



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Puesta a punto y validación
de una técnica económica,
rápida y sencilla para la
estimación de la edad en
odontocetos

María Piñeiro Varela

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Esta obra pertenece a María Piñeiro Varela y está sujeta a una licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite: <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Resumen

La estimación de la edad en animales salvajes es una herramienta esencial para el estudio de la estructura de las poblaciones, la interpretación de determinados datos biológicos y la gestión de los programas de conservación de especies amenazadas. Existen varias formas de estimar la edad de los animales, siendo la técnica más común el conteo de grupos de capas de crecimiento (GLG) en la dentina, un recuento que se puede llevar a cabo empleando diferentes métodos. En este trabajo se ha optado por estimar la edad en odontocetos mediante el conteo de GLG en secciones de dientes lijadas y pulidas, utilizando un estereomicroscopio y un microscopio óptico. Para validar el procedimiento, se compararon los resultados con los obtenidos en secciones descalcificadas de los mismos dientes empleando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada. La Coordinadora para el Estudio de Mamíferos Marinos (CEMMA) proporcionó dientes de 34 animales pertenecientes a las cuatro especies de odontocetos con mayor número de varamientos en la costa gallega: delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*), marsopa común (*Phocoena phocoena*), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y delfín mular (*Tursiops truncatus*). Los mejores resultados, tanto para la identificación de las estructuras dentales como para el conteo de GLG, se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido en los dientes de delfín común, delfín listado y delfín mular. Sin embargo, la microscopía óptica en secciones no tratadas también demostró ser una técnica eficaz para la determinación de la edad en todas las especies, mientras que el proceso de descalcificación solamente mejoró la definición de los GLG en las secciones de dientes de delfín mular, por ser las de mayor tamaño. La microtomografía computarizada permitió identificar algunos GLG, pero no se consiguió completar el conteo en los dientes de delfín mular con la cavidad pulpar más cerrada. En definitiva, esta metodología ha permitido poner a punto en la Facultad de Veterinaria de la USC una técnica económica, rápida y sencilla para la estimación de la edad en odontocetos mediante el conteo de GLG en secciones de dientes lijadas y pulidas, técnica que se ha validado comparando los resultados con los obtenidos en secciones descalcificadas de los mismos dientes empleando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada.

Palabras clave: estimación de la edad, grupos de capas de crecimiento, GLG, cetáceos, odontocetos, dientes, microscopía óptica, estereomicroscopía, microscopía electrónica de barrido, microtomografía computarizada.

Resumo

A estimación da idade en animais salvaxes é unha ferramenta esencial para o estudo da estrutura das poboacións, a interpretación de determinados datos biolóxicos e a xestión dos programas de conservación de especies ameazadas. Existen varias formas de estimar a idade dos animais, sendo a técnica máis común a conta de grupos de capas de crecemento (GLG) na dentina, un recento que se pode levar a cabo empregando diferentes métodos. Neste traballo optouse por estimar a idade en odontocetos mediante a conta de GLG en seccións de dentes lixadas e pulidas, utilizando un estereomicroscopio e un microscopio óptico. Para validar o procedemento, comparáronse os resultados cos obtidos en seccións descalcificadas dos mesmos dentes empregando microscopia óptica, microscopia electrónica de varrido e microtomografía computarizada. Para isto, a Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños (CEMMA) proporcionou dentes de 34 animais pertencentes ás catro especies de odontocetos con maior número de varamentos na costa galega: golfinho común (*Delphinus delphis*), toniña (*Phocoena phocoena*), golfinho riscado (*Stenella coeruleoalba*) e arroaz (*Tursiops truncatus*). Os mellores resultados, tanto para a identificación das estruturas dentais como para a conta de GLG, obtivéronse co microscopio electrónico de varrido para os dentes de golfinho común, golfinho riscado e arroaz. Porén, a microscopia óptica en seccións non tratadas tamén amosou ser unha técnica eficaz para a determinación da idade en todas as especies, mentres que o proceso de descalcificación soamente mellorou a definición dos GLG nas seccións de dentes de arroaz, por ser as de maior tamaño. A microtomografía computarizada permitiu identificar algúns GLG, pero non se conseguiu completar a conta nos dentes de arroaz coa cavidade polpar máis pechada. En definitiva, esta metodoloxía permitiu poñer a punto na Facultade de Veterinaria da USC unha técnica económica, rápida e sinxela para a estimación da idade en odontocetos mediante a conta de GLG en seccións de dentes lixadas e pulidas, técnica que se validou comparando os resultados cos obtidos en seccións descalcificadas dos mesmos dentes empregando microscopia óptica, microscopia electrónica de varrido e microtomografía computarizada.

