bajo presión (Queen & Bowie, 1981) contigo ha sido un estímulo imprescindible para mis días. Dani, has confiado en mí y en mis ganas de hacer ciencia desde el día que nos conocimos. Gracias por saber respetar mis tiempos, por tener siempre una palabra de ánimo y por hacer de éste un periodo inolvidable (Sia, 2012).

A la Universidad de Murcia, que me ha acogido como estudiante durante estos años y me ha proporcionado la oportunidad de realizar la Tesis Industrial mediante este largo y sinuoso camino (The Beatles, 1970).

Al Oceanogràfic, que ha sido mi casa durante una década. Gracias por enseñarme a tener los pies en la tierra y el corazón en el mar. Estoy convencida de que, algún día, volveré a ese lugar; al sitio de mi recreo (Antonio Vega, 1992).

Al equipo de cuidadores y entrenadores de delfines. Sin ellos, nada de esto sería posible. Gracias por liderar con fuerza y pasión (María Parrado, 2016) el cuidado diario de los animales, con una dedicación y constancia imprescindibles para la participación en estudios como los de esta tesis.

Al equipo veterinario del Oceanogràfic. Los cafés de máquina no son lo mismo sin vosotros, y las conversaciones privadas, sin que suenen por el walkie en abierto, ya no son nada divertidas. Diez años después de conocerlos, de charlas infinitas, de horas de microscopio y de preguntar tantas veces dónde están los portos, sólo puedo decir que a veces la ciencia no funciona (Guerra, 1990), pero tener compañeros como vosotros hace que todo siga adelante.

Al equipo de Marketing, Comunicación y Educación de Oceanogràfic. Gracias por acompañarme estos años, por aplaudir cada una de mis invenciones, por abrazar cada juego de palabras. Por las barbacoas, las noches ochenteras (Vicco, 2023) esperando buenas canciones de un USB, los “Pepa guapa, ¿quieres mi bocadillo?” y los “apunta nena”. Reír 10 veces al día en un trabajo no es habitual y vosotros conseguisteis que fuera rutinario. Gracias Perreros.

A los compañeros UCV que me han dado apoyo y cariño en los días raros (Vetusta Morla, 2012) de esta última etapa. Os prometo que hay una mejor versión de mi misma tras todo esto, estad preparados que salgo en breve.

A los Biolokos, que han hecho de “coach” de manera interminable en todos estos años. Sólo sé que el tiempo, nos juntó en un mismo asiento (Los lunes que quedan, 1996)... Y a partir de ahí os habéis convertido en compañeros, no sólo de clase, sino de vida. GRACIAS.

A mis amigas, aldeanas, compañeras de éxitos y fatigas desde la infancia. Crecer en el “Wisteria Lane” valenciano ha condicionado para bien o para mal mi yo adulta. Gracias por hacerme entender que vivir es jugar, y por hacerme sentir que yo quiero seguir jugando (Calamaro, 1999).

Inés y Rocío, hermanas de vida, mis viejas amigas de siempre, mis compañeras (Mclan, 1999). Gracias por “ser” y por “estar”.

A los Garijo, por ser familia, Ohana, siempre (Rees, 2019).

A mi familia “política”, que tiene todo de familia y nada de política. Gracias por las tardes libres para poder escribir, por los “tuppers” de comida cuando no podía ni cocinar y por los ánimos diarios y constantes durante más de 19 días y 500 noches (Sabina, 1999).

A mis padres, de ellos aprendí que no importa no saber mucho sobre historia, biología, o trigonometría (Cooke, 1959), lo que importa es el disfrute del camino del aprendizaje. Ellos me inculcaron lo que ahora se pone de moda, la “cultura del esfuerzo”. Visionarios de la educación y la sabiduría, han sido y serán, estando o sin estar, el motor de todo. Gracias a mi padre (q.e.p.d) que me sugirió mirándome a los ojos (Clapton,1992) que hiciera una tesis y, gracias a mi madre (Streep,2008), que insistió en que la terminara. Son, han sido y serán, el alfa y el omega no sólo de mi educación, sino de los componentes más importantes en mi construcción como persona; mis hermanas. Mila, Cristina y Mercedes, gracias por hacerme entender durante todos estos años que no importa el problema; importa la solución (Los Rodríguez, 1993). Formar parte de este equipo llamado “Hermanas” me ha hecho capaz de ser la mujer empoderada que hoy escribe este texto.

A mi marido. Carles, tu sabiduría, tu paciencia, tu calma, tus bromas, tu manera de ponérmelo todo tan fácil... Mi mundo es mejor desde que tú estás en él (John, 1970). Gracias por tu apoyo

y tus observaciones sobre el documento y sobre el mejor proyecto que comparto contigo; la vida.

Y por último, a mis hijos Manel (King Cole, 1958) y Carla (The Temptations, 1965), que han compartido tiempo de nacimiento con algunos de los artículos de esta tesis... PERDÓN. Perdón por las horas de juego robadas, por las tardes de parque interrumpidas, por las películas abandonadas a medias. El sacrificio ha sido tal, no por el esfuerzo de pensar y desarrollar la tesis en sí, sino por saber que eso os restaba tiempo de mí y a mí de vosotros. Pero como esto es un proceso de aprendizaje, ahora en el final, entiendo que es una oportunidad para poder explicaros que no hay nada que no se pueda conseguir con trabajo, tesón y paciencia. Que cuando muchos decían “no lo intentes con la maternidad”, mamá decidió no sólo intentarlo, sino además conseguirlo.

Gracias por formar parte de esta lección de vida.

DISCOGRAFÍA

Andrés Calamaro, 1999, Paloma, *Honestidad Brutal*
Antonio Vega, 1992, El sitio de mi recreo, *El sitio de mi recreo*
David Rees, 2019, De ellos aprendí, *De ellos aprendí*
Elton John, 1970, Your song, *Elton John*
Joaquín Sabina, 1999, 19 días y 500 noches, *19 días y 500 noches*
Juan Luis Guerra, 1990, La bilirrubina, *Bachata rosa*
Los lunes que quedan, 1996, No te fallaré, *Los lunes que quedan*
Los Rodríguez, 1993, Dulce Condena, *Sin documentos*
Los Rodríguez, 2006, Diez años, *Palabras más o menos*
María Parrado, 2016, Qué hay Más Allá, *B.S.O Vaiana*
Mclan, 1999, La calma, *Usar y tirar*
Mclan, 2004, Miedo, *Sopa Fría*
Meryl Streep, 2008, Mamma Mia, *Mamma Mia! The Movie Soundtrack Featuring the Songs of ABBA*
Nat King Cole, 1958, Cachito, *Cole español*
Queen & Bowie, 1981, Underpressure, *Hot Space.*
Sam Cooke, 1959, Wonderful world, *Tribute to a Lady*
Sia, 2012, Unforgettable, *B.S.O Finding Dory*
The Beatles, 1970, The long and winding road. *Let it be*
The Temptations, My girl, 1965, *Phoenix Rising*
Vetusta Morla, 2012, Los días Raros, *Mapas*
Vicco, 2023, Nochentera, *Todo me da igual*



Sigue nadando, sigue nadando.

ÍNDICE

ÍNDICE

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	9
1.	Introducción general	11
	1.1 El mundo marino en la actualidad	11
	1.2 Problemas de origen antropogénico	12
	1.3 Conservación y protección de los cetáceos	13
2.	El delfín mular	16
	2.1 Descripción de la especie	16
	2.2 Estudios en cautividad	16
	2.3 Distribución	17
3.	Reproducción	18
	3.1 Aparato reproductor en hembras	18
	3.2 Aparato reproductor en machos	18
	3.3 Estrategias reproductivas	21
4.	El espermatozoide del delfín mular	22
	4.1 Estructura del espermatozoide	22
	4.2 Sistemas de evaluación del eyaculado y del espermatozoides	24
5.	Técnicas de reproducción asistida en el delfín mular	26
	5.1 Métodos de preservación del semen	26
	5.2 Inseminación artificial (IA)	27
	5.3 Sexaje espermático	28
	Bibliografía	29
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
IV.	ARTÍCULOS PUBLICADOS	43
1.	Effect of temperature and cell concentration on dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>) spermatozoa quality evaluated at different days of refrigeration	45
2.	Characterization of Bottlenose Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>) Sperm Based on Morphometric Traits	49
3.	Protein Identification of Spermatozoa an Seminal Plasma in Bottlenose Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	53
V.	DISCUSIÓN GENERAL	57
	Bibliografía	66
VI.	CONCLUSIONES	71
	ANEXO I: Abreviaturas	75
	ANEXO II: Publicaciones derivadas de la tesis	79

I. RESUMEN

I. RESUMEN

El delfín mular (*Tursiops truncatus*) es uno de los mamíferos acuáticos más conocidos por su comportamiento social altamente desarrollado. Se trata de una especie cosmopolita, ya que habita en la mayor parte de los mares y océanos del planeta, sin embargo su hábitat natural se encuentra amenazado por diversos peligros generados en parte por la acción del hombre. La contaminación de las aguas, la sobreexplotación de los recursos y la pesca ilegal de estos animales son algunos de los problemas a los que se enfrentan. Además, el aumento de temperaturas de los mares debido al calentamiento global está provocando un descenso a aguas más profundas de los peces que conforman la dieta diaria de los delfines, teniendo éstos que emplear mayores recursos fisiológicos para acceder a su alimentación.

Además de su hábitat natural, el delfín mular es la especie de cetáceo más común en numerosos zoológicos y acuarios de todo el mundo. Esto es debido a su fácil manejo, su alta capacidad de adaptabilidad a todos los climas y a la especialización de sus cuidadores, que han conseguido trabajar rutinas que hacen posible el proceso de recogida de muestras biológicas para realizar un control y seguimiento de diversos parámetros. No obstante, el tener poblaciones en medios controlados plantea el problema de la incorporación de variabilidad genética en dichas poblaciones, siendo imprescindible para evitar la consanguineidad. Desde 2017, el delfín mular se encuentra clasificado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como vulnerable dentro del Apéndice II del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), lo que limita el movimiento de estos animales entre países, para lo cual se hace imprescindible el intercambio de muestras seminales entre centros. Por tanto, las técnicas de reproducción asistida (TRAs) generan especial interés en esta especie, así como en otros cetáceos. Sin embargo, a pesar de que existen diversos estudios donde se han aplicado TRAs con éxito en esta especie como la criopreservación y la inseminación artificial, poco se ha profundizado sobre las características del semen así como la funcionalidad espermática. Aumentar el conocimiento del comportamiento espermático en determinadas condiciones podría ayudar enormemente en la mejora de las TRAs aplicadas en esta especie, así como la extrapolación a otras especies de cetáceos de interés.

Teniendo en cuenta este contexto, el objetivo general de esta tesis ha sido analizar las características seminales y la funcionalidad espermática del delfín mular (*Tursiops truncatus*) a través del estudio de su conservación (**Artículo 1**), morfometría (**Artículo 2**) y composición proteica (**Artículo 3**). Para la consecución de este objetivo se utilizaron tres machos de delfín mular maduros sexualmente alojados en el Oceanogràfic de Valencia (Valencia, España), los cuales comparten instalación desde el año 2003. Dichos animales se encontraban previamente entrenados por parte de cuidadores y veterinarios especializados para la obtención de manera colaborativa de las muestras seminales que asegura una intervención no invasiva basada en la disposición voluntaria del animal en cuestión.

El objetivo planteado en el **Artículo 1** fue desarrollar un método de refrigeración espermática para esta especie animal, que permitiera mantener viables a los espermatozoides durante varios días. Esto permitiría el intercambio de muestras entre centros alejados geográficamente para su posterior uso en programas de inseminación artificial sin tener que recurrir a la congelación celular, método que conlleva una menor viabilidad final de la muestra, así como un mayor coste económico. El estudio se dividió en 3 experimentos. En el experimento 1, se evaluó el efecto de la temperatura de conservación (5 °C vs. 15 °C) de las muestras seminales sobre la calidad espermática [viabilidad, motilidad (total y progresiva), parámetros cinéticos, morfología e integridad del acrosoma] durante 7 días (análisis realizado a los días 1, 3, 5 y 7 de almacenamiento) a una concentración estándar de 100×10^6 espermatozoides/ml. Los resultados obtenidos mostraron que la motilidad total (%) y la proporción de espermatozoides rápidos (%) era significativamente mayor en las muestras conservadas a una menor temperatura, 5 °C, que a 15 °C ($p = 0.02$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los parámetros evaluados ($p > 0.05$), ni tampoco hubo interacción entre la temperatura de almacenamiento y el periodo de refrigeración. En el segundo experimento, se evaluó el efecto de la concentración (100×10^6 vs. 20×10^6 espermatozoides/ml) sobre la calidad espermática durante el almacenamiento (7 días) a una temperatura de 5 °C. En este caso la motilidad total (%) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, μm) fueron significativamente superiores en las muestras conservadas a una mayor concentración (100×10^6 espermatozoides/ml) ($p = 0.001$ y $p = 0.01$, respectivamente). No se observaron diferencias estadísticamente significativas para el resto de los parámetros evaluados ($p > 0.05$), ni hubo interacción entre la concentración espermática de almacenamiento y el periodo de refrigeración. Por último, en el experimento 3 se estudió el efecto de la temperatura de refrigeración (5 °C vs. 15 °C) y el periodo de almacenamiento (1, 3, 5 y 7 días) sobre el crecimiento bacteriano en muestras seminales con y sin antibiótico. Los resultados mostraron que en el día 1 en 2 de las 5 muestras (40%) había presencia de *Staphylococcus aureus*, que continuaron siendo positivas en el día 3 (60%) en ambas temperaturas analizadas (5 °C y 15 °C) pero únicamente en el grupo de muestras sin antibióticos. Sin embargo, a lo largo del tiempo (5 y 7 días de almacenamiento) las muestras positivas a *Staphylococcus aureus* fueron disminuyendo (0% y 20%, respectivamente). En resumen, los resultados de este estudio indicaron que el semen de delfín mular puede ser refrigerado durante un periodo de tiempo de al menos 7 días, manteniendo la funcionalidad de los espermatozoides, especialmente cuando se almacenan a 5 °C y a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml, así como la calidad microbiológica de las muestras.

A pesar de que este estudio inicial nos ha proporcionado información sobre algunas características funcionales de los espermatozoides de delfín mular hasta ahora desconocidas, y que se han demostrado relevantes para su conservación a corto-medio plazo, aún existen numerosos aspectos desconocidos en esta especie, que han sido importantes para mejorar las TRAs en mamíferos no acuáticos. Los estudios sobre la morfometría de los espermatozoides pueden contribuir a nuestro conocimiento de las características reproductivas de ciertas especies de interés para su aplicación en programas de conservación, incluyendo la aplicación en TRAs. Hasta el momento, no se ha demostrado la heterogeneidad de los eyaculados de delfines en términos de forma y tamaño de los espermatozoides. Por lo tanto, el objetivo general del **Artículo 2** fue determinar las características morfométricas de los espermatozoides

de delfín mular (*Tursiops truncatus*). Con este fin, se plantearon tres experimentos: (1) analizar la población de espermatozoides en el eyaculado de delfín según su morfometría; (2) correlacionar los niveles de testosterona en suero con los parámetros morfométricos del espermatozoide; y (3) estudiar el efecto de la duración (hasta 7 días) y la temperatura de refrigeración (5 °C o 15 °C) sobre la morfometría del espermatozoide. En total se analizaron 13 parámetros morfométricos en 875 espermatozoides procedentes de 11 eyaculados de 2 machos de esta especie. Se analizaron los siguientes parámetros: ancho de la cabeza (W) (μm), longitud de la cabeza (L) (μm), perímetro de la cabeza (P) (μm), área de la cabeza (A) (μm^2), longitud de la pieza intermedia (μm), ancho de la pieza intermedia (μm), longitud de la pieza principal (μm), longitud de la pieza terminal (μm), longitud total del flagelo (μm), longitud total del espermatozoide (μm). A partir de los parámetros de la cabeza, también se determinaron los siguientes factores de forma: elipticidad (L/W), rugosidad ($4\pi A/P^2$) y elongación $[(L - W)/(L + W)]$. En el experimento 1 se observó que la mayor parte de los parámetros morfométricos analizados (excepto el ancho de la cabeza y de la pieza intermedia) diferían estadísticamente entre los dos machos ($p < 0.01$). El análisis de componentes principales (PCA) reveló que cuatro componentes principales (PC) representaron más del 91% de la varianza acumulada determinados por los parámetros morfométricos de los espermatozoides, siendo PC1 el que proporcionó la mayor varianza explicada (47.21%), seguido por PC2 (25.65%), PC3 (11.17%) y PC4 (7.72%). PC1 estaba relacionado con los parámetros de longitud del espermatozoide (cabeza, pieza principal, pieza terminal y longitud total del espermatozoide); PC2 estaba relacionado con los parámetros de la forma de la cabeza del espermatozoide (ancho, elipticidad, rugosidad y elongación); PC3 estaba relacionado con los parámetros del tamaño de la cabeza, pieza intermedia y flagelo (área de la cabeza, perímetro de la cabeza, longitud de la pieza intermedia y longitud del flagelo); y PC4 estaba relacionado con el ancho de la pieza intermedia. Seguidamente, a través de un análisis de agrupamientos se identificaron dos clústeres para la población espermática de cada macho. En ambos machos, el clúster 1 ubicó la similitud de los espermatozoides en PC1, PC2 y PC3, y la disimilitud de los espermatozoides en PC4, mientras que el clúster 2 mostró la disimilitud de los espermatozoides en PC1, PC2 y PC3 y la similitud de los espermatozoides en PC4. Aunque en los dos machos incluidos en el estudio se identificaron dos subpoblaciones espermáticas de iguales características, la distribución de los espermatozoides difería entre ellos. En el experimento 2, se observó que la longitud de la pieza intermedia y PC2 mostraban una correlación positiva con los niveles de testosterona ($r = 0.68$ y $p = 0.02$; $r = 0.63$ y $p = 0.04$, respectivamente), mientras que el ancho de la cabeza, la longitud de la pieza principal, la longitud del flagelo y la longitud total del espermatozoide estaban correlacionados negativamente con las concentraciones de testosterona en el plasma sanguíneo ($r \leq -0.60$; $p < 0.05$). Ninguna de las otras variables estaba correlacionada con las concentraciones de testosterona, incluyendo PC1, PC3 y PC4. Finalmente, en el experimento 3 se observó que el ancho, el área, el perímetro y la rugosidad de la cabeza, la longitud de la pieza intermedia, la longitud del flagelo y la longitud total del espermatozoide disminuyeron del día 1 al día 7 ($p < 0.05$), mientras que la elipticidad y la elongación de la cabeza aumentaron durante el mismo período ($p = 0.04$). Ninguno de los parámetros morfométricos (excepto la longitud de la pieza principal) difirió con las diferentes temperaturas de refrigeración ($p > 0.05$), y no hubo interacción entre el tiempo y la temperatura. Sin embargo, para un tiempo dado, la longitud de la pieza principal fue mayor a 5 °C que a 15 °C ($p = 0.02$). En resumen, el Artículo 2 muestra por primera vez la descripción de poblaciones de espermatozoides en *Tursiops*

truncatus basada en su morfometría, obteniendo dos subpoblaciones espermáticas bien diferenciadas que diferían entre los machos. Además, se observó una correlación (positiva y negativa) entre el nivel de testosterona en sangre y algunas características morfométricas de las células espermáticas. Finalmente, se encontró que un período de almacenamiento en frío, pero no la temperatura de refrigeración, influía en el tamaño de la cabeza y del flagelo, y en la forma de la cabeza.