Palabras chave: estimación da idade, grupos de capas de crecemento, GLG, cetáceos, odontocetos, dentes, microscopia óptica, estereomicroscopia, microscopia electrónica de varrido, microtomografía computarizada.

Abstract

Age estimation in wild animals is an essential tool for the study of populations structure, the interpretation of certain biological data and the management of conservation programmes for endangered species. There are several ways to estimate the age of animals, being the most common technique the counting of growth layer groups (GLGs) in dentine, which can be carried out using different methods. In this work, the age of odontocetes has been estimated by counting GLGs in ground and polished teeth sections, using a stereomicroscope and a light microscope. Besides, the procedure has been validated by comparing the results with those obtained on decalcified sections from the same teeth using light microscopy, scanning electron microscopy and microcomputed tomography. For this purpose, the Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños (CEMMA) provided teeth from 34 animals belonging to the four species of odontocetes with the highest number of strandings on the Galician coast: short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*), harbour porpoise (*Phocoena phocoena*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). The best results, both for the identification of dental structures and for GLGs count, were obtained with scanning electron microscopy in common dolphin, striped dolphin and bottlenose dolphin teeth. However, light microscopy on untreated sections was also proved to be an effective technique for age determination in all species, while the decalcification process only improved the definition of GLGs in the bottlenose dolphin teeth sections, as they were the largest. Microcomputed tomography allowed the identification of some GLGs, but it was not possible to complete the count in bottlenose dolphin teeth with a more closed pulp cavity. In short, this methodology has made it possible to develop an economical, fast and simple technique at the Faculty of Veterinary Medicine of the USC for the estimation of age in odontocetes by counting GLGs in sanded and polished teeth sections, a technique that has been validated by comparing the results with those obtained in decalcified sections of the same teeth using light microscopy, scanning electron microscopy and microcomputed tomography.

Keywords: age estimation, growth layer groups, GLG, cetaceans, odontocetes, teeth, light microscopy, stereomicroscopy, scanning electron microscopy, microcomputed tomography.

ABREVIACIONES

CEMMA: Coordinadora para o Estudio dos Mamíferos Mariños

DDE: *Delphinus delphis* (Delfín común de hocico corto)

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GLG: Grupos de capas de crecimiento (del inglés, *growth layer groups*)

LT: Longitud total (en cm), medida desde el extremo más rostral de la cara hasta a hendidura entre los lóbulos de la aleta caudal

MEB: Microscopía electrónica de barrido; microscopio electrónico de barrido

Micro-TC: Micrografía computarizada

ONG: Organización no gubernamental

PPH: *Phocoena phocoena* (Marsopa común)

RDO: Rapid Decalcification Solution

r.p.m.: Revoluciones por minuto

SCO: *Stenella coeruleoalba* (Delfín listado)

TTR: *Tursiops truncatus* (Delfín mular)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Métodos para la estimación de la edad absoluta	9
1.1.1. Morfología de los dientes.....	10
1.1.2. Métodos para la determinación de los grupos de capas de crecimiento (GLG).....	12
1.1.3. Otros métodos para la estimación de la edad absoluta en cetáceos.....	14
1.2. Métodos para la estimación de la edad relativa	15
1.3. Descripción de los odontocetos estudiados	16
1.3.1. Delfín común de hocico corto (<i>Delphinus delphis</i>).....	16
1.3.2. Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>).....	17
1.3.4. Delfín listado (<i>Stenella coeruleoalba</i>)	18
1.3.5. Marsopa común (<i>Phocoena phocoena</i>).....	18
2. OBJETIVOS.....	20
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.1. Toma de muestras.....	21
3.2. Lijado y pulido	23
3.3. Descalcificación	24
3.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	24
3.5. Microtomografía computarizada (micro-TC).....	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Almacenamiento de los dientes	26
4.2. Obtención de las secciones	26
4.3. Descalcificación	26
4.4. Estructura dental.....	26
4.5. Contaje de GLG.....	28
4.6. Contaje de GLG en secciones lijadas y pulidas.....	29
4.7. Contaje de GLG en secciones descalcificadas	31
4.8. Contaje de GLG en el microscopio electrónico de barrido.....	32
4.9. Contaje de GLG con microtomografía computarizada	34
5. DISCUSIÓN.....	36
6. CONCLUSIONES.....	41
7. BIBLIOGRAFÍA.....	42

1. INTRODUCCIÓN

La estimación de la edad en animales salvajes aporta información fundamental para el estudio de la biología de las especies, tanto a nivel individual como para comprender los modelos dinámicos poblacionales. Estos modelos describen y predicen las variaciones en el tamaño y la estructura de las poblaciones a lo largo del tiempo (Hohn, 2018; Olson *et al.*, 2022; Read *et al.*, 2018).

El conocimiento de la edad de los individuos permite definir la longevidad y las tasas de natalidad y mortalidad de una especie, lo que posibilita proyectar la trayectoria de las poblaciones en el tiempo (Campana y Stewart, 2014; Mbizah *et al.*, 2016; Murphy *et al.*, 2014; Rouby *et al.*, 2020). Por otro lado, estimar el momento de maduración sexual proporciona información acerca del ciclo reproductivo de una especie, del potencial reproductivo de una población y, por tanto, de su capacidad de recuperación (Kesselring *et al.*, 2017; Schwacke *et al.*, 2022).

Además del uso tradicional para estudiar la estructura de las poblaciones, la estimación de la edad también puede emplearse para interpretar los efectos de la bioacumulación de toxinas y sustancias contaminantes en la salud de los animales (Hohn, 2018; Read *et al.*, 2018). Adicionalmente, algunas de las muestras empleadas para la determinación de la edad, como los dientes, también aportan información acerca de la salud, la madurez, el sexo, la historia reproductiva y la influencia de factores ambientales en el estado general de los individuos (Lockyer, 1995).

Los mamíferos marinos, y más específicamente los cetáceos, son motivo de preocupación desde hace décadas debido a su baja tasa reproductiva y a su vulnerabilidad ante las agresiones antrópicas derivadas fundamentalmente de la actividad pesquera, uno de los principales factores que influyen en la incidencia de varamientos (Aguilar *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2017). Por tanto, además de lo mencionado anteriormente, estimar la edad en estas especies es esencial para conocer la repercusión que dichas actividades humanas generan sobre ellas con el objetivo de mejorar las estrategias de mitigación (Henriksen *et al.*, 2024).

Las aguas que bañan los aproximadamente 1500 km de costa gallega son muy ricas en nutrientes debido al fenómeno del afloramiento: ascenso estacional de agua profunda rica en nutrientes cerca de la costa (López, 2018). Esta riqueza nutritiva explica la elevada biodiversidad que sustenta, contabilizándose hasta 24 especies de cetáceos, pero también la intensa actividad pesquera que se desarrolla en esta área; fruto de esta coexistencia, las costas gallegas son el escenario de numerosos varamientos de cetáceos muertos, enfermos o aparentemente sanos (López *et al.*, 2015; Saavedra *et al.*, 2017). En 2023 se alcanzó la cifra récord de 592 cetáceos varados en un solo año en Galicia (delfín común de hocico corto,

Delphinus delphis: 433 individuos; delfín mular, *Tursiops truncatus*: 42 individuos; delfín listado, *Stenella coeruleoalba*: 20 individuos; marsopa común, *Phocoena phocoena*: 14 individuos; y varias especies de ballenas: 12 individuos). De los cetáceos varados en buen estado como para ser valorados, el 42,3% mostraban indicios claros de haber muerto consecuencia de interacciones con artes de pesca (Rede de Varamientos de Galicia [REVARGAL], 2023). En los varamientos de animales vivos la información sobre su edad permite tomar decisiones acerca de su liberación, rehabilitación o eutanasia. Por otro lado, la determinación de los grupos demográficos afectados en varamientos masivos o eventos de mortalidad inusuales puede ayudar a comprender los factores subyacentes y las posibles consecuencias para las poblaciones (Calzada *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2007).