Una vez conocidas algunas de las características funcionales y fenotípicas de los espermatozoides de delfín en los artículos previos (1 y 2), nos planteamos el estudio de la composición proteica no solo de los espermatozoides sino también del medio que lo rodea durante la eyacuación, el plasma seminal. Conocer el proteoma de los espermatozoides eyaculados y el plasma seminal puede contribuir a obtener información completa y comprender las implicaciones funcionales en los procesos reproductivos, no solo para el delfín, sino también para los cetáceos en general. Por esta razón, el objetivo principal del **Artículo 3** fue identificar, describir y clasificar por primera vez las proteínas de los espermatozoides y el plasma seminal de los delfines, y compararlas con los perfiles de proteínas de otras especies (bovina, canina y humana) previamente descritos en la literatura. Se identificaron un total de 722 proteínas diferentes en el plasma seminal y los espermatozoides en cada una de las cuatro muestras analizadas procedentes de dos machos: 419 proteínas en los espermatozoides y 303 en el plasma seminal, de las cuales 111 proteínas fueron comunes a ambos, espermatozoides y plasma seminal. Dado que los bovinos y los cetáceos están relacionados evolutivamente y pertenecen al orden Cetartiodactyla, se comparó un conjunto de datos bovino con el de los delfines. Además, se incluyó en la comparación un modelo biológico humano y perros (cánidos), ya que su única glándula sexual accesoria es la próstata, al igual que en los delfines. El análisis reveló que 42 proteínas fueron identificadas en los espermatozoides de las cuatro especies y 30 en el plasma seminal de las mismas. El número de proteínas espermáticas coexistentes entre los animales fue el siguiente: (i) toro y delfín, 362; (ii) hombre y delfín, 375; y (iii) perro y delfín, 58. El número de proteínas del plasma seminal coexistentes fue: (i) toro y delfín, 218; (ii) hombre y delfín, 213; y (iii) perro y delfín, 51. Continuando con el análisis proteico, se realizó un perfil de proteínas tanto para los espermatozoides como para el plasma seminal. Para ello se realizó una anotación funcional de las proteínas de los espermatozoides de *Homo sapiens* utilizando el programa DAVID y se dividió en diferentes categorías: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares. Finalmente, se analizó la red de interacción proteína-proteína a través del programa STRING donde se identificaron un total de 266 nodos y 1.452 aristas en los espermatozoides de *Tursiops truncatus*, así como 201 nodos y 804 aristas en el plasma seminal para las redes de interacción proteína-proteína. En resumen, este estudio proporciona por primera vez en un cetáceo un inventario de proteínas presentes en el semen de delfín mular. Como se demuestra en la mayoría de las especies de mamíferos, el proteoma del semen en esta especie incluye proteínas esenciales para la estructura y función de los espermatozoides abriendo la puerta a futuros estudios destinados a investigar proteínas involucradas en la conservación del semen o que puedan utilizarse como biomarcadores de calidad y fertilidad espermática.

En resumen, este estudio ha abordado la caracterización del semen de delfín mular (*Tursiops truncatus*), una especie reconocida por su comportamiento social y amplia distribución en

mares y océanos, aunque amenazada por la acción humana y el cambio climático. Además de su hábitat natural, estos delfines son comunes en zoológicos y acuarios, lo que plantea desafíos de variabilidad genética en poblaciones en cautiverio, y, por tanto, se busca aplicar TRAs para su conservación y como biomodelo de otras especies de mamíferos acuáticos. Este estudio ha demostrado la viabilidad de la conservación a corto plazo del semen a temperaturas y concentraciones específicas, se han analizado las poblaciones espermáticas a través de sus características morfométricas, estableciendo correlaciones entre morfometría y niveles de testosterona. Finalmente, se han identificado proteínas en espermatozoides y plasma seminal, proporcionando valiosa información para comprender procesos reproductivos y mejorar las TRA, no solo para el delfín mular, sino también para otros cetáceos.

II. INTRODUCCIÓN

II. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 El mundo marino en la actualidad

Los mares y los océanos representan más del 70% de la superficie del planeta y suponen una de las principales reservas de biodiversidad. Se considera que constituyen más del 90% de los espacios habitables del planeta según el Objetivo 14 de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas, centrado en la vida submarina (Naciones, 2022) y en ellos se desarrollan organismos de todo tipo que ocupan nichos biológicos muy diversos en ecosistemas diferentes. Tanto es así que, en la actualidad, se conocen más de 226.000 especies marinas eucariotas, desde bacterias termófilas microscópicas capaces de desarrollarse en fosas oceánicas a miles de metros de profundidad, hasta cetáceos de 30 metros de longitud como la ballena azul, pero se estima que quedan tres cuartas partes de especies marinas existentes por describir (Appeltans et al., 2012).

De las 550 giga toneladas de carbono que cuantifican la biomasa global del planeta, los animales suman unas 2 giga toneladas. De estos, la mayoría son acuáticos, y dentro de este grupo encontramos a los cetáceos (Bar-On et al., 2018) que habitan en todos los mares y océanos del mundo (Fig. 1) (Pompa et al., 2011).

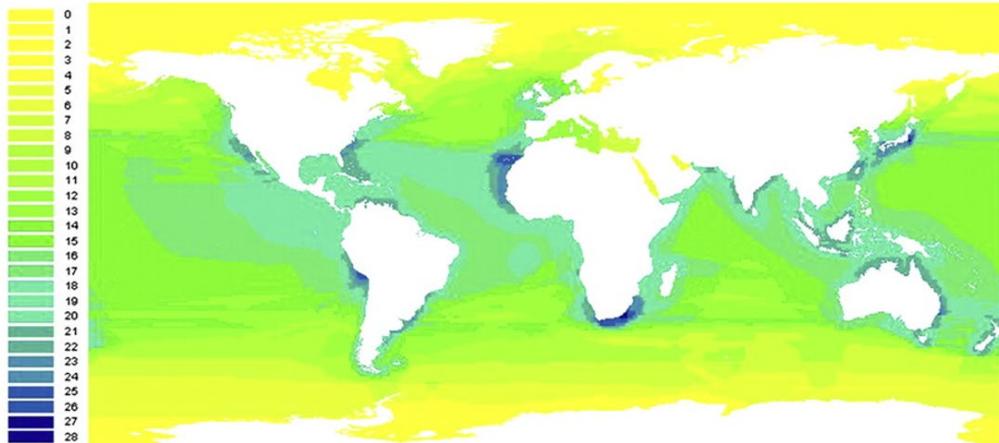


Figura 1. Mapa de distribución global de los cetáceos odontocetos. La leyenda numérica indica el número de especies de cetáceos odontocetos en cada área de color (Pompa et al., 2011).

Aunque los océanos presentan una elevada capacidad de amortiguación inherente a su volumetría, en las últimas décadas están sufriendo fuertes alteraciones debido a los crecientes impactos de origen antropogénico (López, 2012; Zhou et al., 2022). Estos cambios, tanto físicos como químicos, no son aleatorios y pueden reducir la viabilidad y riqueza de especies afectando al comportamiento de los organismos y, como resultado, comprometiendo la supervivencia de las especies más vulnerables (Luybaert et al., 2020).

1.2 Problemas de origen antropogénico

A pesar de su riqueza y su amplia distribución, los cetáceos constituyen un grupo de especies particularmente sensibles a las variaciones del medio (J. St. Aubin & Dierauf, 2001). Por ello, la acción constante e intensiva del hombre sobre los ecosistemas marinos está generando problemas a tantos niveles que, en algunos casos, ha provocado un declive en las poblaciones de mamíferos acuáticos, viéndose afectados el 80% de estos a nivel global (Bar-On et al., 2018) y con un considerable impacto en las especies del Mediterráneo (Bearzi et al., 2009). De entre las acciones que resultan perjudiciales para estos animales, podemos destacar las siguientes:

- Las aguas residuales y los vertidos tóxicos – Capaces de alterar drásticamente las condiciones fisicoquímicas de las aguas, impedir la visibilidad para los organismos e imposibilitar la respiración. A este tipo de vertidos hay que añadir las catástrofes medioambientales relacionadas con los escapes de fuel de las embarcaciones o de las plantas petrolíferas que derivan en mareas negras que acaban con la vida de miles de organismos. Además, los cetáceos son acumuladores de metales pesados como el mercurio, cobre, selenio o zinc (Arija, 2020), elementos que aparecen en elevadas concentraciones en los neonatos, lo que sugiere la existencia de un traspaso placentario de estos contaminantes (Storelli & Marcotrigiano, 2000).
- Las basuras, los plásticos y microplásticos – El excesivo vertido de basuras con el que los organismos deben coexistir afectan en todos los estratos del océano, debido a que sus diversas densidades y tamaños hacen que se puedan encontrar flotando en la superficie, sumergidos o depositados en el fondo marino. Mención aparte merecen los residuos de tipo plástico, cuya erosión mecánica desemboca en la generación de microplásticos. Los plásticos pueden ser ingeridos por confusión, adherirse a los animales y bloquear su movilidad, alterar su desarrollo habitual o incluso provocar su muerte. Pero los microplásticos suponen un problema mucho más grave debido a su reducido tamaño, ya que se integran involuntariamente a la red trófica, provocando intoxicaciones a gran escala (Gola et al., 2021). De hecho, se han encontrado altos niveles de tributilfosfato y triisopropilfenilfosfato (retardantes de llama empleados en la fabricación de plásticos) acumulados en el cerebro de los delfines, lo cual provoca daños irreparables en sus neuronas (Sala et al., 2019). Esta situación de intoxicación por componentes derivados del plástico es extensible para la especie humana, que en Europa consume 11.000 partículas de microplástico anualmente (Van Cauwenberghe & Janssen, 2014), lo que supone aproximadamente 5 gramos de plástico a la semana por consumidor (Dalberg Advisors et al., 2019). En este contexto, se prevé, como consecuencia directa de la existencia de “el séptimo continente”, un continente plástico que flota a la deriva en el Océano Pacífico (Gregoriotti et al., 2021), en el año 2050 haya más plásticos que peces en el mar.
- La contaminación acústica – La ecolocalización es una herramienta empleada por los cetáceos en la búsqueda de alimento, resultando fundamental en la comunicación intraespecífica y que explica las complejas relaciones sociales que existen en sus poblaciones (Janik, 2001). De hecho, estos animales desarrollan frecuentemente

nuevos sonidos o clics de ecolocalización, empleando estructuras específicas del cráneo y la mandíbula para favorecer la comunicación intraespecífica (Lauder & Shaffer, 1993). Actualmente se ha demostrado que existe un efecto negativo sobre la ecolocalización producido por las emisiones de sónar de las embarcaciones, ya que pueden actuar en frecuencias solapantes con las empleadas por los cetáceos. Como resultado de esto, algunos animales pueden llegar a desorientarse al confundir las señales emitidas por los sónares con las de sus propios congéneres (Vergara et al., 2021).

- La sobrepesca – La sobrepesca afecta principalmente al equilibrio entre predadores y presas. La disminución de presas en un determinado ecosistema puede provocar que los delfines, como depredadores, abandonen un área concreta y busquen nuevas zonas de caza para poder alimentarse (Bearzi et al., 2009). Pero esto no siempre es sencillo, de modo que, si no las encuentran, se produce una disminución del tamaño poblacional por insuficiencia de recursos. Además, la pesca provoca capturas accidentales de cetáceos, y en otras ocasiones, se produce matanza activa de animales depredadores para reducir la competencia con las pesquerías (Wells & Scott, 2018).
- El calentamiento global - El calentamiento global está provocando un aumento de la temperatura en aguas oceánicas cuya consecuencia directa es que los peces desarrollen su actividad en aguas más profundas ya que éstas poseen menor temperatura. Esta adaptación de los peces afecta directamente a depredadores pulmonados como los delfines, ya que encuentran su fuente de alimento a una mayor profundidad, lo cual supone un mayor dispendio energético y una adaptación de los mecanismos de buceo (Fahlman et al., 2021).

1.3 Conservación y protección de los cetáceos

Teniendo en cuenta todos los factores mencionados anteriormente y que los mamíferos marinos son especialmente sensibles a cambios en la composición y temperatura del agua (J. St. Aubin & Dierauf, 2001), no sorprende que se haya tenido que catalogar a determinadas especies en situación crítica o de vulnerabilidad. De hecho, de las 86 especies de cetáceos descritas a nivel mundial (Peter Harrison et al., 2009), catorce se encuentran en peligro grave de extinción y dos de ellas en peligro crítico (*Tabla 1*).

De las 40 especies de delfines conocidas, dos se encuentran en estado vulnerable, una en peligro de extinción y otra en peligro crítico de extinción. En el área del Mediterráneo aparecen tres catalogadas en estado de vulnerabilidad, entre las que se encuentra el delfín mular *Tursiops truncatus* (*Tabla 2*) (Gregorietti et al., 2021), especie que nos ocupa en esta tesis doctoral. De hecho, ya en 1979 se estableció un acuerdo internacional en la CMS (Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres) por el cual se clasificó a los delfines como “especie migratoria que debe ser objeto de acuerdos” y en 1982 el Convenio Europeo de Berna 82/72/CEE declaró al delfín mular, especie de fauna “estrictamente protegida” según la Secretaría de Estado de Medio Ambiente Dirección General de Sostenibilidad de la Costa y del Mar División para la Protección del Mar.

Además, desde 2017, el delfín mular se encuentra clasificado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) como vulnerable dentro del Apéndice II del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES); lo que limita el movimiento de estos animales entre países. Por ello su cuidado, vigilancia y conservación, tanto en medio salvaje como en zoológicos y acuarios, es imprescindible para asegurar el bienestar y el desarrollo de la especie.

Tabla 1. Resumen de las familias de cetáceos con el número de especies que aparece en las distintas clasificaciones de la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN en sus siglas en inglés) a lo largo de las últimas décadas. Para la familia Delphinidae, se encuentran en estado vulnerable el delfín de río Irawadi, y el delfín giboso atlántico, mientras que el delfín de Héctor se encuentra en peligro de extinción (Peter Harrison et al., 2009).

NOMBRE	NÚMERO ESPECIES	DATOS DEFICIENTES	MENOR PREOCUPACIÓN	CASI AMENAZADO	VULNERABLE	PELIGRO DE EXTINCIÓN	PELIGRO CRÍTICO
Suborden Mysticeti							
<i>Balaenidae</i> (Ballena franca)	4		2 (2008)			1 (2008)	1 (2020)
<i>Neobalaenidae</i> (Ballena franca pigmea)	1		1 (2018)				
<i>Eschrichtiidae</i> (Ballena gris)	1		1 (2008)				
<i>Balaenopteridae</i> (Rorcual)	8		3 (2018)	1 (2018)	1 (2018)	2 (2018)	1 (2021)
Suborden Odontoceti							
<i>Physeteriidae</i> (Cachalote)	1				1 (2008)		
<i>Kogiidae</i> (Cachalote pigmeo y enano)	2		2 (2020)				
<i>Platanistidae</i> (Delfín de río)	1					1 (2008)	
<i>Pontoporiidae</i> (Franciscana)	1				1 (2008)		
<i>Lipotidae</i> (Baiji)	1						1 (2008)
<i>Iniidae</i> (Delfín rosado del Amazonas)	1				1 (2018)		
<i>Monodontidae</i> (Beluga y Narval)	2		2 (2017)				
<i>Phocoenidae</i> (Marsopas)	7	2	3 (2020)		1 (2008)		1 (2008)
<i>Delphinidae</i> (Delfines excluyendo <i>Iniidae</i> , <i>Platanistidae</i> , <i>Pontoporiidae</i> , <i>Lipotidae</i>)	37	1	23 (2020)	5 (2019)	3 (2017)	4 (2020)	1 (2017)
<i>Ziphiidae</i> (Ballenas picudas)	24	8	12 (2022)	3 (2020)		1 (2020)	
Número total de especies	91	11	47	9	8	9	5

Tabla 2. Clasificación según el estado de las especies comunes de cetáceos que se encuentran en el Mar Mediterráneo (Notarbartolo Di Sciara & Birkun, 2010) modificada con datos actualizados de la UICN, año del mismo en paréntesis.

ESPECIE	NOMBRE COMÚN	CLASIFICACIÓN	ESTADO MEDITERRÁNEO	ESTADO GLOBAL
<i>Balaenoptera physalus</i>	Rorcual común del Atlántico norte	Mysticeti, Balaenopteridae	Vulnerable (2012)	Vulnerable (2010)
<i>Physeter macrocephalus</i>	Cachalote	Odontoceti, Physeteridae	En peligro (2012)	Vulnerable (2019)
<i>Ziphius cavirostris</i>	Zifio o ballenato de cuvier	Odontoceti, Ziphiidae	Datos deficientes (2012)	Sin preocupación (2020)
<i>Delphinus delphis</i>	Delfín común	Odontoceti, Delphinidae	En peligro (2012)	Sin preocupación (2021)
<i>Globicephala melas</i>	Calderón común	Odontoceti, Delphinidae	Datos deficientes (2012)	Sin preocupación (2018)
<i>Grampus griseus</i>	Calderón gris	Odontoceti, Delphinidae	Datos deficientes (2012)	Sin preocupación (2018)
<i>Orcinus orca</i>	Orca	Odontoceti, Delphinidae	Datos deficientes (2017)	Datos deficientes (2017)
<i>Stenella coeruleoalba</i>	Delfín listado	Odontoceti, Delphinidae	Vulnerable (2012)	Sin preocupación (2019)
<i>Steno bredanensis</i>	Delfín de hocico estrecho	Odontoceti, Delphinidae	Casi amenazado (2021)	Sin preocupación (2019)
<i>Tursiops truncatus</i>	Delfín nariz de botella o delfín común	Odontoceti, Delphinidae	Vulnerable (2012)	Sin preocupación (2019)
<i>Phocoena phocoena</i>	Marsopa común	Odontoceti, Phocoenidae	Vulnerable (2007)	Sin preocupación (2020)
<i>Phocoena relicta</i>	Marsopa del Mar Negro	Odontoceti, Phocoenidae	Vulnerable (2007)	En peligro (2008)

2. EL DELFÍN MULAR

2.1 Descripción de la especie

Los delfines (Orden *Cetartiodactyla*, Suborden *Cetacea*, Infraorden *Odontoceti*) siempre han despertado curiosidad en la especie humana desde las culturas clásicas griega y etrusca. De hecho, estos animales aparecen representados en numerosas pinturas, mosaicos y vasijas interactuando positivamente con los humanos. También tienen especial representación en la mitología griega, donde el dios Apolo se transforma en uno de ellos y el dios Poseidón es representado icónicamente junto a estos animales (Mazzoldi et al., 2019).

Los primeros estudios relacionados con estos animales se iniciaron, de hecho, en la Antigua Grecia. Se basaban fundamentalmente en la observación y disección de animales varados que Aristóteles describe en su obra "*Historia Animalium*", estableciendo las diferencias principales entre ballenas y delfines (Miller, 2016).

El delfín mular fue descrito originalmente como *Delphinus truncatus* por Montagu en 1821, pero no fue hasta 1855 cuando Gervais estableció el nombre que se mantiene en la actualidad: *Tursiops*, que significa "con forma de delfín y dientes truncados" (Arija, 2020). En un principio, el género *Tursiops* fue considerado monoespecífico, aunque debido a su polimorfismo, llegaron a describirse veinte taxones distintos (Hershkovitz, 1966; Rice, 1998). Sin embargo, finalmente se redujeron a dos especies dentro del género *Tursiops* (*T. truncatus* y *T. aduncus*), que mostraban diferencias morfológicas y genéticas entre ellas.

Con el paso del tiempo, el interés por conocer más sobre estos animales ha ido incrementándose, especialmente debido a su destacada inteligencia, por su amplia presencia en multitud de ecosistemas y por la adaptabilidad que presentan en los centros zoológicos (Hohn et al., 2001). Además, disponer de estos animales en un medio controlado ha permitido desarrollar numerosos estudios ecológicos, etológicos, fisiológicos y evolutivos extrapolables a otras especies de mamíferos marinos (Barratclough et al., 2019). Se considera por ello a *Tursiops truncatus* como una especie modelo para el grupo de los cetáceos.

2.2 Estudios en cautividad

A pesar de que se han conseguido desarrollar algunas tecnologías no invasivas para su estudio en mar abierto, como la colocación de Sistemas de Posicionamiento Global (GPS) (Durden et al., 2019), el seguimiento con drones (Cheney et al., 2022) y los modelos matemáticos (Marini et al., 2015), no todas las áreas de conocimiento pueden desarrollarse con ejemplares salvajes. De hecho, para el correcto desarrollo de algunas, se precisa de observaciones pormenorizadas sobre ejemplares criados en cautividad (Perrin et al., 2009), como por ejemplo, la obtención de muestras seminales y su evaluación (Fig. 2). Además, estos ensayos pueden contribuir de forma directa en la conservación de la especie y resultan imposibles de llevar a cabo en libertad con animales salvajes (Bowen, 1997; O'Brien and Robeck, 2010).