Sin embargo, la estimación de la edad en mamíferos marinos puede suponer un verdadero desafío debido a sus hábitats difícilmente accesibles y a su naturaleza esquiva, por lo que las oportunidades de adquirir información suficiente o de llevar a cabo la toma de muestras son limitadas (Herrman *et al.*, 2020). Además, en el caso de los cetáceos, la ausencia de rasgos fenotípicos externos asociados a la edad una vez alcanzado el tamaño adulto, las grandes dimensiones de las poblaciones y los comportamientos migratorios dificultan todavía más la tarea (Barrett *et al.*, 2024). Es por ello que en la mayoría de los casos se trabaja con estimaciones de edad relativa o categórica clasificando a los animales en grupos de edades (como neonato, juvenil y adulto), una clasificación que, aunque simple, aporta información valiosa en múltiples campos de investigación y determinados aspectos de su medicina. Sin embargo, existen varias técnicas para estimar la edad cronológica o absoluta de los especímenes que proporcionan unidades medibles (normalmente en años) (Herrman *et al.*, 2020; Hohn, 2018; Laws, 1952).

1.1. Métodos para la estimación de la edad absoluta

El método más extendido para la estimación de la edad absoluta de los individuos es el contaje de grupos de capas de crecimiento (*growth layer groups*, GLG) que, según Perrin y Myrick (1980), son “patrones repetitivos o semirrepetitivos de grupos adyacentes de capas de crecimiento incremental dentro de la dentina, cemento o hueso que se definen como una unidad contable. Dicha unidad debe involucrar como mínimo un cambio: de transparente a opaco, de oscuro a claro, de cresta a surco o de más a menos teñido”. Numerosos estudios han concluido que la tasa de depósito de estos GLG en los dientes de odontocetos es anual (Hohn *et al.*, 1989; Myrick *et al.*, 1984; Perrin y Myrick, 1980).

Los factores que gobiernan la formación de GLG son desconocidos, pero es probable que la tasa de depósito se vea influenciada por cambios estacionales, nutritivos, la tasa de crecimiento y el

estado de salud de cada animal (Barratclough *et al.*, 2023). La comprensión de este proceso ayudaría a determinar las variaciones individuales en su formación (Hohn *et al.*, 1989).

El conteo de GLG puede llevarse a cabo en estructuras calcificadas como dientes y huesos, en estructuras queratinizadas como garras y barbas, pero también en formaciones tan sorprendentes como en los tapones de cera de los oídos de las ballenas. Sin embargo, la estructura de elección tanto en mamíferos marinos como en terrestres son los dientes, puesto que son fáciles de manejar y almacenar, se pueden recoger durante las necropsias y en ocasiones también directamente de los animales vivos, permitiendo tomar en ambos casos más de una muestra de un mismo espécimen (revisado por Evans *et al.*, 2007 y Read *et al.*, 2018). Además, como los tejidos dentales están muy mineralizados, los patrones de depósito permanecen inalterados durante la vida y tras la muerte de los individuos (Medill *et al.*, 2009). Otra ventaja de los dientes es la posibilidad de extrapolar la cadencia de depósito de GLG de especies con datos conocidos a especies relacionadas (Hohn, 1990, citado por Read *et al.*, 2018), ya que los patrones de formación de GLG anuales en los tejidos duros son similares para mamíferos taxonómicamente próximos (Klevezal, 1980).

Myrick *et al.* (1983) establecieron cuatro requerimientos básicos para poder determinar la edad de los odontocetos a partir de GLG en dientes:

1. Conocimiento del tiempo de depósito y distribución de los tejidos dentales, diferenciando la transición entre el tejido prenatal y postnatal para determinar el punto exacto a partir del cual comenzar el conteo de GLG.
2. Utilización de un sistema de preparación de los dientes fiable y efectivo, que aporte una resolución clara de GLG.
3. Definición del patrón exacto de GLG para cada preparación y para cada especie, con el objetivo de realizar un conteo consistente.
4. Demostración del tiempo que representa cada GLG para poder relacionar su número con la edad.

1.1.1. Morfología de los dientes

Como describen Lockyer *et al.* (2010), los dientes de los mamíferos marinos están compuestos principalmente por fosfato cálcico y se dividen en tres partes morfológicas: raíz, cuello y corona. La cavidad pulpar es la cámara central del diente —ocupada por tejido conectivo, vasos y nervios— y está rodeada por dentina, que es el tejido calcificado básico que le da forma al diente. Esta dentina está recubierta externamente por otros tejidos calcificados: el esmalte en la corona y el cemento en la raíz. En el cuello es donde se fija la encía al diente (Figura 1).

Los cetáceos con dientes u odontocetos y la mayoría de los pinnípedos son monofiodontos, es decir, les hace erupción un único juego de dientes en los que se va a registrar el crecimiento

postnatal completo de cada individuo (Read *et al.*, 2018). Cuando hacen erupción, estos dientes están formados por dentina prenatal y recubiertos de una fina capa de esmalte en la corona; la dentina prenatal presenta internamente, limitando la cavidad pulpar, una capa translúcida de dentina que se denomina línea neonatal. La línea neonatal es la primera de una serie de capas de dentina postnatal que se van a ir depositando de manera centrípeta durante toda la vida del animal, ocluyendo progresivamente la cavidad pulpar, los GLG (Barrett *et al.*, 2024; Hohn, 1980a; Myrick *et al.*, 1983) (Figura 1). El cemento comienza a depositarse en la raíz de forma centrífuga e ilimitada tras el nacimiento, registrando también toda la vida del individuo (Myrick *et al.*, 1983).

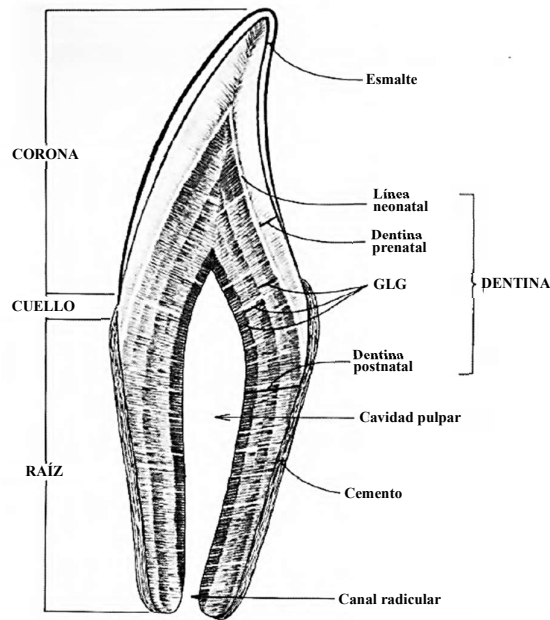


Figura 1. Morfología dental. (Modificado de Perrin y Myrick, 1980).

Por tanto, los GLG pueden encontrarse tanto en la dentina como en el cemento y en algunas especies pueden utilizarse ambos para estimar la edad (Perrin y Myrick, 1980). En el caso de los delfinidos, Myrick *et al.* (1983) recomiendan evaluar en primer lugar la dentina y la condición de la cavidad pulpar. Si las líneas de crecimiento son claras y regulares, el contaje debe hacerse en la dentina. Sin embargo, según Lockyer *et al.* (2010), en la mayoría de los pinnípedos se utilizan los GLG depositados en el cemento para determinar la edad de los individuos, pues como la oclusión de la cavidad pulpar tiene lugar a edades tempranas, la dentina no es una estructura fiable para llevar a cabo el contaje. Por tanto, la dentina debe utilizarse para la estimación de la edad en especies en las que la oclusión de la cavidad pulpar es tardía, mientras que el cemento es el tejido de elección para el resto de los casos (revisado por Read *et al.*, 2018).

Por otro lado, los mamíferos pueden presentar una dentición heterodonta u homodonta. Prácticamente todos los odontocetos son homodontos, es decir, todos sus dientes tienen la misma morfología independientemente de su posición en la arcada dentaria, por lo que la estimación de la edad no debería verse influenciada por los dientes seleccionados (Read *et al.*, 2018). Sin embargo, con el objetivo de estandarizar el método, Kuiken y Hartmann (1991) recomiendan que si es posible se deben retirar por lo menos cuatro dientes de la parte media de la hemimandíbula izquierda.