Por ello, los programas de cuidado y entrenamiento en centros zoológicos y acuarios resultan fundamentales para conocer en profundidad esta especie y desarrollar programas eficientes de conservación en cetáceos (Barratclough et al., 2019) incluyendo la cría en cautividad como una alternativa para evitar la extinción.



Figura 2. Lazo (a la izquierda) y Josué (a la derecha), machos de delfín mular que provienen del Zoo de Madrid y del acuario argentino Mar de Plata respectivamente. Desde 2003 comparten instalación en el Oceanogràfic de Valencia, cuyo delfinario cuenta con siete piscinas de 10,5 m de profundidad y 26 millones de litros de agua.

2.3 Distribución

El delfín mular es una especie cosmopolita que habita en todos los mares y océanos excepto en las aguas polares. Su distribución puede predecirse desde 1997 empleando modelos matemáticos geo-espaciales (Marini et al., 2015) en función de las corrientes marinas y el alimento asociado a ellas. Esta información resulta esencial para conocer, entender y profundizar en las particularidades de la estructura de sus poblaciones. No obstante, el fuerte impacto del tráfico marítimo puede alterar sus rutas naturales, por lo que se requieren estudios actualizados para determinar su distribución (Vassallo et al., 2020). La capacidad de desplazamiento y la dieta oportunista de los delfines, han permitido contrarrestar ligeramente los impactos negativos producidos por la sobrepesca sobre su hábitat (Bearzi et al., 2009).

Debido a su adaptabilidad, las poblaciones de delfines se han podido conservar, en mayor o menor medida, a nivel global (Fig. 1). De hecho, la UICN estimó en 2019 la población mundial de delfines mulares en 750.000 ejemplares (IUCN, 2023), distribuidos de manera global en todos los mares y océanos (incluyendo además en algunas áreas de agua dulce), y específicamente en el Mediterráneo se estimó la abundancia de estos animales en aproximadamente unos 10.000 ejemplares (Bearzi et al., 2009). No obstante, en 2023 esta especie se encuentra como de menor preocupación y con población desconocida (IUCN, 2021).

Por ello, la observación de patrones de desplazamiento junto al estudio poblacional relacionado con la reproducción de los distintos grupos, son puntos imprescindibles para tener actualizados los datos de esta especie.

3. REPRODUCCIÓN

Los delfines mulares alcanzan su madurez sexual de forma diferencial, dependiendo de factores ambientales (Wursig, 2001) y del sexo. Así pues, los machos requieren de 9 a 14 años (Jefferson, 2014) mientras que las hembras son ligeramente más precoces, alcanzando su madurez en un rango de 5 a 13 años (Cornell et al., 1987; Wells & Scott, 2018). A continuación, describiremos las características reproductivas de ambos sexos.

3.1 El aparato reproductor en las hembras

Externamente, las hembras de delfín mular presentan una hendidura genital cerrada que evita la inclusión de agua en el sistema genital (Cozzi et al., 2016) y, de forma homóloga, una hendidura anal que supone el límite del aparato excretor. Además, presentan dos hendiduras mamarias que protegen las mamas del animal (*Fig. 3*) y que permiten diferenciarlas de los machos.

Protegida por la hendidura vaginal se encuentra la vagina, que presenta la túnica mucosa vaginal. Esta mucosa se encuentra conformada por diversos pliegues musculares, que discurren desde la vagina hasta el cuello uterino (Harrison et al., 1969). Son exclusivos de los delfines y actúan como una barrera tremendamente eficaz para evitar la entrada de agua hacia el interior del útero (Cozzi et al., 2016).

El útero es bicornes, similar al de los rumiantes y presenta dos ovarios que, aun siendo funcionales, muestran una predominancia del ovario izquierdo (Harrison et al., 1969). Son hembras políestricas con ovulación espontánea (Schroeder, 1990), cuyo ciclo ovárico tiene una duración de 31-36 días (Robeck et al., 2018), seguidos de anestros o gestaciones y con ausencia de ciclo estral en edades avanzadas (Robeck et al., 2005; Dabin et al., 2008).

3.2 Aparato reproductor en machos

A diferencia de las hembras, los machos de delfín mular solo poseen dos hendiduras ventrales: la hendidura genital, más alargada, y la hendidura anal, más próxima a la aleta caudal. Esta característica permite diferenciar sexualmente a los individuos de ambos sexos (*Fig. 3*).

Poseen un par de testículos cilíndricos y alargados internos en la cavidad abdominal, concretamente en posición caudal con respecto a los riñones (Brook et al., 2000). El hecho de contener los órganos reproductores internamente favorece la hidrodinámica del animal, pero requiere de mecanismos específicos que mantengan la temperatura gonadal inferior a la corporal. De hecho, es indispensable que los testículos se mantengan 7°C por debajo de la temperatura corporal, que habitualmente es de 36.4-36.7°C (Harrison, 1949; Terasawa et al., 1999), para asegurar una correcta maduración de los espermatozoides (Hall, 2000). Para conseguir esta reducción de temperatura poseen un plexo arterio-venoso rodeando a los testículos con 20-40 vasos arteriales que derivan de la arteria aorta y llegan a las aletas caudal y dorsal, donde, gracias al intercambio de calor que se produce con el medio circundante, se

consigue disminuir la temperatura de la sangre antes de irrigar los testículos en 0.5-1.3°C respecto a otras regiones del colon, actuando así como un sistema muy efectivo de refrigeración (Pabst et al., 1995)(Fig. 4).

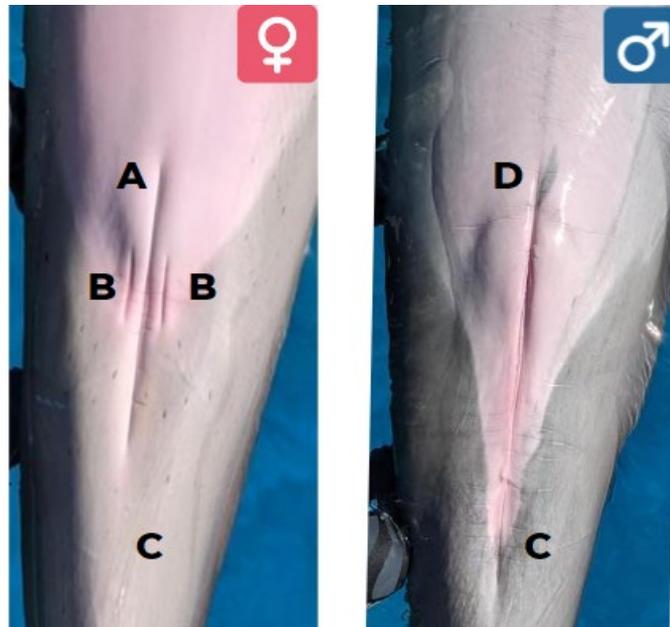


Figura 3. Comparativa entre los genitales externos de una hembra y un macho de delfín mular alojados en el Oceanogràfic de Valencia. La hembra (imagen izquierda) presenta cuatro hendiduras: (A) vaginal, (B) hendiduras mamarias y (C) hendidura anal. El macho (imagen derecha) únicamente presenta la hendidura genital (D) y la anal (C). Fotografía cedida por el Oceanogràfic de Valencia.

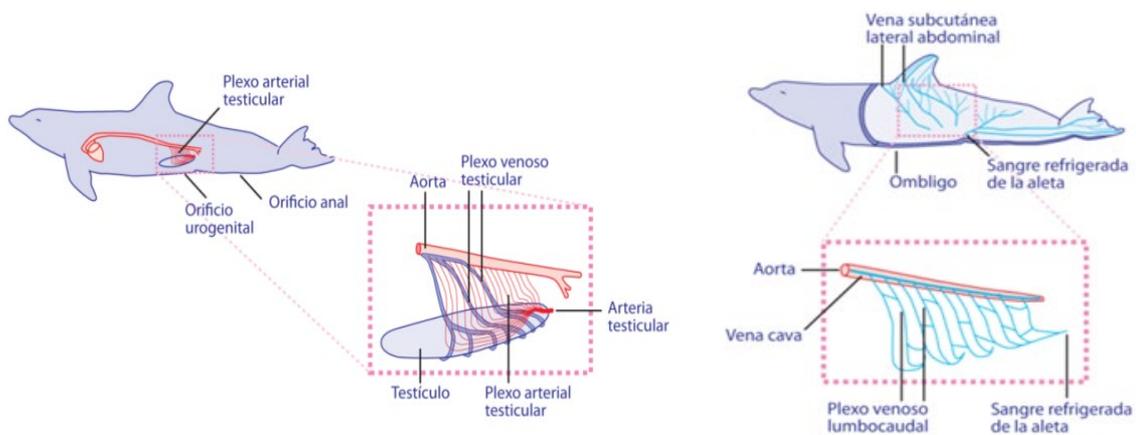


Figura 4. Representación del mecanismo de refrigeración testicular por intercambio de temperatura gracias al plexo venoso lumbo-caudal, que aporta flujo sanguíneo con una temperatura inferior a la corporal (36.4-36.7°C) ya que la aleta dorsal está en contacto directo con el agua, con la cual ejerce intercambio de calor. Figura original de (Rommel et al., 2007) y modificada por (Sánchez-Calabuig, 2014).

En los testículos se produce la síntesis de testosterona, hormona esteroidea responsable de la maduración espermática y sexual de los machos. Sus niveles en sangre permiten reconocer a los individuos reproductivos frente a los inmaduros en cetáceos, pero resultan mucho más discriminantes en la época de apareamiento, periodo durante el cual se ha observado que se incrementa considerablemente la concentración de esta hormona en algunas especies de cetáceos como en la marsopa de Dall (*Phocoenoides dalli*) (Temte, 1991), la beluga (*Delphinapterus leucas*) (Robeck et al., 2005), el delfín mular (*Tursiops truncatus*) (Katsumata et al., 2017), el calderón común (*Globicephala melas*) (Desportes et al., 1994) y la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) (Kjeld et al., 1992). De hecho, en delfín mular se han encontrado niveles de testosterona en machos adultos hasta 300 veces superiores a los detectados en machos sexualmente inmaduros (Sherman et al., 2021).

El epidídimo es una estructura elongada que se encuentra en la superficie dorsolateral a lo largo de toda la longitud de los testículos (Yuen et al., 2009) (Fig. 5). Además, en el epidídimo y en el conducto deferente se almacena gran cantidad de espermatozoides para dar respuesta a las elevadas cópulas de esta especie (Yuen, 2007) que emplean como estrategia reproductiva.

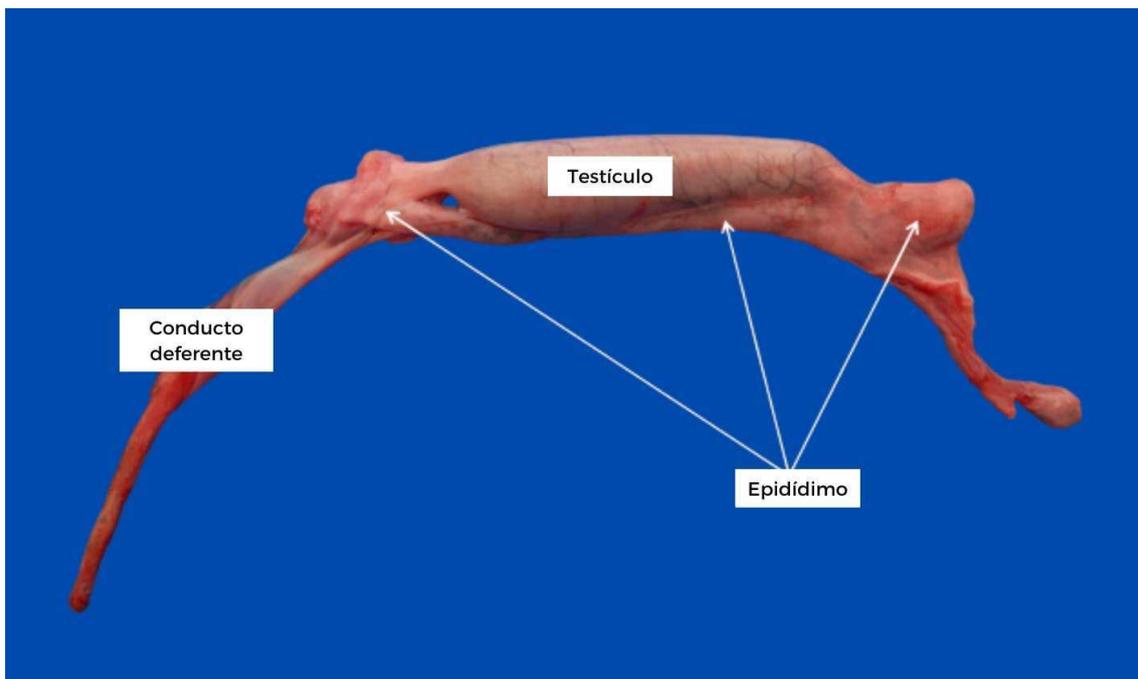


Figura 5. Fotografía de testículo y epidídimo de delfín mular donde se observa el testículo cilíndrico y alargado y el epidídimo como estructura elongada (Vitt & Caldwell, 2009).

Por último, mencionar que como glándula accesoria, los delfines, únicamente poseen próstata, y esta es relativamente grande en machos sexualmente maduros (Harrison et al., 1969). Sin embargo, cabe destacar que carecen de vesículas seminales tal y como ocurre en los perros (*Canis familiaris*). Dicha carencia imposibilita la coagulación del semen, por lo que éste no es lo

suficientemente denso para formar un tapón vaginal que limite o dificulte el acceso a eyaculados posteriores de otros machos en el tracto genital femenino. Así pues, los delfines han desarrollado otras estrategias para asegurar su paternidad, como adaptar la morfología de su apéndice copulador e incrementar al máximo el número de cópulas con las hembras. En relación al pene de delfín mular, es un órgano fibroelástico y retráctil que se encuentra en la cavidad abdominal, protegido por la hendidura genital, cuya rigidez se atribuye a la túnica albugínea que rodea al cuerpo cavernoso (Yuen, 2007). Dado que no se encuentra expuesto, el pene carece de prepucio (Brook, 1997) y posee una morfología relacionada con la estrategia reproductiva de esta especie.

3.3 Estrategia reproductiva

La estrategia reproductiva empleada en delfín es la promiscuidad poliginandria, donde machos y hembras se aparean con diversas parejas (Murphy et al., 2005). Por tanto, al no existir exclusividad de acceso a las hembras al macho más grande o fuerte, los delfines presentan monomorfismo sexual (Perrin et al., 2009) o lo que es lo mismo, la diferencia de tamaño perceptible entre sexos es irrelevante (De Francesco & Loy, 2016).

El modelo de apareamiento sugerido condiciona la estructura social de este grupo de cetáceos que presenta gran variabilidad (Gowans, 2019). Las hembras con estados reproductivos similares se organizan en grupos mono-sexuales con sus crías (Schroeder, 1990), mientras que los machos varían su comportamiento grupal, pudiendo ser este solitario (Reynolds et al., 2009) o en agrupaciones pequeñas que facilitan el acceso a las hembras reproductivas (Connor et al., 1992; Ermak et al., 2017). No obstante, el tamaño del grupo depende también de otros factores como el riesgo de depredación, la disponibilidad de alimento (Arija, 2020) y el tipo de agua donde vivan, llegándose a alcanzar grupos de hasta 1.000 ejemplares en aguas oceánicas (Scott & Chivers, 1990).

Por tanto, la ausencia de competencia física entre machos, y el acceso de cualquiera de ellos a las hembras reproductivas, deriva en la existencia de otras estrategias competitivas para asegurar la paternidad. La primera de ellas es la forma del pene, cuya forma de gancho, con la punta estrecha y cónica (*Fig. 6*) resulta un sistema eficaz para la retirada de depósitos seminales presentes en el tracto genital femenino procedentes de cópulas previas (Slijper, 2021). Así, cada macho no solo se encarga de depositar su eyaculado en la hembra, sino que trata de eliminar el semen presente de otros animales para incrementar su probabilidad de éxito reproductivo. En segundo lugar, debe producirse una competencia espermática en el tracto genital femenino (Parker, 1970), por lo que la producción de una elevada cantidad de semen de buena calidad, se convierte en una necesidad del individuo, que se encuentra directamente ligada a la concentración de testosterona (van der Horst et al., 2018), la cual además, está vinculada a la producción de espermatozoides con morfología normal (Schroeder & Keller, 1989).

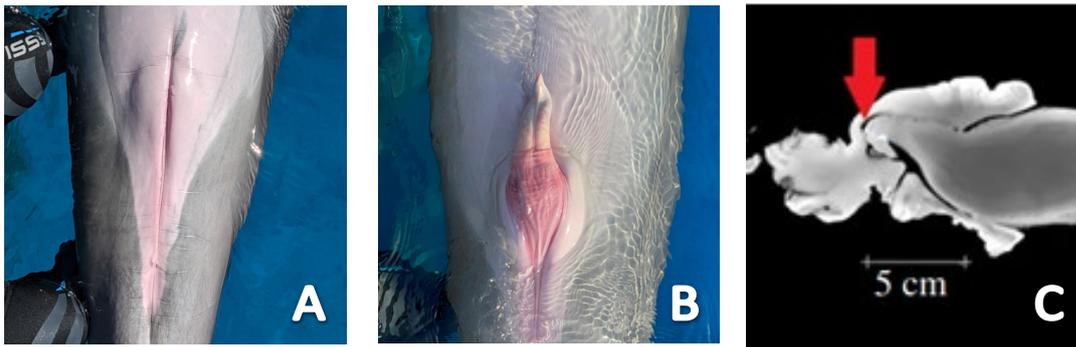


Figura 6. Aparato reproductor masculino. En la fotografía (A) se aprecia la hendidura genital abultada de un macho de delfín mular del Oceanogràfic de Valencia. En la fotografía (B) se observa el pene erecto que se encuentra totalmente extruido y en la imagen (C) se representa en reconstrucción de imagen computerizada en plano sagital 2D la zona de acople pene/vagina, señalado con flecha roja (Orbach et al., 2017).

Por último, la tercera estrategia reproductiva empleada por delfines es la de realizar el mayor número de copulas posibles con la hembra, habiéndose registrado hasta 12 consecutivas (Schroeder & Keller, 1989) para lo cual, la producción espermática debe ser elevada. Consecuencia directa de esta necesidad es el aumento testicular en proporción al tamaño corporal de estos animales (Kenagy & Trombulak, 1986) aumentando por tanto la capacidad de generar una elevada cantidad de espermatozoides de calidad. Esto proporciona una ventaja sobre el resto de machos reproductores, por lo que se observan diferencias en los tamaños testiculares según la época del año, coincidiendo con un incremento de éstos en la época reproductiva (Murphy et al., 2005), así como entre machos maduros e inmaduros, siendo el tamaño testicular en los primeros hasta 60 veces superior (Sherman et al., 2021).

4. EL ESPERMATOZOIDE DEL DELFÍN MULAR

4.1 Estructura del espermatozoide

A pesar de que el espermatozoide, como célula reproductiva, lleva estudiándose en numerosas especies desde su descubrimiento por parte de Leeuwenhokeen 1677, no fue hasta 1981 cuando se obtuvo la primera descripción científica completa del espermatozoide de delfín mular (Fleming et al., 1981). La descripción más actualizada hasta el momento data de 2018 y establece la longitud media total del espermatozoide de delfín mular en $65 \mu\text{m}$ (Fleming et al., 1981; van der Horst et al., 2018) constando de tres partes: cabeza, cuello y flagelo. Este último se divide a su vez en pieza principal, intermedia y final (Fig. 7).

La cabeza tiene alrededor de $4.7\text{-}5 \mu\text{m}$ de longitud (van der Horst et al., 2018a) y se divide en dos regiones, la región acrosomal y la post-acrosomal. El acrosoma contiene proteínas de reconocimiento celular involucradas en la interacción espermatozoide-ovocito, pero además también alberga enzimas hidrolíticas capaces de favorecer la penetración de la cabeza del espermatozoide al interior del óvulo (Fleming et al., 1981). Por otra parte, la región post-

acrosomal presenta unos surcos engrosados que discurren longitudinalmente desde el acrosoma al flagelo (*Fig. 7*) que no han sido descritos hasta la fecha en ninguna otra especie (Fleming et al., 1981; Kita et al., 2001; Meisner et al., 2005). Parece que estas estructuras podrían desempeñar algún tipo de papel en la fusión espermatozoide-ovocito (Fleming et al., 1981), así como en el reconocimiento espermatozoide-ovocito (Robles-Gómez et al., 2020), pero se desconoce su función real. Internamente, la cabeza contiene en su núcleo el material genético hipercondensado, gracias a la presencia de proteínas del tipo histonas que mantienen compacta su estructura.

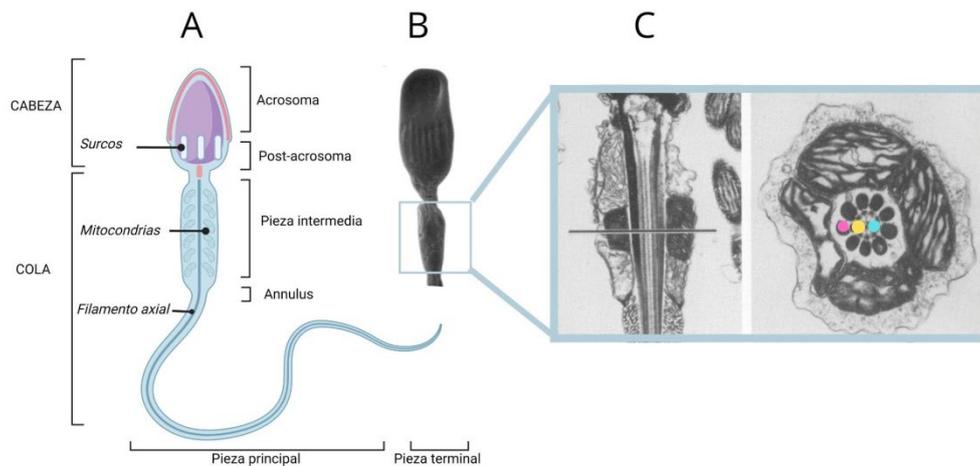


Figura 7. El espermatozoide de delfín mular (T. truncatus). (A): Representación esquemática del espermatozoide de delfín mular, donde se indica la existencia de surcos en la región post-acrosomal (realizado con Biorender). (B): Fotografía de microscopía electrónica del espermatozoide de delfín mular. (C): Corte histológico longitudinal (a la izquierda, 18.000x) y transversal (a la derecha, 38.000x) de la pieza intermedia de un espermatozoide de delfín mular. Se observan las mitocondrias dispuestas rodeando las fibras densas, marcadas con un punto magenta, que a su vez rodean los 9 pares de microtúbulos marcados con punto amarillo y a los centrales, marcados en azul (Fleming et al., 1981).

La pieza intermedia mide aproximadamente $3.5 \mu\text{m}$ (van der Horst et al., 2018a) y es la conexión entre la cabeza y el flagelo. En ella se encuentran las mitocondrias (*Fig. 7*), cuya función es dotar al espermatozoide de la energía necesaria para llevar a cabo su movimiento. Estas han sufrido modificaciones evolutivas para adaptarse al cambio de obtención de energía, debido a los cambios dietéticos que ha sufrido esta especie (Derous et al., 2021) ya que el ancestro terrestre herbívoro obtenía la energía mitocondrial a partir de carbohidratos, pero los cetáceos actuales, cuya dieta se basa en pescado rico en Omega 3, obtienen la energía mitocondrial únicamente a partir de la *B-oxidación* de ácidos grasos, siendo la obtención de energía más efectiva que a partir de carbohidratos (Alves et al., 2021).

Según van der Horst (van der Horst et al., 2018) el flagelo, responsable directo del desplazamiento de los espermatozoides, mide alrededor de $60 \mu\text{m}$ de longitud. Puede dividirse en diferentes regiones que comparten estructura interna, pero difieren en su estructura

externa (Enciso et al., 2009). En primer lugar, el *annulus* separa el cuello o pieza intermedia del inicio del flagelo. Este *annulus*, recibe también el nombre de “anillo de Jensen” (Miller et al., 2002). Internamente, a lo largo del flagelo se prolonga un axonema central compuesto por microtúbulos dispuestos en una estructura denominada 9+2, con 9 microtúbulos perimetrales y dos centrales (Fig. 7) y, alrededor de esta estructura, se encuentran las fibras densas externas. La parte final del flagelo, llamada pieza terminal, contiene los dobletes del axonema, el final de las fibras densas y la capa fibrosa (Fleming et al., 1981; van der Horst et al., 2018).

4.2 Sistemas de evaluación del eyaculado de delfín y del espermatozoide

En los primeros estudios realizados se evaluaban parámetros básicos, como el volumen del eyaculado y la morfología espermática (Fleming et al., 1981), que posteriormente se han complementado con otros factores, estudiados en profundidad en otras especies, los cuales proporcionan información relevante sobre la calidad de la muestra espermática. En primer lugar, se realiza un análisis visual para valorar las características básicas macroscópicas del eyaculado, como son el volumen, el pH, la osmolaridad y el aspecto. Una vez concluido este, se realiza el análisis microscópico en el que se evalúan algunas características del eyaculado como concentración de espermatozoides por mililitro, la concentración de espermatozoides totales en la muestra recogida, y otras características espermáticas como son la motilidad, morfología y viabilidad de los espermatozoides. Para considerar una muestra óptima para la reproducción, es necesario que los parámetros obtenidos se ajusten a los valores medios obtenidos para esta especie (Tabla 3).

Tabla 3. Calidad espermática en delfín mular evaluada por diversos autores. (-) indica que los valores no han sido determinados en el estudio.

Artículo	pH	Volumen (ml)	Concentración (spz $\times 10^6$ /ml)	Motilidad progresiva (%)	Viabilidad (%)	Morfología (normales)
Robles et al., 2020	8,25 \pm 0,25	32,5 \pm 12,5	350 \pm 100	75 \pm 15	87,5 \pm 0,5	-
Sánchez-Calabuig et al., 2015	7,9 \pm 0,04	-	-	67 \pm 1,37	86,28 \pm 0,76	78,8 \pm 0,51
O'Brien & Robeck, 2004	7,6 \pm 0,1	18,2 \pm 9,8	372,5 \pm 219,8	95,9 \pm 1,4	88,2 \pm 7,0	96,0 \pm 2,0
O'Brien & Robeck, 2006	-	25,5 \pm 17,5	778,7 \pm 436,5	86,9 \pm 3,9	88,1 \pm 4,2	-
Seager, 1981	-	-	1890	85	-	-
Fleming et al., 1981	-	18	-	-	-	>90%

En los últimos años, se han incorporado a los análisis rutinarios nuevas técnicas de evaluación de la calidad espermática para delfines, como el análisis de fragmentación de ADN, que puede realizarse mediante las pruebas de dispersión de cromatina (*Sperm Chromatin Dispersion, SCD assay*) o test cometa (Montano et al., 2012; Sánchez-Calabuig et al., 2014). El test SCD se realiza como prueba complementaria al espermiograma, induciendo la descondensación de cromosomas, para conseguir que el ADN se descondense. Como resultado, las células que poseen el ADN correctamente empaquetado producen halos de dispersión grandes, mientras que los que tienen el ADN fragmentado, generan halos visiblemente menores (Sánchez-Calabuig et al., 2013).

Además, se están realizando otras investigaciones para aportar más información sobre cómo funcionan los espermatozoides en el tracto reproductivo y cómo estos cambios pueden influir en la competencia espermática. De hecho, el estudio realizado por Robles-Gómez (Robles-Gómez et al., 2020) sobre los cambios sufridos en el glicocálix tras el proceso de capacitación usando lectinas con diferentes afinidades por sacáridos y evaluadas con microscopía fluorescente ha demostrado, no sólo la existencia de distintas subpoblaciones espermáticas intra- e inter-individuo, sino también que las glicoproteínas de espermatozoides de delfín mular presentan similitudes en el patrón de distribución con las glicoproteínas encontradas en cánidos (Bains et al., 1993). Esto refuerza la similitud entre espermatozoides de estas dos especies, que puede ser debido a que ambas especies carecen de vesículas seminales (Harrison et al., 1969; Bains et al., 1993).

Con la aparición y desarrollo de los Sistemas CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*), se ha podido evaluar de manera objetiva numerosos parámetros, como la motilidad y otros parámetros cinéticos, para lo cual hasta los años 80 se contaba únicamente con datos derivados de la observación a través del microscopio. Esto supone un gran avance, puesto que en vez de tener unas cifras subjetivas de la velocidad media de los espermatozoides se obtienen parámetros tan precisos como la trayectoria de nado, la velocidad y la frecuencia de batida de la cola de manera objetiva. Estos sistemas informatizados, además, han ayudado al estudio de la morfometría celular, pudiendo obtener numerosas fotografías para medir a través de distintos algoritmos, el tamaño y la forma de los espermatozoides de distintas especies (Amann & Waberski, 2014). La batería de datos obtenidos con estos sistemas informáticos permite identificar las distintas subpoblaciones espermáticas que coexisten dentro de la misma muestra seminal de las especies animales para las que se ha desarrollado cada programa (Abaigar et al., 1999; Quintero-Moreno et al., 2004). Cabe especificar, que aunque no hay un sistema informático concreto para los espermatozoides de delfín, la plasticidad del programa hace que una vez obtenidos los parámetros medios por otras técnicas, se pueda añadir al sistema y obtener cálculos rápidos y concisos sobre cualquier muestra espermática de estos animales.

Por último, se están incorporando otros análisis más específicos para evaluar la calidad espermática, como la fecundación heteróloga de semen de delfín en ovocitos bovinos (Sánchez-Calabuig et al., 2012) puesto que la capacidad del espermatozoide de unirse a la zona pelúcida, ayuda a predecir el éxito reproductivo de la muestra espermática (Sánchez-Calabuig et al., 2012). Además, los análisis de proteínas en el semen realizados en otras especies animales donde los perfiles proteicos están ampliamente estudiados, se emplean como biomarcadores tanto de la fertilidad del semen en fresco (Li et al., 2016; Druart et al., 2019), como de la capacidad de resistencia a los procesos de criopreservación (Soleilhavoup et al., 2014; Parrilla et al., 2019; De Lazari et al., 2020). Estos estudios no se han desarrollado en ningún cetáceo por el momento y pueden resultar de interés para conocer más acerca de la fisiología de las especies, como en la mejora de la conservación de muestras seminales para su posterior aplicación en técnicas de reproducción asistida.

5. TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA APLICADAS EN EL DELFÍN MULAR

5.1 Métodos de preservación espermática

En delfín mular, el desarrollo de técnicas de preservación espermática se ha hecho necesario para evolucionar en la conservación reproductiva de la especie (Katsumata, 2010), ya que el intercambio genético entre zoológicos y acuarios es imprescindible para evitar la consanguinidad dentro de las poblaciones de un mismo recinto. Con el objetivo de poder desplazar las muestras espermáticas, y gracias al trabajo de entrenamiento por parte de los cuidadores de estos mamíferos marinos, actualmente la obtención de muestras es un proceso no invasivo (Schroeder & Keller, 1989; Yuen et al., 2009) que ha permitido avanzar en el conocimiento de manejo de material celular reproductivo. Por tanto, en los últimos años, se han desarrollado diversos protocolos de extracción, evaluación, refrigeración, congelación y transporte de estas muestras biológicas (Robeck & O'Brien, 2004; Robeck et al., 2013; Takenaka et al., 2013; Sánchez-Calabuig et al., 2015, 2017; Beirão et al., 2019).

Además, gracias al avance de estas técnicas, se han realizado varios estudios para evaluar los efectos del proceso de criopreservación sobre muestras de delfín mular. El primer método de criopreservación para esta especie descrito fue depositar pellets en hielo seco empleando glicerol como crioprotector al que se le añadió, además, yema de huevo y lactosa (Seager, 1981). Posteriormente la técnica ha ido evolucionando y se ha indagado sobre la mejora del protocolo de criopreservación, de hecho, en un estudio de 2004 (Robeck & O'Brien, 2004), se evaluaron diferentes crioprotectores a distintas concentraciones, así como el efecto de distintos volúmenes para su conservación. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron un mejor índice de motilidad espermática en las muestras post-congelación a 4°C y una mayor resistencia a la descongelación en las muestras con una concentración estándar, respecto a las que tenían una baja concentración. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes volúmenes de almacenaje empleados. A pesar de estos avances en el protocolo, todos los diluyentes empleados en el estudio contenían yema de huevo que, aunque proporciona un alto potencial protector frente a las bajas temperaturas, presenta riesgo de transmisión de patógenos (Sánchez-Calabuig, 2014). Por ello, en estudios posteriores se evaluaron otros diluyentes como el LP1, a base de lípidos vegetales y sin yema de huevo (Pérez-Garnelo et al., 2006), así como el HSPM elaborado a base de distintos azúcares y glicerol (Mahadevan & Trounson, 1983). Ambos resultaron ser eficaces proporcionando una mejor protección del acrosoma y de la membrana que otros con base de yema de huevo, como el TES-TRIS-Fructosa (Sánchez-Calabuig et al., 2015). No obstante, aunque los resultados post-congelación fueron mejores en las primeras horas, las muestras preservadas en LP1 presentaron mayor fragmentación de ADN tras 24 y 48 h de incubación que las que fueron congeladas en TES-TRIS-fructosa o HSPM (Sánchez-Calabuig et al., 2015).

Por otra parte, se ha desarrollado la técnica de vitrificación espermática, la cual consiste en congelar las muestras celulares a elevada velocidad, impidiendo por tanto la formación de cristales de hielo intracelulares. Sin embargo, los datos obtenidos demuestran que para delfines, resulta más óptima la técnica convencional de criopreservación, donde la

deshidratación celular es gradual, frente a la realización del procedimiento de manera ultrarrápida (O'Brien et al., 2019).

Por todo ello, se valora como técnica alternativa tanto a la criopreservación ultrarrápida como lenta, la refrigeración espermática. Esta consiste en un enfriamiento secuencial de las muestras, previamente diluidas en un agente protector que actúa de tampón, empleando rampas de enfriamiento, mediante las cuales se reduce la temperatura a un ritmo constante consiguiendo la inactivación progresiva de las células. Este proceso aporta una mejoría notable tanto en el coste económico de la técnica como en el tiempo empleado en la preparación de la muestra, ya que el proceso es más sencillo que el de criopreservación. Para ello se han realizado algunos estudios en delfín mular, cuyos resultados concluyen que el transporte de semen refrigerado de esta especie es factible al menos durante las primeras 24-48 h. , en las que la cromatina permanece estable (Sánchez-Calabuig et al., 2013); no obstante el impacto de la refrigeración por un periodo más largo, todavía no ha sido estudiado.

5.2 Inseminación artificial (IA)

Se conoce que el movimiento de animales entre zoológicos entraña un riesgo para los animales (O'Brien & Robeck, 2010) y, además, la normativa vigente es estricta a este respecto. De hecho, las directrices recogidas en la "Ley de Bienestar Animal" que se encuentra dentro del borrador del Plan Estratégico del Patrimonio Natural y la Biodiversidad a 2030, incide en la posibilidad de que a partir de 2023 quede prohibida la cría o movimiento de ejemplares de cetáceos entre centros. Por ello, se hace imprescindible tanto el desarrollo de la técnica de refrigeración espermática para la Inseminación Artificial (IA) a corto plazo, como el estudio profundo de las características básicas del semen de delfín para la conservación espermática a largo plazo, siendo ambos puntos clave para la conservación de las diversas especies de cetáceos (Robeck & O'Brien, 2004; O'Brien & Robeck, 2010; Montano et al., 2011).

Es importante, por tanto, tener el control sobre dos factores: la calidad espermática, que suele ser más elevada en semen fresco que en muestras congeladas; y el ciclo estral de las hembras, siendo este último el factor más influyente en el éxito final del proceso reproductivo. Para conseguir una regulación del ciclo estral en hembras, puede emplearse progestágeno durante 20 días (Robeck et al., 2013). Una vez sincronizadas las hembras, se precisa monitorizar la actividad ovárica mediante ecografía y/o análisis de orina para detección de hormona LH , lo que resulta imprescindible para conocer el momento de ciclo estral y poder realizar así la IA en el momento adecuado para que esta resulte efectiva (Robeck et al., 2005), siendo el momento idóneo para la inseminación es 20 h después del pico de LH y 8 horas antes de la ovulación (Robeck et al., 2013). Para proceder a la inserción del semen en el tracto vaginal, las hembras son pre-medicadas con diazepam y colocadas en posición decúbito lateral para permanecer en contacto con el agua durante el procedimiento. En este procedimiento se emplea un endoscopio de 9-11 mm de diámetro y 190-250 cm de longitud (Robeck et al., 2005) para localizar el pliegue de la espermateca, para lo que, además, se puede insuflar aire en la vagina (Robeck et al., 1994). Una vez localizado el punto donde depositar el semen, se avanza con el catéter cargado con la dosis seminal a través del endoscopio que sirve de guía, hasta alcanzar

los cuernos, depositando la mitad de dosis en cada uno (Robeck et al., 2005, 2013). Aunque la primera IA realizada en 1989 por Schroeder y Keller (Schroeder & Keller, 1989) no obtuvo éxito, posteriormente, gracias al estudio y perfeccionamiento de la técnica, se consiguieron gestaciones con dosis de 2×10^6 de espermatozoides móviles progresivos (Robeck et al., 2005) siendo la tasa promedio de éxito para la técnica con semen congelado de entre el 65% (Perrin et al., 2009) y el 71% (Robeck et al., 2005).

5.4 Sexaje espermático

La técnica habitualmente empleada para realizar sexaje espermático en delfín mular es la citometría de flujo. La separación de espermatozoides se basa en que los portadores del cromosoma X contienen un $3,98 \pm 0,04\%$ más ADN que los Y, diferencia detectable por fluorescencia, lo que permite separar las células en función del sexo (O'Brien & Robeck, 2006).

Aun así, el sexaje es una técnica costosa ya que requiere de laboratorios con maquinaria específica y personal altamente cualificado para su manejo. Además, el daño celular asociado debido a los numerosos factores vinculados al estrés mecánico, como son la interacción de ADN con fluorocromos, la exposición al láser, la separación de los espermatozoides en microgotas y el estrés mecánico que se produce al hacer pasar las células a través del citómetro de flujo, hacen que la muestra de semen se vea dañada y, por tanto, la efectividad del proceso sea inferior a la deseada (Gonsálvez et al. 2011).

No obstante, a pesar de las limitaciones de la técnica, su uso en algunas especies se hace necesario debido a la necesidad de realizar programas de reproducción asistida dirigidos, como puede ser en ciertos cetáceos y/o especies amenazadas. Además, en delfines cobra especial importancia, puesto que en medio controlado, el ratio total de hembras es importante para mantener la estabilidad grupal, minimizar las agresiones entre machos y conseguir una propagación más rápida de la especie (O'Brien et al., 2009). De hecho, la primera cría de delfín nacida empleando esta técnica se remonta al año 2005 en el acuario SeaWorld San Diego (O'Brien & Robeck, 2006) y apenas unos años después, se consiguió una cría a partir de semen congelado, descongelado, sexado, recongelado y descongelado (O'Brien et al., 2009). Esto ha sido posible gracias a que el acrosoma de los delfines tiene elevada resistencia a los procesos de sexaje, resultando únicamente un 15% de acrosomas dañados en dichos procesos (Robeck & O'Brien, 2004, 2006).

En cuanto a la efectividad del proceso, se estima que el tiempo empleado para obtener una dosis de semen sexado a partir de semen descongelado, óptima para la IA (de al menos 200×10^6 spz/ml de espermatozoides progresivos) es de 35 horas (O'Brien et al., 2009). Actualmente se ha conseguido reducir este tiempo a 5 horas gracias a las mejoras en la técnica de sexaje y al perfeccionamiento de inseminaciones, lo que ha permitido el éxito reproductivo de dosis a bajas concentraciones (50×10^6 spz/ml espermatozoides progresivos) (Montano et al., 2011), lo que abre un nuevo campo en la reproducción asistida para esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Abaigar, T., Holt, W. V., Harrison, R. A. P., and Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32–41. doi:10.1095/biolreprod60.1.32.
- Alves, L. Q., Ruivo, R., Valente, R., Fonseca, M. M., Machado, A. M., Plön, S., et al. (2021). A drastic shift in the energetic landscape of toothed whale sperm cells. *Curr. Biol.* 31, 3648–3655.e9. doi:10.1016/j.cub.2021.05.062.
- Amann, R. P., and Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81, 5–17.e3. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004.
- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., et al. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Curr. Biol.* 22, 2189–2202. doi:10.1016/j.cub.2012.09.036.
- Arija, C. (2020). Delfín mular común - *Tursiops truncatus*. *Encicl. Virtual los Vertebr. Españoles*, 1–39. Available at: <http://www.vertebradosibericos.org-http://dx.doi.org/10.20350/digitalCSIC/12621>.
- Bains, H. K., Pabst, M. A., and Bawa, S. R. (1993). Changes in the lectin binding sites on the testicular, epididymal, vas, and ejaculated spermatozoon surface of dog. *Andrologia* 25, 19–24. doi:10.1111/j.1439-0272.1993.tb02676.x.
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 6506–6511. doi:10.1073/pnas.1711842115.
- Barratclough, A., Wells, R. S., Schwacke, L. H., Rowles, T. K., Gomez, F. M., Fauquier, D. A., et al. (2019). Health Assessments of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Past, Present, and Potential Conservation Applications. *Front. Vet. Sci.* 6. doi:10.3389/fvets.2019.00444.
- Bearzi, G., Fortuna, C. M., and Reeves, R. R. (2009). Ecology and conservation of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea. *Mamm. Rev.* 39, 92–123. doi:10.1111/j.1365-2907.2008.00133.x.
- Beirão, J., Boulais, M., Gallego, V., O'Brien, J. K., Peixoto, S., Robeck, T. R., et al. (2019). Sperm handling in aquatic animals for artificial reproduction. *Theriogenology* 133, 161–178. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.004.
- Bianucci, G., and Landini, W. (2016). “Fossil History,” in *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea: Whales, Dolphins and Porpoises*, 35–94. doi:10.1201/b11001-5.
- Bowen, W. D. (1997). Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 267–274. doi:10.3354/meps158267.
- Brook, F. M. (1997). The Use of Diagnostic Ultrasound in Assessment of the Reproductive Status of the Bottlenose Dolphin, *Tursiops aduncas*, in Captivity & Applications in Management of a Controlled Breeding Programme. Doctoral Thesis, The Hong Kong Polytechnic University, Pao Yue-kong Library.
- Brook, F. M., Kinoshita, R., Brown, B., and Metreweli, C. (2000). Ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus aduncas*. *J.*

- Reprod. Fertil.* 119, 233–240. doi:10.1530/jrf.0.1190233.
- Cheney, B. J., Dale, J., Thompson, P. M., and Quick, N. J. (2022) Spy in the sky: a method to identify pregnant small cetaceans. *Remote Sens. Ecol. Conserv.* 8, 492–505. doi: 10.1002/rse2.258.
- Connor, R. C., Smolker, R. A., and Richards, A. F. (1992). “Dolphin Alliances and Coalitions,” in *Coalitions and Alliances in Humans and Other Animals*, 415–443. ISBN:0198542739.
- Cornell, L. H., Asper, E. D., Antrim, J. E., Searles, S. S., Young, W. G., and Goff, T. (1987). Progress report: Results of a long-range captive breeding program for the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus* and *Tursiops truncatus gilli*. *Zoo Biol.* 6, 41–53. doi:10.1002/zoo.1430060106.
- Cozzi, B., Huggenberger, S., and Oelschläger, H. (2016). *Anatomy of dolphins: Insights into body structure and function*, 1–438. ISBN: 9780124072299
- Curry, M. R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5, 46–52. doi:10.1530/ror.0.0050046.
- Dabin, W., Cossais, F., Pierce, G. J., and Ridoux, V. (2008). Do ovarian scars persist with age in all Cetaceans: New insight from the short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis* Linnaeus, 1758). *Mar. Biol.* 156, 127–139. doi:10.1007/s00227-008-1070-4.
- Dalberg Advisors, de Wit, W., and Bigaud, N. (2019). No Plastic In Nature: Assessing plastic ingestion from nature to people (AN ANALYSIS for WWF), 7. ISBN: 9782940529957.
- De Francesco, M. C., and Loy, A. (2016). Intra- and interspecific interactions as proximate determinants of sexual dimorphism and allometric trajectories in the bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (cetacea, odontoceti, delphinidae). *PLoS One* 11. doi:10.1371/journal.pone.0164287.
- De Lazari, F. L., Sontag, E. R., Schneider, A., Araripe Moura, A. A., Vasconcelos, F. R., Nagano, C. S., et al. (2020). Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C. *Theriogenology* 147, 135–145. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023.
- Derous, D., Sahu, J., Douglas, A., Lusseau, D., and Wenzel, M. (2021). Comparative genomics of cetartiodactyla: Energy metabolism underpins the transition to an aquatic lifestyle. *Conserv. Physiol.* 9 (1), coaa136. doi:10.1093/conphys/coaa136.
- Desportes, G., Saboureau, M., and Lacroix, A. (1994). Growth-related changes in testicular mass and plasma testosterone concentrations in long-finned pilot whales, *Globicephala melas*. *J. Reprod. Fertil.* 102, 237–244. doi:10.1530/jrf.0.1020237.
- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., and de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* 137, 30–35. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.034.
- Durden, W. N., O’Corry-Crowe, G., Shippee, S., Jablonski, T., Rodgers, S., Mazzoil, M., et al. (2019). Small-scale movement patterns, activity budgets, and association patterns of radio-tagged Indian River Lagoon bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Aquatic Mammals*, 45 (1), 66–87. doi:10.1578/AM.45.1.2019.66
- Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., and Gosálvez, J. (2009). A two-tailed Comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 18, 609–616. doi:10.1016/S1472-6483(10)60003-X.
- Ermak, J., Brightwell, K., and Gibson, Q. (2017). Multi-level dolphin alliances in northeastern

- Florida offer comparative insight into pressures shaping alliance formation. *J. Mammal.* 98, 1096–1104. doi:10.1093/jmammal/gyx053.
- Fahlman, A., Brodsky, M., Rocho-Levine, J., Garcia-Parraga, D., Ivančić, M., Camarena, C., et al. (2021). Respiratory changes in stranded bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 52, 49–56. doi:10.1638/2020-0033.
- Fleming, A. D., Yanagimachi, R., and Yanagimachi, H. (1981). Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *J. Reprod. Fertil.* 63, 509–514. doi:10.1530/jrf.0.0630509.
- Gola, D., Kumar Tyagi, P., Arya, A., Chauhan, N., Agarwal, M., Singh, S. K., et al. (2021). The impact of microplastics on marine environment: A review. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* 16, 100552. doi:10.1016/j.enmm.2021.100552.
- Gosálvez, J., Ramirez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K. M., Kjelland, M. E., et al. (2011). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology* 75, 197–205. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.08.006.
- Gowans, S. (2019). “Grouping Behaviors of Dolphins and Other Toothed Whales,” in, 3–24. doi:10.1007/978-3-030-16663-2_1.
- Gregoriotti, M., Atzori, F., Carosso, L., Frau, F., Pellegrino, G., Sarà, G., et al. (2021). Cetacean presence and distribution in the central Mediterranean Sea and potential risks deriving from plastic pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 173 (B). doi:10.1016/j.marpolbul.2021.112943.
- Hall, A. (2000). Biology of Marine Mammals Edited by John E. Reynolds III and Sentel A. Rommel viii + 578 pp., 187 figs., 27.7 × 21.5 × 3.8 cm, ISBN 1 56098 375 2 hardback, Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1999. *Environ. Conserv.* 27, 312–322. doi:10.1017/s0376892900290358.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., and Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J. Androl.* 11, 73–88. doi:10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x.
- Harrison, R. G. (1949). The comparative anatomy of the blood-supply of the mammalian testis. *Proc. Zool. Soc. London* 119 (2), 325–344. doi:10.1111/j.1096-3642.1949.tb00882.x.
- Harrison, R. J., Boice, R. C., and Brownell, R. L. (1969). Reproduction in wild and captive dolphins. *Nature* 222, 1143–1147. doi:10.1038/2221143b0.
- Hershkovitz, P. (1966). Catalog of Living Whales. *Bull. United States Natl. Museum*, 1–259. doi:10.5479/si.03629236.246.
- Hohn, A. A., Reynolds, J. E., Wells, R. S., and Eide, S. D. (2001). The Bottlenose Dolphin: Biology and Conservation. *Ecology* 82 (9), 2668. doi:10.2307/2679947.
- IUCN (2023). The IUCN Red List of Threatened Species. *Version 2022.2*. <http://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12th October 2023.
- J. St. Aubin, D., and Dierauf, L. (2001). “Stress and Marine Mammals,” in *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, 253–269. doi:10.1201/9781420041637.ch13.
- Janik, V. M. (2001). Cetacean Societies: Field Studies of Dolphins and Whales. *Ethology* 107, 86–87. doi:10.1046/j.1439-0310.2001.0625b.x.
- Jefferson, T. A. (2014). “Phocoenidae (Porpoises),” in *Wilson, D.E. Mittermeier, R.A., Handbook of the Mammals of the World - Volume 4*, 528–547. Barcelona, Spain: Lynx Ediciones.
- Jouannet, P. (2009). Evolution of assisted reproductive technologies. *Bull. Acad. Natl. Med.* 193, 573–582. doi:10.1016/s0001-4079(19)32553-1.

- Katsumata, E. (2010). Study on reproduction of captive marine mammals. *J. Reprod. Dev.* 56, 1–8. doi:10.1262/jrd.09-212E.
- Katsumata, E., Jaroenporn, S., Ueda, Y., Arai, K., Katsumata, H., Watanabe, G., et al. (2017). Circulating gonadotropins and testicular hormones during sexual maturation and annual changes in male bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Vet. Med. Sci.* 79, 1899–1905. doi:10.1292/jvms.16-0544.
- Kenagy, G. J., and Trombulak, S. C. (1986). Size and Function of Mammalian Testes in Relation to Body Size. *J. Mammal.* 67, 1–22. doi:10.2307/1380997.
- Kita, S., Yoshioka, M., Kashiwagi, M., Ogawa, S., and Tobayama, T. (2001). Comparative external morphology of cetacean spermatozoa. *Fish. Sci.* 67, 482–492. doi:10.1046/j.1444-2906.2001.00284.x.
- Kjeld, J. M., Sigurjonsson, J., and Arnason, A. (1992). Sex hormone concentrations in blood serum from the North Atlantic fin whale (*Balaenoptera physalus*). *J. Endocrinol.* 134, 405–413. doi:10.1677/joe.0.1340405.
- Lauder, G. V., and Shaffer, B. H. (1993). “Design of feeding systems in aquatic vertebrates: major patterns and their evolutionary interpretations,” in *The Skull, Vol. 3: Functional and evolutionary mechanisms*, 113–149.
- Li, C. jin, Wang, D., and Zhou, X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 173, 1–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.08.008.
- López, B. D. (2012). Bottlenose dolphins and aquaculture: Interaction and site fidelity on the north-eastern coast of Sardinia (Italy). *Mar. Biol.* 159, 2161–2172. doi:10.1007/s00227-012-2002-x.
- Luypaert, T., Hagan, J. G., McCarthy, M. L., and Poti, M. (2020). “Status of Marine Biodiversity in the Anthropocene,” in *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future*, 57–82. doi:10.1007/978-3-030-20389-4_4.
- Mahadevan, M., and Trounson, A. O. (1983). Effect of Cryoprotective Media and Dilution Methods on the Preservation of Human Spermatozoa. *Andrologia* 15, 355–366. doi:10.1111/j.1439-0272.1983.tb00152.x.
- Marini, C., Fossa, F., Paoli, C., Bellingeri, M., Gnone, G., and Vassallo, P. (2015). Predicting bottlenose dolphin distribution along Liguria coast (northwestern Mediterranean Sea) through different modeling techniques and indirect predictors. *J. Environ. Manage.* 150, 9–20. doi:10.1016/j.jenvman.2014.11.008.
- Maxwell, W. M. C., and Johnson, L. A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 48, 209–219. doi:10.1016/S0093-691X(97)84068-X.
- Mazzoldi, C., Bearzi, G., Brito, C., Carvalho, I., Desiderà, E., Endrizzi, L., et al. (2019). From sea monsters to charismatic megafauna: Changes in perception and use of large marine animals. *PLoS One* 14. doi:10.1371/journal.pone.0226810.
- Meisner, A. D., Klaus, A. V., and O’Leary, M. A. (2005). Sperm head morphology in 36 species of Artiodactylans, Perissodactylans, and Cetaceans (mammalia). *J. Morphol.* 263, 179–202. doi:10.1002/jmor.10297.
- Miller, D. L. (2016). *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea: Whales, Dolphins and Porpoises.*, ed. D. L. Miller doi:10.1201/b11001.
- Miller, D. L., Styer, E. L., Decker, S. J., and Robeck, T. (2002). Ultrastructure of the spermatozoa

- from three odontocetes: A killer whale (*Orcinus orca*), a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) and a beluga (*Delphinapterus leucas*). *Anat. Histol. Embryol.* 31, 158–168. doi:10.1046/j.1439-0264.2002.00385.x.
- Montano, G. A., Kraemer, D. C., Love, C. C., Robeck, T. R., and O'Brien, J. K. (2011). 284 In Vitro function of frozen - thawed bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) sperm undergoing sorting and recryopreservation. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 240. doi:10.1071/rdv23n1ab284.
- Montano, G. A., Kraemer, D. C., Love, C. C., Robeck, T. R., and O'Brien, J. K. (2012). Evaluation of motility, membrane status and DNA integrity of frozen-thawed bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa after sex-sorting and recryopreservation. *Reproduction* 143, 799–813. doi:10.1530/REP-11-0490.
- Murphy, S., Collet, A., and Rogan, E. (2005). Mating strategy in the male common dolphin (*Delphinus delphis*): What gonadal analysis tells us. *J. Mammal.* 86, 1247–1258. doi:10.1644/1545-1542(2005)86[1247:MSITMC]2.0.CO;2.
- Naciones, U. (2022). ODS. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/oceans/>. Available at: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/oceans/>.
- Notarbartolo di Sciara G. J., B. A. (2010). Conserving whales, dolphins and porpoises in the Mediterranean and Black Seas: an ACCOBAMS status report. *ACCOBAMS, Monaco*, 212 p. ISBN: 978-2-9579273-1-9.
- O'Brien, E., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Bóveda, P., Martínez-Fresneda, L., et al. (2019). Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. *Theriogenology* 129, 160–167. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.02.024.
- O'Brien, J. K., and Robeck, T. R. (2006). Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 319–329. doi:10.1071/RD05108.
- O'Brien, J. K., and 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. *Int. J. Comp. Psychol.* 23 (3), 227-248. doi:10.46867/ijcp.2010.23.03.11.
- O'Brien, J. K., Steinman, K. J., and Robeck, T. R. (2009). Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation. *Theriogenology* 71, 98–107. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.052.
- Orbach, D. N., Kelly, D. A., Solano, M., and Brennan, P. L. R. (2017). Genital interactions during simulated copulation among marine mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284. doi:10.1098/rspb.2017.1265.
- Pabst, D. A., Rommel, S. A., McLellan, W. A., Williams, T. M., and Rowles, T. K. (1995). Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during exercise. *J. Exp. Biol.* 198, 221–226. doi:10.1242/jeb.198.1.221.
- Palomar Rios, A., and Molina Botella, I. (2017). Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 34, 1271–1276. doi:10.1007/s10815-017-0973-8.
- Parker, G. A. (1970). Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol. Rev.* 45, 525–567. doi:10.1111/j.1469-185x.1970.tb01176.x.
- Parrilla, I., Perez-Patiño, C., Li, J., Barranco, I., Padilla, L., Rodriguez-Martinez, H., et al. (2019).

- Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology* 137, 23–29. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.033.
- Pérez-Garnelo, S. S., Oter, M., Borque, C., Talavera, C., Delclaux, M., Martínez-Nevado, E., et al. (2006). Post-thaw viability of European bison (*Bison bonasus*) semen frozen with extenders containing egg yolk or lipids of plant origin and examined with a heterologous in vitro fertilization assay. *J. Zoo Wildl. Med.* 37, 116–125. doi:10.1638/05-039.1.
- Perrin, W. F., Wursig, B., and Thewissen, J. G. M. (2009). *Encyclopedia of Marine Mammals*. ISBN: 9780080919935. doi:10.1016/B978-0-12-373553-9.X0001-6.
- Peter Harrison, P., Burns, D., Fury, C., Luker, G., and Baker, S. (2009). Conservation and Values - Global Cetacean Summary Report. Available at: www.environment.gov.au/coasts/species/cetaceans/index.html.
- Polge, C., Smith, A. U., and Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures [12]. *Nature* 164, 666. doi:10.1038/164666a0.
- Pompa, S., Ehrlich, P. R., and Ceballos, G. (2011). Global distribution and conservation of marine mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13600–13605. doi:10.1073/pnas.1101525108.
- Quintero-Moreno, A., Rigau, T., and Rodríguez-Gil, J. E. (2004). Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. *Theriogenology* 61, 673–690. doi:10.1016/S0093-691X(03)00248-6.
- Reynolds, J. E., Marsh, H., and Ragen, T. J. (2009). Marine mammal conservation. *Endanger. Species Res.* 7, 23–28. doi:10.3354/esr00179.
- Rice, D. (1998). Marine mammals of the world, systematics and distribution (Special publication Society for Marine Mammalogy 4). *Soc. Mar. Mammal.* Special pu, 1–231.
- Robeck, T. R., Curry, B. E., McBain, J. F., and Kraemer, D. C. (1994). Reproductive biology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the potential application of advanced reproductive technologies. *J. Zoo Wildl. Med.* 25 (3), 321–336.
- Robeck, T. R., Montano, G. A., Steinman, K. J., Smolensky, P., Sweeney, J., Osborn, S., et al. (2013). Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Anim. Reprod. Sci.* 139, 168–181. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.04.004.
- Robeck, T. R., and O'Brien, J. K. (2004). Effect of Cryopreservation Methods and Precryopreservation Storage on Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 70, 1340–1348. doi:10.1095/biolreprod.103.025304.
- Robeck, T. R., Steinman, K. J., Yoshioka, M., Jensen, E., O'Brien, J. K., Katsumata, E., et al. (2005). Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction* 129, 659–674. doi:10.1530/rep.1.00516.
- Robles-Gómez, L., Fuentes-Albero, M. del C., Huerta-Retamal, N., Sáez-Espinosa, P., García-Párraga, D., Romero, A., et al. (2020). Lectin spatial immunolocalization during in vitro capacitation in *Tursiops truncatus* spermatozoa. *Anim. Reprod.* 17 (1). doi:10.21451/1984-3143-AR2019-0083.
- Rommel, S., Pabst, D., and McLellan, W. (2007). “Functional Anatomy of the Cetacean Reproductive System, with Comparisons to the Domestic Dog,” in *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea*. 127-145 doi:10.1201/b11001-5.

- Sala, B., Giménez, J., de Stephanis, R., Barceló, D., and Eljarrat, E. (2019). First determination of high levels of organophosphorus flame retardants and plasticizers in dolphins from Southern European waters. *Environ. Res.* 172, 289–295. doi:10.1016/j.envres.2019.02.027.
- Sánchez-Calabuig, M. J. (2014). Desarrollo de métodos alternativos de valoración y criopreservación seminal en el delfín mular (*Tursiops truncatus*). *Fac. Vet. Dep. Med. Y Cirugía Anim.* Available at: <http://eprints.ucm.es/28822/1/T35786.pdf>.
- Sánchez-Calabuig, M. J., Beltrán-Brena, P., Martínez-Nevado, E., Rizos, D., Pérez-Gutiérrez, J. F., and de la Fuente, J. (2012). 119 Heterologous bovine *in vitro* fertilization using cryopreserved bottlenose dolphin spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 172. doi:10.1071/rdv24n1ab119.
- Sánchez-Calabuig, M. J., de la Fuente, J., Beltrán-Breña, P., Martínez-Nevado, E., Pérez-Gutiérrez, J. F., Blyde, D., et al. (2013). 170 Assessment of fresh and frozen - thawed bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) sperm DNA fragmentation using the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 233. doi:10.1071/rdv25n1ab170.
- Sánchez-Calabuig, M. J., García-Vázquez, F. A., Laguna-Barraza, R., Barros-García, C., García-Párraga, D., Rizos, D., et al. (2017). Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa: Collection, cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization. *J. Vis. Exp.* 2017. doi:10.3791/55237.
- Sánchez-Calabuig, M. J., López-Fernández, C., Johnston, S. D., Blyde, D., Cooper, J., Harrison, K., et al. (2015). Effect of Cryopreservation on the Sperm DNA Fragmentation Dynamics of the Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reprod. Domest. Anim.* 50, 227–235. doi:10.1111/rda.12474.
- Sánchez-Calabuig, M. J., López-Fernández, C., Martínez-Nevado, E., Pérez-Gutiérrez, J. F., de la Fuente, J., Johnston, S. D., et al. (2014). Validation of a field based chromatin dispersion assay to assess sperm DNA fragmentation in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reprod. Domest. Anim.* 49, 761–768. doi:10.1111/rda.12364.
- Schroeder, J. P. (1990). "Breeding Bottlenose Dolphins in Captivity," in *The Bottlenose Dolphin*, 435–446. ISBN 9780124402805. doi:10.1016/b978-0-12-440280-5.50029-9.
- Schroeder, J. P., and Keller, K. V. (1989). Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*. *J. Exp. Zool.* 249, 316–321. doi:10.1002/jez.1402490310.
- Scott, M. D., and Chivers, S. J. (1990). "Distribution and Herd Structure of Bottlenose Dolphins in the Eastern Tropical Pacific Ocean," in *The Bottlenose Dolphin*, 387–402. ISBN 9780124402805. doi:10.1016/b978-0-12-440280-5.50026-3.
- Seager, S. (1981). Semen Collection (Electroejaculation), Evaluation and Freezing in the Atlantic Bottlenosed Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Proc Am Assoc Zoo Vet* 1981, 1. Available at: <https://cir.nii.ac.jp/crid/1574231875775887616.bib?lang=en>
- Sherman, K. K., Beaulieu-McCoy, N. E., Wurster, E. L., Wells, R. S., Smith, C. R., Barleycorn, A. A., et al. (2021). Serum correlation, demographic differentiation, and seasonality of blubber testosterone in common bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Sarasota Bay, FL. *Sci. Rep.* 11, 8941. doi:10.1038/s41598-021-88602-z.
- Slijper, E. J. (2021). "15. Functional Morphology of the Reproductive System in Cetacea," in *Whales, Dolphins, and Porpoises*, 277–319. doi:10.1525/9780520321373-017.
- Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P. L., Dacheux, J. L., et al. (2014).

- Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *J. Proteomics* 109, 245–260. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.007.
- Storelli, M. M., and Marcotrigiano, G. O. (2000). Environmental contamination in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Relationship between levels of metals, methylmercury, and organochlorine compounds in an adult female, her neonate, and a calf. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 333–340. doi:10.1007/s001280000004.
- Takenaka, A., Kashiwagi, N., Maezono, Y., Nakao, T., Wano, Y., Kakizoe, Y., et al. (2013). Study on the Ejaculate Characteristics and Liquid Storage of Semen in the Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Japanese J. Zoo Wildl. Med.* 18 (3), 107–114. doi:10.5686/jjzwm.18.107.
- Temte, J. L. (1991). Use of Serum Progesterone and Testosterone to Estimate Sexual Maturity in Call 's Porpoise *Phocoenoides dalli*. *Fish. Bull.* 89, 161–165.
- Terasawa, F., Yokoyama, Y., and Kitamura, M. (1999). Rectal temperatures before and after parturition in bottlenose dolphins. *Zoo Biol.* 18, 153–156. doi:10.1002/(SICI)1098-2361(1999)18:2<153::AID-ZOO7>3.0.CO;2-F.
- Van Cauwenberghe, L., and Janssen, C. R. (2014). Microplastics in bivalves cultured for human consumption. *Environ. Pollut.* 193, 65–70. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.010.
- van der Horst, G., Medger, K., Steckler, D., Luther, I., and Bartels, P. (2018a). Bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) sperm revisited: Motility, morphology and ultrastructure of fresh sperm of consecutive ejaculates. *Anim. Reprod. Sci.* 195, 309–320. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.06.009.
- Vassallo, P., Marini, C., Paoli, C., Bellingeri, M., Dhermain, F., Nuti, S., et al. (2020). Species-specific distribution model may be not enough: The case study of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) habitat distribution in Pelagos Sanctuary. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 30, 1689–1701. doi:10.1002/aqc.3366.
- Vergara, V., Wood, J., Lesage, V., Ames, A., Mikus, M. A., and Michaud, R. (2021). Can you hear me? Impacts of underwater noise on communication space of adult, sub-adult and calf contact calls of endangered St. Lawrence belugas (*Delphinapterus leucas*). *Polar Res.* 40. doi:10.33265/polar.v40.5521.
- Vitt, L. J., and Caldwell, J. P. (2008). An introductory biology of amphibians and reptiles. ISBN: 9780123743466. doi:10.1016/B978-0-12-374346-6.X0001-6.
- Wells, R. S., and Scott, M. D. (2017). "Bottlenose Dolphin, *Tursiops Truncatus*, Common Bottlenose Dolphin," in *Encyclopedia of Marine Mammals, Third Edition* (Academic Press), 118–125. doi:10.1016/B978-0-12-804327-1.00072-8.
- Wursig, B. (2001). The Bottlenose Dolphin: Biology and Conservation . John E. Reynolds III , Randall S. Wells , Samantha D. Eide. *Q. Rev. Biol.* 76, 370–370. doi:10.1086/394055.
- Yoshida, M. (2000). Conservation of sperms: Current status and new trends. in *Animal Reproduction Science*, 349–355. doi:10.1016/S0378-4320(00)00125-1.
- Yuen, Q. W. H. (2007). An assessment of reproductive development of the male Indo-pacific Bottlenose Dolphin, *Tursiops Aduncus*, in captivity. *Hong Kong Polytech. Univ.* 59. Available at: <https://theses.lib.polyu.edu.hk/bitstream/200/3230/1/b21654670.pdf>.
- Yuen, Q. W. H., Brook, F. M., Kinoshita, R. E., and Ying, M. T. C. (2009). Semen collection and ejaculate characteristics in the Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). *J. Androl.* 30, 432–439. doi:10.2164/jandrol.108.006692.

Zhou, Q., Wang, S., Liu, J., Hu, X., Liu, Y., He, Y., et al. (2022). Geological evolution of offshore pollution and its long-term potential impacts on marine ecosystems. *Geosci. Front.* 13 (5), 101427. doi:10.1016/j.gsf.2022.101427.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La **hipótesis** de esta tesis Doctoral plantea que la investigación sobre la funcionalidad espermática puede enriquecer nuestra comprensión de las características reproductivas de especies de interés, como el delfín mular. Estos avances tienen el potencial de ser aplicados en programas de conservación, con su incorporación a las técnicas de reproducción asistida.

Por todo ello el **objetivo general** de esta tesis es analizar la funcionalidad espermática del delfín mular a través del estudio de su conservación, morfometría y composición proteica. Para la consecución de este objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Desarrollar un protocolo de refrigeración (temperatura y concentración) de las muestras de semen de delfín mular (**Artículo 1**).
2. Analizar las características morfométricas de los espermatozoides de delfín mular, clasificar los espermatozoides del eyaculado en poblaciones a través de su morfometría, correlacionar los niveles séricos de testosterona con la morfometría espermática, y estudiar el efecto del tiempo de refrigeración y temperatura en la morfometría espermática (**Artículo 2**).
3. Identificar, describir y clasificar las proteínas del plasma seminal y de los espermatozoides de delfín mular, y comparar con los perfiles proteicos de otras especies (bovina, canina y humana) (**Artículo 3**).

IV. ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULO 1

Effect of temperature and cell concentration on dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa quality evaluated at different days of refrigeration

Ruiz-Díaz, S.^a, Luongo, C.^a, Fuentes-Albero, M.C.^b, Abril-Sánchez, S.^a, Sánchez-Calabuig, M.J.^{c,d}, Barros-García, C.^b, De la Fe, C.^e, García-Galán, A.^e, Ros Santaella, J.L.^f, Pintus, E.^f, Garcia-Párraga, D.^{b,g}, García-Vázquez, F.A.^a

^(a) Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, University of Murcia, Campus Mare Nostrum, Spain

^(a) Biology Department, Avanqua-Oceanogràfic S.L, 46013, Valencia, Spain

^(b) Department of Animal Reproduction, INIA, Madrid, Spain

^(c) Department of Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Science, Madrid, Spain

^(d) Ruminant Health Research Group, Faculty of Veterinary Sciences, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, Campus de Espinardo s/n., 30100, Murcia, Spain

^(e) Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00, Praha 6-Suchbátka, Czech Republic

^(f) Research Department, Fundació Oceanogràfic, 46013, Valencia, Spain

Animal Reproduction Science, Vol. 212, 2020, 106248.

DOI: 10.1016/j.anireprosci.2019.106248

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432019305494>

RESUMEN ARTÍCULO 1

El uso de muestras espermáticas de delfín criopreservados facilita el intercambio de material genético entre parques acuáticos y hace que los espermatozoides sean accesibles a los laboratorios para la reproducción de los mamíferos marinos. La criopreservación de espermatozoides en el delfín mular (*Tursiops truncatus*) se ha desarrollado para el intercambio de gametos dentro de la población *ex situ*. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método eficaz de refrigeración de espermatozoides de delfín mular diluidos en un diluyente comercial (BTS). Para ello, en el Experimento 1, se evaluó el efecto de la temperatura (5 °C en comparación con 15 °C) sobre la calidad espermática durante 7 días de almacenamiento con una concentración fija de 100×10^6 spz/ml. En el Experimento 2 se evaluó el efecto de la concentración de almacenamiento (100×10^6 frente a 20×10^6 spz/ml) en la calidad espermática durante 7 días de almacenamiento con temperatura constante de 5 °C. En el Experimento 1, la motilidad total (incluido el % de espermatozoides rápidos) fue mayor a 5 que a 15 °C. Cuando se evaluó el efecto de la concentración de almacenamiento (Experimento 2), la motilidad total y la ALH (Amplitud de desplazamiento Lateral de Cabeza) fueron mayores a la concentración de almacenamiento de 100×10^6 spz/ml. En ambos experimentos, los valores de viabilidad, integridad acrosómica y morfología normal se mantuvieron constantes durante los 7 días de refrigeración. En el Experimento 3, se realizó un estudio microbiológico para evaluar el efecto de la temperatura de refrigeración y los días de almacenamiento sobre el crecimiento bacteriano. Los resultados del análisis microbiológico indicaron la presencia de *Staphylococcus aureus* en algunas muestras, sin embargo, no hubo efecto de la temperatura ni de los días de refrigeración. En conclusión, el semen de delfín mular puede refrigerarse durante un periodo de almacenamiento corto-medio, manteniendo la funcionalidad espermática cuando se almacena a 100×10^6 spz/ml a 5 °C.

ARTÍCULO 2

Characterization of Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Sperm Based on Morphometric Traits

Fuentes-Albero, M.C.^{a,b}, Abril-Sánchez, S.^b, Ros-Santaella, J.L.^c, Pintus, E.^c, Luongo, C.^b, Ruiz-Díaz, S.^d, Barros-García, C.^a, Sánchez-Calabuig, M.J.^{d,e}, García-Párraga, D.^{a,f}, García-Vázquez, F.A.^b

^(a) Biology Department, Avanqua-Oceanogràfic S.L., 46013 Valencia, Spain.

^(b) Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, Campus Mare Nostrum, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.

^(c) Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 129, 165 00 Prague, Czech Republic.

^(d) Department of Animal Reproduction, INIA, 28040 Madrid, Spain.

^(e) Department of Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Science, 28040 Madrid, Spain.

^(f) Research Department, Fundación Oceanogràfic, 46013 Valencia, Spain.

Biology (Basel). 2021 Apr 22;10(5):355.

DOI: 10.3390/biology10050355

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8143526/>

RESUMEN ARTÍCULO 2

Los machos del delfín mular (*Tursiops truncatus*) siguen diversas estrategias reproductivas para asegurar su paternidad. Sin embargo, se sabe poco sobre los rasgos de los espermatozoides, incluyendo las características morfométricas que contribuyen a su éxito reproductivo. Nuestro objetivo fue estudiar la morfometría espermática del delfín en un total de 13 parámetros observados en dos machos adultos para evaluar (i) presuntas subpoblaciones espermáticas, (ii) la correlación de la morfometría espermática con los niveles de testosterona y (iii) el efecto del almacenamiento refrigerado en la morfometría espermática. Las poblaciones de espermatozoides se clasificaron en cuatro componentes principales (PC) basados en la morfometría (>94% de la varianza acumulada). Los PC se agruparon en dos subpoblaciones de espermatozoides, que diferían entre los machos. Además, los niveles de testosterona en sangre estaban positivamente correlacionados con la longitud de la pieza media pero negativamente correlacionados con la anchura de la cabeza y la pieza principal, el flagelo y las longitudes totales de los espermatozoides. La mayoría de los parámetros morfométricos de los espermatozoides cambiaron durante el periodo de almacenamiento (día 1 frente a día 7), pero sólo la longitud de la pieza principal se vio afectada por la temperatura de almacenamiento (5 °C frente a 15 °C). Este es el primer estudio que identifica subpoblaciones de espermatozoides de delfín basadas en la morfometría y la influencia de la testosterona en sangre y la refrigeración en la morfometría espermática.

ARTÍCULO 3

Protein Identification of Spermatozoa and Seminal Plasma in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*)

Fuentes-Albero, M.C.^{a,b}, González-Brusi, L.^c, Cots, P.^c, Luongo, C.^b, Abril-Sánchez, S.^b, Ros-Santaella, J.L.^d, Pintus, E.^d, Ruiz-Díaz, S.^e, Barros-García, C.^a, Sánchez-Calabuig, M.J.^{e,f}, García-Párraga, D.^{a,g}, Avilés, M.^c, Izquierdo-Rico, M.J.^c, García-Vázquez, F.A.^b

- (a) Department of Biology, Avanqua-Oceanogràfic S.L, Valencia, Spain.
- (b) Department of Physiology, Faculty of Veterinary Science, University of Murcia, Murcia, Spain.
- (c) Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Medicine, University of Murcia, Murcia, Spain.
- (d) Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czechia.
- (e) Department of Animal Reproduction, National Agricultural and Food Research and Technology Institute (INIA), Madrid, Spain.
- (f) Department of Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Science, Madrid, Spain.
- (g) Research Department, Fundación Oceanogràfic, Valencia, Spain.

Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol.9, 2021

DOI:10.3389/fcell.2021.673961

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.673961>

RESUMEN ARTÍCULO 3

Las proteínas desempeñan un papel importante en muchas funciones reproductivas, como la maduración espermática, el tránsito por el tracto genital femenino o la interacción espermatozoide-ovocito. Sin embargo, en general, se dispone de poca información relativa a las funciones reproductivas en el caso de los animales acuáticos. El presente estudio pretende caracterizar el proteoma de los espermatozoides y del plasma seminal del delfín mular (*Tursiops truncatus*) como organismo modelo para los cetáceos. Para ello se obtuvieron muestras de eyaculados de dos delfines entrenados en un acuario. Los espermatozoides y el plasma seminal se analizaron mediante análisis proteómicos utilizando un LC-MS/MS, y el listado con los símbolos de los genes correspondientes a cada proteína se envió a la base de datos DAVID. De las 419 proteínas identificadas en los espermatozoides y 303 en el plasma seminal, 111 proteínas eran comunes para ambas fracciones. Además, se identificaron 70 proteínas implicadas en procesos reproductivos; 39 en espermatozoides y 31 en plasma seminal. Las cinco proteínas más abundantes identificadas en estas muestras fueron: AKAP3, ODF2, TUBB, GSTM3, ROPN1 para los espermatozoides y CST11, LTF, ALB, HSP90B1, PIGR para el plasma seminal. En conclusión, este estudio proporciona la primera caracterización del proteoma en espermatozoides y plasma seminal de cetáceos, abriendo el camino a futuras investigaciones sobre nuevos biomarcadores, el análisis de la capacidad de conservación o posibles aplicaciones adicionales en el campo de la reproducción asistida.

V. DISCUSIÓN GENERAL

V. DISCUSIÓN GENERAL

Estudiar el delfín mular resulta de gran utilidad para comprender tanto su fisiología y etología, como para extrapolar dicho conocimiento a otras especies de cetáceos. Gracias a su presencia en medios controlados (O'Brien & Robeck, 2010), así como al trabajo realizado por sus entrenadores y veterinarios, es posible obtener muestras biológicas fundamentales, como es el caso de las muestras seminales (Keller, 1986), para continuar ampliando el conocimiento sobre esta especie, de manera poco invasiva y sin interferir en el bienestar animal (O'Brien & Robeck, 2006).

No obstante, a pesar de que en los últimos años se está investigando cada vez más en reproducción de cetáceos, y en concreto del delfín mular (O'Brien & Robeck, 2006), todavía quedan muchos aspectos por resolver como ya ha ocurrido con otras especies de interés ganadero. Así, por ejemplo, la refrigeración espermática en animales de producción como la especie equina y ovina (Aurich, 2008; O'Hara et al., 2010; Mata-Campuzano et al., 2014) es una metodología rutinaria que permite el mantenimiento de las células espermáticas en un ambiente óptimo durante varios días antes de poder inseminar a las hembras, sin menoscabar su eficiencia en la fecundación. Este aspecto en el delfín no había sido todavía estudiado con la importancia que podría tener en los programas de IA, permitiendo el transporte de semen entre instituciones de una manera sencilla y económica, evitando problemas de consanguinidad entre animales de un mismo acuario (Robeck et al., 2005).

En el **Artículo 1** se estudió qué condiciones de refrigeración en relación a la temperatura y concentración eran las más óptimas para esta especie, para lo que se evaluó el efecto de la temperatura en la calidad espermática durante 7 días consecutivos de refrigeración evaluando el semen a 1, 3, 5 y 7 días. El semen se refrigeró a 5 °C y a 15 °C a una concentración de 100×10^6 spz/ml y se determinaron los parámetros relacionados con la motilidad empleando un sistema CASA, así como la viabilidad, el estado del acrosoma y la morfología de los espermatozoides. Los resultados mostraron que existían diferencias significativas en cuanto a la motilidad y el porcentaje de espermatozoides rápidos, que fueron mejores a 5 °C. Por tanto, dado que el movimiento y velocidad espermática son características destacadas para determinar la calidad espermática, se estableció que lo más adecuado era mantener las muestras a una temperatura de 5°C. Este valor de temperatura facilita la logística de transporte y almacenamiento de muestras, ya que las neveras comerciales proporcionan esta temperatura de manera constante, estableciéndose por tanto este método como el más sencillo y estable para conservar las muestras espermáticas. De hecho, gracias a estos estudios se llevaron a cabo las primeras IA en esta especie con semen refrigerado con el resultado final de una gestación y nacimiento de una cría (Barros-García et al., 2016).

Una vez determinada la temperatura de conservación, era necesario medir el efecto de la concentración de la muestra en la calidad espermática posterior a los 7 días de refrigeración. Para ello, se conservaron muestras a dos concentraciones distintas: 20×10^6 spz/ml y 100×10^6 spz/ml, resultando finalmente más óptima a 100×10^6 spz/ml. Este resultado concuerda con los obtenidos en estudios previos (Robeck & O'Brien, 2004), en los que demostraron que la motilidad de muestras criopreservadas a menor concentración obtenían peor motilidad una

vez descongeladas. Esto puede ser debido a que durante la dilución de la muestra esta se vea afectada, dado que una menor concentración celular provoca una mayor salida de agua de cada célula, cosa que no ocurriría en muestras más concentradas, ya que el equilibrio osmótico con el medio se conseguiría antes de que se produjera una excesiva salida de agua de la célula. Aunque la deshidratación es importante en los procesos de criopreservación, ya que evita la formación de cristales de hielo dentro de la célula, esto no sucede en la refrigeración, por lo que la deshidratación total de la célula no es imprescindible. Se recomienda por tanto refrigerar a concentraciones más elevadas y diluir posteriormente con plasma seminal (Robeck & O'Brien, 2004) si fuera necesario para obtener la dosis adecuada para la inseminación. Por otra parte, el valor de ALH fue superior cuando se almacenaban las muestras a una concentración de 100×10^6 spz/ml. Este resultado podría explicarse debido a que una mayor concentración de espermatozoides en la muestra provocaría un incremento en el número de colisiones entre células, resultando en unos valores de ALH más elevados en el sistema CASA.

Con el objetivo de comprobar cómo afectaba la refrigeración a diferentes temperaturas al crecimiento bacteriano, en presencia o ausencia de antibióticos, los eyaculados se diluyeron con BTS, un diluyente comercial con función antimicrobiana que contiene norfloxacin. La presencia de patógenos se determinó también durante los 7 días de conservación y se observó que, aunque se apreciaba la presencia de *Staphylococcus aureus* en el 60% de las muestras durante los primeros días, esta bacteria desaparecía en la medición final efectuada el día 7. Con lo cual, pudo concluirse que el efecto del BTS fue positivo así como el manejo de las muestras, ya que no se produjo contaminación exterior con otras bacterias.

Durante el desarrollo del **Artículo 1** se tuvieron en cuenta numerosos parámetros de funcionalidad espermática como fueron la motilidad, los parámetros cinéticos y la viabilidad celular, entre otros. Sin embargo, existen otros aspectos de la funcionalidad espermática que cada vez están teniendo más importancia para profundizar en el conocimiento básico de la célula espermática, entre los que se pueden destacar la morfometría del espermatozoide, así como la proteómica del mismo y del plasma seminal.

En relación a la morfometría, en el **Artículo 2** se determinaron los parámetros morfométricos de los espermatozoides de delfín mular, los cuales estaban descritos parcialmente en distintos artículos, pero se carecía de una descripción completa hasta la fecha. Para ello se analizaron un total de 875 espermatozoides procedentes de 11 eyaculados distintos y se obtuvieron datos de los siguientes parámetros: anchura de cabeza, longitud de cabeza, perímetro de cabeza, área de cabeza, longitud de pieza intermedia, anchura de la pieza intermedia, longitud pieza principal, longitud pieza terminal, longitud total del flagelo y longitud total del espermatozoide. Además, para la cabeza se tuvieron en cuenta otros parámetros específicos como la elipticidad, rugosidad y elongación. En los análisis de componentes principales (PCA) se observó que los cuatro primeros explicaban un 91,74% de la variación total. A través de la representación de estos cuatro PC mediante *heatmaps* se observó que los espermatozoides se agrupaban en dos *clusters* o grupos claramente diferenciados en ambos machos: el *cluster 1*, cuyos espermatozoides presentaban una morfología más elongada con la pieza intermedia de menor grosor; y el *cluster 2*, con espermatozoides caracterizados principalmente por mostrar una pieza intermedia de mayor grosor y una morfología más compacta. La presencia de

espermatozoides con morfologías distintas concuerda con la hipótesis inicial de que podría estar existiendo competencia espermática. Así pues, los machos desarrollarían diversos tipos de espermatozoides en sus eyaculados, con presumiblemente diferentes funciones, para tratar de asegurar su paternidad. De hecho, recientemente esta teoría se ha demostrado en humanos, donde se ha descrito este tipo de diversidad funcional entre espermatozoides, equiparándolos a un pelotón de ciclistas, en el que cada individuo tiene un objetivo concreto pero un bien común (Phuyal et al., 2022).

En este punto de la investigación, resultaba importante determinar si la posición social de los machos y su nivel de testosterona en sangre en el momento de la recolección de las muestras seminales podrían estar, de algún modo, relacionadas con las características morfométricas estudiadas. Este efecto es un fenómeno que sucede en otros organismos modelos, como en ratones, donde se ha demostrado que los niveles de testosterona varían en función del estrés generado por la competencia entre machos durante la época reproductiva (Firman et al., 2020). De hecho, los machos que se encuentran en situaciones de riesgo por luchas con otros machos producen más testosterona y, además, dan lugar a una mayor proporción de hembras en su descendencia. Esta estrategia les permite equilibrar eficientemente sus poblaciones y reducir la competencia entre machos en las subsecuentes generaciones (Firman et al., 2020). Como en delfín mular se carecía de información referente a este respecto, se calculó la relación entre cada una de las cuatro PC y el nivel de testosterona en sangre de los machos objetos de estudio. Los resultados evidenciaron que existe una correlación positiva entre un tamaño reducido de la cabeza y una elevada concentración de testosterona. Este resultado sugiere que es probable que una cabeza de menor tamaño pueda resultar más hidrodinámica y proporcione un mejor desplazamiento. Además, se observó que los espermatozoides mostraban un flagelo de menor longitud y una pieza intermedia más larga cuando los niveles de testosterona eran más elevados. El tamaño de la pieza intermedia es un indicador de la carga mitocondrial del espermatozoide (Anderson et al., 2005), de modo que un incremento en su tamaño supondría una mayor capacidad energética y natatoria y, por ende, un aumento de su competitividad en términos absolutos (Fawcett, 1975; Anderson & Dixon, 2002; Fisher et al., 2016). El tamaño de la fracción flagelar admite mayor discusión. El hecho de encontrar esta correlación podría sugerir que los espermatozoides conformados por flagelos y piezas intermedias de mayor longitud, de algún modo, no resultan tan efectivos. Quizás la longitud excesiva o el mayor peso total del espermatozoide podrían estar limitando su motilidad y, por ese motivo, no resultarían una solución biológica eficaz. Así pues, los resultados parecen mostrar que espermatozoides más compactos (con una cabeza reducida, una pieza intermedia elongada que les proporcione suficiente energía y un flagelo corto), serían la mejor respuesta adaptativa frente al estrés competitivo que sufren los individuos, especialmente durante las temporadas reproductivas. Esta situación no constituiría un caso aislado, ya que se han observado resultados similares en algunas especies de aves como en *Erythrura gouldiae* (Lüpold et al., 2009).

Como describimos en el **Artículo 1**, la eficacia de la refrigeración espermática en esta especie está determinada, entre otros factores, por el período de conservación y la temperatura. En el **Artículo 2** comprobamos que la morfometría del espermatozoide también podría verse modificada por las condiciones de refrigeración previamente establecidas. Para ello, se

evaluaron las diferencias en la morfometría de los espermatozoides entre muestras de semen refrigeradas a dos temperaturas diferentes (5 °C y 15 °C) y conservadas durante 1 o 7 días. Los resultados mostraron que el factor temperatura no resultaba condicionante para la gran mayoría de los caracteres evaluados, a excepción de la longitud de la pieza principal del flagelo, que fue mayor a 5 °C. Este parámetro se encuentra íntimamente relacionado con la motilidad del espermatozoide, por lo que resultaría más conveniente conservar las muestras a 5 °C que a 15 °C, siendo esta última una temperatura que altera sensiblemente su estructura y, por tanto, afecta a su capacidad de desplazamiento. De hecho los resultados que obtuvimos previamente en el **Artículo 1**, así lo indicaban, ya que los espermatozoides conservados a 5 °C presentaban una mejor motilidad. Sin embargo, se evidenció que el tiempo de conservación de las muestras sí que afectaba a los espermatozoides, dando lugar a variaciones perceptibles en su morfometría. Así pues, el proceso de refrigeración alteró significativamente parámetros como la anchura de la cabeza y la longitud total del flagelo de los espermatozoides. La reducción del tamaño de la cabeza podría explicarse desde distintas perspectivas: (i) podría estar relacionada con procesos de estrés oxidativo, tal y como se ha observado en verracos (González Villalobos et al., 2008); (ii) por otra parte, los procesos de enfriamiento pueden afectar a la estructura de la membrana acrosomal, produciéndose pérdidas desde el interior de la célula (Thomas et al., 1998; Villaverde-Morcillo et al., 2015); (iii) y además, cabe destacar que la conservación y la criopreservación exigen la utilización de crioprotectores para estabilizar las muestras de semen. Su presencia en el medio desencadena procesos de intercambio osmótico entre el citoplasma y el propio crioprotector y resulta frecuente que la inclusión de crioprotector penetrante en el interior de la célula sea volumétricamente inferior a la salida de componente acuoso al medio, o que se emplee un crioprotector no penetrante, por lo que únicamente se produce una pérdida de agua intracelular (Sánchez-Calabuig, 2014). Por otra parte, se observó que la variación de la longitud total del flagelo estaba determinada por la disminución de la longitud de su pieza intermedia durante el periodo de conservación. De hecho, caracteres como la anchura de la pieza intermedia, la longitud de la pieza principal y la longitud de la pieza terminal del flagelo, no mostraron diferencias estadísticas significativas entre el día 1 y el día 7 del ensayo. Así pues, la variación de este parámetro morfométrico concordaría con los resultados obtenidos en el **Artículo 1**, en el que ya se describió que la motilidad y la viabilidad espermática disminuían con el tiempo. Teniendo en cuenta que la pieza intermedia del flagelo es la portadora de las mitocondrias, la disminución de su tamaño era un resultado previsible basándonos en el descenso de motilidad celular.

Una vez especificados qué caracteres morfométricos se encontraban relacionados con la calidad espermática y cómo la conservación podía afectar a su estructura y función, se procedió a realizar un estudio proteómico que permitiera conocer en profundidad la composición proteica, tanto del espermatozoide, como del plasma seminal. Actualmente, las muestras espermáticas de cualquier especie animal son conservadas o criopreservadas basándose únicamente en características macroscópicas y/o microscópicas del eyaculado, así como en parámetros obtenidos con sistemas informáticos CASA. Pero resulta evidente que no todas las muestras presentan el mismo comportamiento o resistencia frente a los procesos implicados en la preservación, por lo que una muestra clasificada como de alta calidad en fresco puede no soportar correctamente los procesos de refrigeración y congelación y, finalmente, constituir una muestra descongelada con baja calidad. En este contexto, identificar

proteínas que puedan establecerse como biomarcadores relacionados tanto con la capacidad de conservación como con la capacidad de fertilidad, descritas previamente en otras especies (Dacheux et al., 2012; Li et al., 2016; Rahman et al., 2017; Druart & de Graaf, 2018; Pérez-Patiño et al., 2018; Druart et al., 2019), puede predecir qué muestras son más apropiadas para conservar. Esta información puede optimizar el proceso de conservación espermática, preservando únicamente las muestras con alta capacidad fecundante que, además, presenten una mayor calidad espermática tras la preservación (Soleilhavoup et al., 2014; Parrilla et al., 2019; Peris-Frau et al., 2019; Ryu et al., 2019; Bajuk et al., 2020; De Lazari et al., 2020).

En el **Artículo 3**, la evaluación de las cuatro muestras espermáticas supuso la identificación de 722 proteínas coincidentes en todas las muestras. De todas las proteínas, 419 se encontraron presentes en los espermatozoides y 303 en el plasma seminal, siendo 111 comunes a ambas fracciones. Empleando la base de datos STRING, se observó que 39 de las 419 proteínas identificadas en espermatozoides y 31 de las 303 proteínas identificadas en plasma seminal, se encontraban ligadas a categorías relacionadas con funciones espermáticas.

De las 39 proteínas establecidas en los espermatozoides, se observó que 27 de ellas ya se encontraban previamente descritas para otros tejidos de delfín, pero sobre las 12 restantes se requería un análisis comparativo con información existente para otras especies animales. La primera aproximación se realizó sobre las bases de datos de *Homo sapiens*, dado que es el mamífero con mayor descripción a nivel proteómico, donde se identificaron 11 de las proteínas; mientras que la última proteína se encontró descrita únicamente para *Mus musculus*. Con respecto a las 31 proteínas del plasma seminal, 29 ya estaban descritas para delfín, mientras que las otras 2 aparecían descritas en *Mus musculus*. Así pues, el ensayo describe la existencia de 14 nuevas proteínas no identificadas previamente en otros tejidos de delfín, de las cuales 12 se identifican en los espermatozoides y 2 en el plasma seminal, todas ellas con funciones posiblemente ortólogas a las desarrolladas en humanos y ratones.

En relación con los espermatozoides de delfín, se observó que ciertas proteínas como AKAP3, CABYR, ROPN1, ODF2, TUBB y GSTM3, podrían llegar a establecerse como biomarcadores de la calidad espermática, dada su importancia a nivel cuantitativo y/o su relevancia relativa al desempeñar alguna función determinante específica. La proteína que se encontró en mayor abundancia en espermatozoides de delfín fue AKAP3. En ratón, esta proteína resulta esencial para la estructura del flagelo y, por tanto, se encuentra íntimamente relacionada con la motilidad espermática y la fertilidad (Xu et al., 2020). También se ha identificado que interviene en otros procesos celulares, como la capacitación espermática. Además, existen dos proteínas que interactúan con AKAP3: CABYR y ROPN1. En humanos, CABYR aparece en el flagelo y está implicada en los procesos de unión al calcio en la fosforilación que ocurre durante la capacitación espermática (Li et al., 2007, 2011). Por otra parte, ROPN1 se encuentra en el flagelo como parte de la vaina fibrosa, en la pieza principal y en la pieza final del flagelo (Fujita et al., 2000; Chen et al., 2011). Esta proteína es un indicador de calidad espermática en humanos, ya que una expresión insuficiente de esta proteína provoca astenozoospermia, lo cual supone una baja motilidad espermática (Chen et al., 2011) y, además, en ratones *knockout* para el gen que codifica esta proteína, también se observa que los espermatozoides tienen motilidad limitada y tendencia a la subfertilidad (Hanlon Newell et al., 2008).

La segunda proteína más abundante encontrada en espermatozoides fue ODF2. Esta proteína presenta un papel fundamental en la protección de la cola espermática y resulta indispensable para la estructuración de la pieza intermedia (Baltz et al., 1990). Por otra parte, TUBB, la tercera con mayor concentración, es una proteína de la tubulina que está involucrada en el desarrollo del cilio y el flagelo.

Otra de las proteínas identificadas, GSTM3 está implicada en la unión al ovocito (Gopalakrishnan et al., 1998; Petit et al., 2013) y en la interacción con la zona pelúcida (Petit et al., 2013). Esta proteína ha sido propuesta como biomarcador de fertilidad (Kwon et al., 2015; Llavanera et al., 2020) y criotolerancia en espermatozoides de cerdo (Llavanera et al., 2019), dado que a baja concentración en el plasma seminal se incrementa el porcentaje de anormalidades espermáticas. Cabe destacar que GSTM3 también se ha detectado en el plasma seminal de delfín, lo cual podría reforzar la hipótesis en la que se presume un efecto beneficioso del plasma en la conservación del semen (Takenaka et al., 2013). Estos resultados podrían cuestionar el modelo habitual de conservación espermática en mamíferos como los caballos (Takenaka et al., 2013), en los que se retira el plasma seminal por su posible efecto negativo relacionado con la producción de compuestos oxidantes ROS (Especies Reactivas de Oxígeno). No obstante, a pesar de la similitud de los espermatozoides de caballos y delfines, se ha demostrado que el plasma seminal en las muestras de estos últimos presenta un efecto beneficioso (Takenaka et al., 2013) y se emplea en las muestras a preservar (Robeck & O'Brien, 2004).

De forma homóloga, las proteínas CST11, LTF, ALB, PiGR y NPC2 se mostraron muy relevantes en las muestras de plasma seminal. En este caso, aunque CST11 resultó ser la proteína más abundante en el plasma seminal, su actividad antimicrobial observada *in vitro* indica que podría estar involucrada en la protección del tracto genital masculino (Magister & Kos, 2013). Por el momento no se dispone de suficiente información para poder confirmar que la presencia de CST11 en el plasma seminal pueda estar relacionada con una mejora de la calidad de la muestra de semen y resultar útil como biomarcador.

Se sabe que la glicoproteína LTF se sintetiza en el epidídimo de mamíferos y que presenta también una actividad antibacteriana (Pearl & Roser, 2008). Sin embargo, en este caso, sí que podríamos estar frente a una proteína con posibilidad de resultar útil como biomarcador de la calidad espermática. LTF se ha detectado en la próstata y en las vesículas seminales de humanos (Wichmann et al., 1989), pero dado que los delfines carecen de vesículas seminales, su actividad podría estar más relacionada con la desempeñada en otros mamíferos que adolecen también de estas vesículas, como es el caso del perro. Asumiendo que exista una mayor similitud, en perros se ha detectado una correlación positiva entre la concentración de LTF en plasma seminal y la densidad espermática (Kikuchi et al., 2003), de manera que podría ocurrir algo similar en delfines. Por otra parte, adicionar LTF al crioprotector incrementa el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales en muestras espermáticas de caballos, ya que disminuye la aparición de ROS (Martins et al., 2018). Así pues, LTF debería seguir estudiándose en profundidad ya que su actividad en otras especies resulta indicativa de su posible función en delfín. De este modo, LTF se postula como un biomarcador proteico de gran relevancia.

Por otra parte, ALB es una proteína que se encuentra positivamente correlacionada con la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoides normales en la muestra, pero negativamente correlacionada con el volumen del eyaculado en humanos (Elzanaty et al., 2007). Además, ensayos realizados en toros Holstein mostraron que animales clasificados como sementales “altamente fértiles” mostraban una elevada concentración en esta proteína (Kasimanickam et al., 2019). Por ello, es posible que ALB pueda ser utilizada como biomarcador de fertilidad también en muestras de delfines.

PiGR fue una de las proteínas que se encontró en mayor proporción en el plasma seminal de delfín. Su actividad se relaciona con determinadas rutas homeostáticas (Panner Selvam et al., 2019) y su presencia ha sido descrita previamente también en toros y gatos (Rego et al., 2014; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2020). En humanos su expresión se observa en la próstata (Sirigu et al., 1995) y, de forma homóloga, podría estar expresándose también en delfines, dado que la próstata es la única glándula sexual accesoria presente en estos animales.

Por último, la proteína NPC2, descrita como la más abundante en el epidídimo de bovino, participa en la maduración espermática (Belleannée et al., 2011). Además, ratones *knockout* para esta proteína muestran una reducción en la capacidad de fecundar el ovocito (Busso et al., 2014). También se ha observado en porcino que eyaculados que presentaban una escasa congelabilidad mostraron elevados niveles de esta proteína (Valencia et al., 2020). Esta información resulta muy interesante, dado que la presencia de NPC2 en delfín podría estar también involucrada en la capacidad de soportar los procesos de conservación y congelación, estableciéndose como un marcador de la congelabilidad de la muestra.

Cabe destacar que los resultados hacen referencia a las proteínas coincidentes en las cuatro muestras empleadas en el estudio. Sin embargo, se observó que hubo una cierta variación de proteínas tanto entre machos, como entre muestras de cada macho. La variación entre machos reforzaría la hipótesis de la competencia espermática, produciendo cada individuo un conjunto de espermatozoides distintos, tanto morfométricamente como en su composición de proteínas, que los diferenciara del resto de macho. Asimismo, la variación en el perfil proteico entre los eyaculados de un mismo macho a lo largo del tiempo, podría estar relacionado con multitud de factores, pero la posición social y la época del año podrían ser los más determinantes. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con respecto a los niveles de testosterona y su correlación con la modificación de la morfometría de los espermatozoides en el **Artículo 2**, podría ser esperable que los machos generaran una mayor cantidad de testosterona como respuesta a la situación de estrés reproductivo por competencia y que, dicho incremento, supusiera una variación a nivel de expresión proteica que justificara las modificaciones observadas en la morfometría de los espermatozoides. De hecho, podría darse el caso de que algunas proteínas que resultan determinantes en la calidad espermática solo aparezcan en condiciones de estrés o incluso, que la concentración de algunas de ellas, se incremente en función del nivel de competencia detectado por el animal. Sin embargo, la confirmación de estas hipótesis requerirían nuevos estudios con un mayor número de machos sexualmente maduros, pudiendo establecerse como nuevas líneas de investigación en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, M. J., and Dixson, A. F. (2002). Motility and the midpiece in primates. *Nature* 416, 496. doi:10.1038/416496a.
- Anderson, M. J., Nyholt, J., and Dixson, A. F. (2005). Sperm competition and the evolution of sperm midpiece volume in mammals. *J. Zool.* 267, 135–142. doi:10.1017/S0952836905007284.
- Bajuk, B. P., Zrimšek, P., Pipan, M. Z., Tilocca, B., Soggiu, A., Bonizzi, L., et al. (2020). Proteomic analysis of fresh and liquid-stored boar spermatozoa. *Animals* 10 (4), 553. doi:10.3390/ani10040553.
- Baltz, J. M., Williams, P. O., and Cone, R. A. (1990). Dense fibers protect mammalian sperm against damage. *Biol. Reprod.* 43, 485–491. doi:10.1095/biolreprod43.3.485.
- Barros-García C, García-Párraga D, Marco-Cabedo V, Valls M, Álvaro T, Monreal-Pawłowsky T, Saviano P, Milo C, Sánchez-Calabuig MJ, García-Vázquez FA. Intravaginal artificial insemination in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) using refrigerated semen and medical training. 44th Annual Symposium European Association for Aquatic Mammals. Benidorm, Spain. 11th to 14th of March 2016.
- Belleannée, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L., Dacheux, J. L., and Dacheux, F. (2011). Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J. Proteomics* 74, 59–78. doi:10.1016/j.jprot.2010.07.013.
- Busso, D., Oñate-Alvarado, M. J., Balboa, E., Castro, J., Lizama, C., Morales, G., et al. (2014). Spermatozoa from mice deficient in Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) protein have defective cholesterol content and reduced in vitro fertilising ability. *Reprod. Fertil. Dev.* 26, 609–621. doi:10.1071/RD12059.
- Chen, J., Wang, Y., Wei, B., Lai, Y., Yan, Q., Gui, Y., et al. (2011). Functional expression of ropporin in human testis and ejaculated spermatozoa. *J. Androl.* 32, 26–32. doi:10.2164/jandrol.109.009662.
- Dacheux, J. L., Belleannée, C., Guyonnet, B., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Ecroyd, H., et al. (2012). The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 197–210. doi:10.3109/19396368.2012.663233.
- De Lazari, F. L., Sontag, E. R., Schneider, A., Araripe Moura, A. A., Vasconcelos, F. R., Nagano, C. S., et al. (2020). Proteomic identification of boar seminal plasma proteins related to sperm resistance to cooling at 17 °C. *Theriogenology* 147, 135–145. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.023.
- Druart, X., and de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 194, 33–40. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.04.061.
- Druart, X., Rickard, J. P., Tsikis, G., and de Graaf, S. P. (2019). Seminal plasma proteins as markers of sperm fertility. *Theriogenology* 137, 30–35. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.034.
- Elzanaty, S., Erenpreiss, J., and Becker, C. (2007). Seminal plasma albumin: Origin and relation to the male reproductive parameters. *Andrologia* 39, 60–65. doi:10.1111/j.1439-0272.2007.00764.x.
- Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev. Biol.* 44, 394–436.

- doi:10.1016/0012-1606(75)90411-X.
- Firman, R. C., Tedeschi, J. N., and Garcia-Gonzalez, F. (2020). Sperm sex ratio adjustment in a mammal: perceived male competition leads to elevated proportions of female-producing sperm. *Biol. Lett.* 16. doi:10.1098/rsbl.2019.0929.
- Fisher, H. S., Jacobs-Palmer, E., Lassance, J. M., and Hoekstra, H. E. (2016). The genetic basis and fitness consequences of sperm midpiece size in deer mice. *Nat. Commun.* 7. doi:10.1038/ncomms13652.
- Fujita, A., Nakamura, K. I., Kato, T., Watanabe, N., Ishizaki, T., Kimura, K., et al. (2000). Ropporin, a sperm-specific binding protein of rhophilin, that is localized in the fibrous sheath of sperm flagella. *J. Cell Sci.* 113, 103–112. doi:10.1242/jcs.113.1.103.
- González Villalobos, D., Quintero-Moreno, A., Julián, J., López-Brea, G., Estes, M. C., Rocío Fernández-Santos, M., et al. (2008). Morphometry Characterization of Boar Sperm Head with Computer Assisted Analysis. *Rev. Científica, FCV-LUZ XVIII*, 570–577.
- Gopalakrishnan, B., Aravinda, S., Pawshe, C. H., Totey, S. M., Nagpal, S., Salunke, D. M., et al. (1998). Studies on glutathione S-transferases important for sperm function: Evidence of catalytic activity-independent functions. *Biochem. J.* 329, 231–241. doi:10.1042/bj3290231.
- Hanlon Newell, A. E., Fiedler, S. E., Ruan, J. M., Pan, J., Wang, P. J., Deininger, J., et al. (2008). Protein kinase A RII-like (R2D2) proteins exhibit differential localization and AKAP interaction. *Cell Motil. Cytoskeleton* 65, 539–552. doi:10.1002/cm.20279.
- Kasimanickam, R. K., Kasimanickam, V. R., Arangasamy, A., and Kastelic, J. P. (2019). Sperm and seminal plasma proteomics of high- versus low-fertility Holstein bulls. *Theriogenology* 126, 41–48. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.11.032.
- Kikuchi, M., Mizoroki, S., Kubo, T., Ohiwa, Y., Kubota, M., Yamada, N., et al. (2003). Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 679–684. doi:10.1292/jvms.65.679.
- Kwon, W. S., Oh, S. A., Kim, Y. J., Rahman, M. S., Park, Y. J., and Pang, M. G. (2015). Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci. Rep.* 5. doi:10.1038/srep13821.
- Li, C. jin, Wang, D., and Zhou, X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 173, 1–7. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.08.008.
- Li, Y. F., He, W., Jha, K. N., Klotz, K., Kim, Y. H., Mandal, A., et al. (2007). FSCB, a novel protein kinase A-phosphorylated calcium-binding protein, is a CABYR-binding partner involved in late steps of fibrous sheath biogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 34104–34119. doi:10.1074/jbc.M702238200.
- Li, Y. F., He, W., Mandal, A., Kim, Y. H., Digilio, L., Klotz, K., et al. (2011). CABYR binds to AKAP3 and Ropporin in the human sperm fibrous sheath. *Asian J. Androl.* 13 (2): 266-74. doi:10.1038/aja.2010.149.
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Fernández-Fuertes, B., Recuero, S., Mateo, Y., Bonet, S., et al. (2019). GSTM3, but not IZUMO1, is a cryotolerance marker of boar sperm. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 10, 61. doi:10.1186/s40104-019-0370-5.
- Llavanera, M., Delgado-Bermúdez, A., Mateo-Otero, Y., Padilla, L., Romeu, X., Roca, J., et al. (2020). Exploring seminal plasma GSTM3 as a quality and in vivo fertility biomarker in pigs—relationship with sperm morphology. *Antioxidants* 9, 1–14. doi:10.3390/antiox9080741.

- Lüpold, S., Calhim, S., Immler, S., and Birkhead, T. R. (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 1175–1181. doi:10.1098/rspb.2008.1645.
- Magister, Š., and Kos, J. (2013). Cystatins in immune system. *J. Cancer* 4, 45–56. doi:10.7150/jca.5044.
- Martins, H. S., da Silva, G. C., Cortes, S. F., Paes, F. O., Martins Filho, O. A., Araujo, M. S. S., et al. (2018). Lactoferrin increases sperm membrane functionality of frozen equine semen. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 617–623. doi:10.1111/rda.13148.
- Mogielnicka-Brzozowska, M., Prochowska, S., Nizański, W., Bromke, M. A., Wiśniewski, J., Olejnik, B., et al. (2020). Proteome of cat semen obtained after urethral catheterization. *Theriogenology* 141, 68–81. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.09.003.
- Panner Selvam, M., Agarwal, A., and Baskaran, S. (2019). Proteomic analysis of seminal plasma from bilateral varicocele patients indicates an oxidative state and increased inflammatory response. *Asian J. Androl.* 21, 544–550. doi:10.4103/aja.aja_121_18.
- Parrilla, I., Perez-Patiño, C., Li, J., Barranco, I., Padilla, L., Rodríguez-Martínez, H., et al. (2019). Boar semen proteomics and sperm preservation. *Theriogenology* 137, 23–29. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.05.033.
- Pearl, C. A., and Roser, J. F. (2008). Expression of lactoferrin in the boar epididymis: Effects of reduced estrogen. *Domest. Anim. Endocrinol.* 34, 153–159. doi:10.1016/j.domaniend.2007.01.001.
- Pérez-Patiño, C., Parrilla, I., Barranco, I., Vergara-Barberán, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., et al. (2018). New In-Depth Analytical Approach of the Porcine Seminal Plasma Proteome Reveals Potential Fertility Biomarkers. *J. Proteome Res.* 17, 1065–1076. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00728.
- Peris-Frau, P., Martín-Maestro, A., Iniesta-Cuerda, M., Sánchez-Ajofrín, I., Mateos-Hernández, L., Garde, J. J., et al. (2019). Freezing-thawing procedures remodel the proteome of ram sperm before and after in vitro capacitation. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (18), 4596. doi:10.3390/ijms20184596.
- Petit, F. M., Serres, C., Bourgeon, F., Pineau, C., and Auer, J. (2013). Identification of sperm head proteins involved in zona pellucida binding. *Hum. Reprod.* 28, 852–865. doi:10.1093/humrep/des452.
- Phuyal, S., Suarez, S. S., and Tung, C. K. (2022). Biological benefits of collective swimming of sperm in a viscoelastic fluid. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 1–11. doi:10.3389/fcell.2022.961623.
- Rahman, M. S., Kwon, W. S., and Pang, M. G. (2017). Prediction of male fertility using capacitation-associated proteins in spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 84, 749–759. doi:10.1002/mrd.22810.
- Rego, J. P. A., Crisp, J. M., Moura, A. A., Nouwens, A. S., Li, Y., Venus, B., et al. (2014). Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. *Anim. Reprod. Sci.* 148, 1–17. doi:10.1016/j.anireprosci.2014.04.016.
- Robeck, T. R., and O'Brien, J. K. (2004). Effect of Cryopreservation Methods and Precryopreservation Storage on Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Spermatozoa. *Biol. Reprod.* 70, 1340–1348. doi:10.1095/biolreprod.103.025304.
- Robeck, T. R., Steinman, K. J., Yoshioka, M., Jensen, E., O'Brien, J. K., Katsumata, E., et al. (2005). Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed

- spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction* 129, 659–674. doi:10.1530/rep.1.00516.
- Ryu, D. Y., Song, W. H., Pang, W. K., Yoon, S. J., Rahman, M. S., and Pang, M. G. (2019). Freezability biomarkers in bull epididymal spermatozoa. *Sci. Rep.* 9, 12797. doi:10.1038/s41598-019-49378-5.
- Sirigu, P., Perra, M. T., and Turno, F. (1995). Immunohistochemical study of secretory IGA in the human male reproductive tract. *Andrologia* 27, 335–339. doi:10.1111/j.1439-0272.1995.tb01368.x.
- Soleilhavoup, C., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Kohnke, P. L., Dacheux, J. L., et al. (2014). Ram seminal plasma proteome and its impact on liquid preservation of spermatozoa. *J. Proteomics* 109, 245–260. doi:10.1016/j.jprot.2014.07.007.
- Takenaka, A., Kashiwagi, N., Maezono, Y., Nakao, T., Wano, Y., Kakizoe, Y., et al. (2013). Study on the Ejaculate Characteristics and Liquid Storage of Semen in the Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Japanese J. Zoo Wildl. Med.* 18 (3), 107–114. doi:10.5686/jjzwm.18.107.
- Thomas, C. A., Garner, D. L., Dejarnette, J. M., and Marshall, C. E. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58, 786–793. doi:10.1095/biolreprod58.3.786.
- Valencia, J., Yeste, M., Quintero-Moreno, A., Niño-Cardenas, C. del P., and Henao, F. J. (2020). Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology* 145, 181–189. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.10.023.
- Villaverde-Morcillo, S., García-Sánchez, R., Castaño, C., Rodríguez, E., Gonzalez, F., Estes, M., et al. (2015). Characterization of natural ejaculates and sperm cryopreservation in a golden eagle (*Aquila chrysaetus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 46, 335–338. doi:10.1638/2013-0293R1.1.
- Wichmann, L., Vaalasti, A., Vaalasti, T., and Tuohimaa, P. (1989). Localization of lactoferrin in the male reproductive tract. *Int. J. Androl.* 12 (3), 179–186. doi:10.1111/j.1365-2605.1989.tb01302.x.
- Xu, K., Yang, L., Zhang, L., and Qi, H. (2020). Lack of AKAP3 disrupts integrity of the subcellular structure and proteome of mouse sperm and causes male sterility. *Dev.* 147 (2). doi:10.1242/dev.181057.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Los espermatozoides de delfín mular mantienen su funcionalidad cuando son refrigerados a 5 °C y a una concentración de 100×10^6 espermatozoides/ml durante al menos 7 días. Sin embargo, una mayor temperatura de refrigeración a 15 °C y una menor concentración espermática (20×10^6 espermatozoides/ml) también son alternativas adecuadas para mantener la calidad espermática durante el almacenamiento.
2. Las características morfométricas de los espermatozoides de delfín mular se agrupan en cuatro componentes principales relacionados con la longitud del espermatozoide (1), la forma de la cabeza (2), tamaño de la cabeza pieza intermedia y flagelo (3), y con la anchura de la pieza intermedia (4).
3. Los espermatozoides de delfín mular presentan características morfométricas que permiten clasificar subpoblaciones bien diferenciadas en los eyaculados de un mismo macho y entre diferentes machos.
4. Los niveles de testosterona en sangre se correlacionan positiva y negativamente con determinadas características morfométricas de los espermatozoides de delfín mular. Presentan una correlación positiva con la longitud de la pieza intermedia y la forma de la cabeza espermática, y una correlación negativa con el ancho de la cabeza espermática, la longitud de la pieza principal, el flagelo y la longitud total del espermatozoide.
5. La morfometría espermática del delfín mular se ve modificada por el efecto del tiempo de almacenamiento, mientras que la temperatura de conservación tiene un bajo impacto sobre los cambios morfométricos.
6. Se han identificado un total de 722 proteínas en el semen del delfín mular, de las cuales 419 pertenecen a los espermatozoides y 303 proteínas al plasma seminal. De estas, 111 proteínas son compartidas por ambas, espermatozoides y plasma seminal.
7. Tanto los espermatozoides como el plasma seminal de delfín mular comparten proteínas con el semen del ser humano, toro y perro.

ANEXO I. ABREVIATURAS

ANEXO I: ABREVIATURAS

2D: Dos dimensiones
A: Área de cabeza
ADN: Ácido desoxirribonucleico
AI: *Artificial insemination*
ALH: Amplitud de desplazamiento Lateral de Cabeza/*Amplitude of lateral head displacement*
ART: *Artificial Reproductive Techniques*
BCF; Hz: *Beat cross frequency*
BP: *Biological process*
BTS: *Beltsville Thawing Solution*
CASA: *Computer Assisted Semen Analysis*
CC: *Celullar Components*
CEE: Comunidad Económica Europea
CITES : Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres
CMS: Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres
DMSO: Dimetilsulfóxido
FA: *Formic acid*
IA: Inseminación artificial
L: Longitud de cabeza
LC-MS/MS: *Liquid cromatography with mass spectrometry*
LH: Hormona luteinizante
LIN %: *percentage linearity*
LLDPE: *Linear low-density polyethylene*
MF: *Molecular Function*
ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible
PAM: *Partitioning Around Medoids*
PC: Componentes principales/ *Principal Components*
PCA: Análisis de componentes principales/ *Principal Components Analysis*
PCR: *Polymerase chain reaction*
PUFA: *Polyunsaturated Fatty Acids*
ROS: *Reactive Oxigen Species*
S.aureus: Staphylococcus aureus
SCD: *Sperm Chromatin Dispersion*
SCI: *Science Citation Index*
SPZ: Espermatozoides
STR %: *Percentage Straightness*
TRAs: Técnicas de Reproducción Asistida
TFA: *Trifluoroacetic acid*
UE: Unión Europea
UICN/IUCN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (*International Union for Conservation of Nature*)
UV: luz ultravioleta
VAP: *Average Path Velocity*

VAT: *Visual Assessment of Tendency algorithm*

VCL: *Velocidad Curvilínea/ curvilinear line velocity*

VSL: *Straight Line Velocity*

W: *Anchura de la cabeza*

WOB %: *Percentage Oscillation*

X: *por, unidad de medida de aumento microscópico*

ZP: *Zona pelúcida*

**ANEXO II.
PUBLICACIONES
DERIVADAS DE LA TESIS**

ANEXO II: PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**1. Artículos incluídas en revistas indexadas en el *Science Citation Index (SCI)***

- Ruiz-Díaz S, Luongo C, Fuentes-Albero MC, Abril-Sánchez S, Sánchez-Calabuig MJ, Barros-García C, De la Fe C, García-Galán A, Ros-Santaella JL, Pintus E, García-Párraga D, García-Vázquez FA. Effect of temperature and cell concentration on dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa quality evaluated at different days of refrigeration. Anim Reprod Sci. 2020 Jan; 212:106248. doi: [10.1016/j.anireprosci.2019.106248](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106248).
- Fuentes-Albero MDC, Abril-Sánchez S, Ros-Santaella JL, Pintus E, Luongo C, Ruiz-Díaz S, Barros-García C, Sánchez-Calabuig MJ, García-Párraga D, García-Vázquez FA. Characterization of Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Sperm Based on Morphometric Traits. Biology (Basel). 2021 Apr 22; 10 (5):355. doi: [10.3390/biology10050355](https://doi.org/10.3390/biology10050355).
- Fuentes-Albero MC, González-Brusi L, Cots P, Luongo C, Abril-Sánchez S, Ros-Santaella JL, Pintus E, Ruiz-Díaz S, Barros-García C, Sánchez-Calabuig MJ, García-Párraga D, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ, García-Vázquez FA. Protein Identification of Spermatozoa and Seminal Plasma in Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). Front Cell Dev Biol. 2021 Jul 16; 9:673961. doi: [10.3389/fcell.2021.673961](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.673961).

2. Participaciones en congresos

- Fuentes-Albero MC, Ruiz-Díaz S, García-Párraga D, García-Vázquez FA, Luongo C, Arenarez J. Collection, refrigeration, and subsequent evaluation of dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. Annual Symposium of European Association for Aquatic Animal Mammals (EAAM), 11th-13th March 2021.
- Fuentes-Albero MC, Abril-Sánchez S, Ros-Santaella JL, Pintus E, Luongo C, Ruiz-Díaz S, Barros-García C, Sánchez-Calabuig MJ, García-Párraga D, García-Vázquez FA. Study os sperm subpopulations based on morphometry in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). 52nd Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Annual International Conference, 24th-26th May 2021.
- Fuentes-Albero MC, González-Brusi L, Cots P, Luongo C, Abril-Sánchez S, Ros-Santaella JL, Pintus E, Ruiz-Díaz S, Barros-García C, Sánchez-Calabuig MJ, García-Párraga D, Avilés M, Izquierdo-Rico MJ, García-Vázquez FA. Proteomic study in *Tursiops truncatus* semen. 49th Annual Symposium European Association for Aquatic Mammals (EAAM), 9th-11th March 2022

3. Ponencias divulgativas

- Comunicación oral “Sin pajita por favor” en la Semana de la Mujer y la Niña en la Ciencia 2018 organizada por el Jardín Botánico de la Universitat de València, 13 febrero 2018.
- Participación en “Tesis en 3 minutos”, iniciativa de la Unidad de Cultura Científica de la Universidad de Murcia con la colaboración de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología- Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, 5 enero 2021.
- Póster “Semen submarino” en la European Researcher’s Night MedNight, 2020, iniciativa de la Unidad de Cultura Científica de la Universidad de Murcia, 27 noviembre 2020.

- Participación en el programa divulgativo “Dones i Ciència 2021” organizado por el Jardín Botánico de la Universitat de València, 13 febrero 2021.
- Comunicación Oral “El cuento de la ciencia” en el 4º Encuentro Internacional de Jóvenes Investigadores en las Escuelas Mednigh 2023, 26 septiembre 2023.