En las especies heterodontas existen variaciones en el número de GLG entre los distintos dientes y, además, los dientes que ofrecen una estimación de la edad más precisa varían dependiendo de la especie (revisado por Read *et al.*, 2018). Bernt *et al.* (1996) concluyeron que las estimaciones de edad a partir de dientes caninos son más precisas que si se emplean incisivos.

En cuanto a la tasa de depósito de los GLG, diversos estudios han confirmado que es anual. Primero se comprobó mediante su conteo en dientes de delfines mulares en cautividad y, por tanto, de edad conocida (Sergeant, 1959). Hohn *et al.* (1989) confirmaron estos resultados en animales en libertad mediante la toma de muestras durante ocho temporadas consecutivas en individuos cuya edad había sido estimada al poco tiempo de nacer en base a su longitud. El mismo resultado obtuvieron Myrick *et al.* (1984) mediante la administración intramuscular de tetraciclina a varios delfines comunes de hocico largo (*Delphinus capensis*) durante un año a intervalos de 3 meses, realizando una extracción dental semestral. La tetraciclina funciona como un biomarcador ya que se acumula en la dentina inmediatamente tras su administración, por lo que la visualización del patrón de los GLG con las marcas de tetraciclina permitió corroborar que cada GLG correspondía a un año.

Es habitual que diferentes observadores estimen edades distintas para un mismo individuo. Esto suele ser debido a la presencia de capas accesorias, capas finas o translúcidas en la capa opaca de un GLG. Estas capas accesorias pueden resultar difíciles de distinguir dentro de un GLG, influyendo en la precisión del conteo (Hohn, 1980a).

1.1.2. Métodos para la determinación de los grupos de capas de crecimiento (GLG)

La existencia de capas concéntricas en la dentina de los mamíferos marinos fue descrita por primera vez por Owen (1845). En 1950, Scheffer sugirió emplear estas líneas para determinar la edad en un oso marino ártico (*Callorhinus ursinus*) y Laws (1952, 1953) en un cachalote (*Physeter macrocephalus*). En los años siguientes los GLG fueron utilizados como indicadores de la edad en diferentes especies de cetáceos por Nishiwaki y Yagi (1953, 1954), Omura *et al.* (1955) y Nishiwaki *et al.* (1958) (citados por Hohn, 1980a). Las capas de crecimiento anuales

en los tejidos duros de los mamíferos terrestres fueron descritas más tarde (Klevezal y Kleinenberg, 1969; Sergeant, 1967).

En 1959, Sergeant describió los GLG en los dientes de cuatro delfines mulares criados en cautividad y en todos los casos el número de GLG contados en cada diente coincidió con la edad conocida o estimada de los animales. Tras demostrar que en la dentina de otras especies (calderón común, *Globicephala melas*; delfín común de hocico corto, *Delphinus delphis* y delfín de flancos blancos del atlántico, *Lagenorhynchus acutus*) también se observaban capas de crecimiento similares a las de *T. truncatus*, los GLG comenzaron a utilizarse ampliamente para la determinación de la edad en odontocetos (revisado por Hohn, 1980a).

En la actualidad existen numerosas técnicas para el conteo de GLG en dentina (Barrett *et al.*, 2024). Tras la obtención de los dientes, su preparación para la estimación de la edad puede llevarse a cabo fundamentalmente a partir de dos métodos: secciones de dientes sin tratar o secciones descalcificadas (revisado por Read *et al.*, 2018).

La visualización al microscopio óptico de secciones gruesas (2-3 mm) de dientes sin tratar es un método rápido y sencillo, que ha aportado buenos resultados en especies como la foca gris (*Halichoerus grypus*) (Lockyer *et al.*, 2010). En la marsopa común (*Phocoena phocoena*), Henriksen *et al.* (2024) contaron GLG en la dentina con este abordaje, simplemente puliendo los dientes en paralelo al eje longitudinal hasta alcanzar la línea media y observando la muestra directamente con un microscopio binocular a 25x, sin necesidad de llevar a cabo su descalcificación. Sin embargo, esta metodología ha sido descartada en varias especies por subestimar el número de GLG al incrementar las variaciones entre lectores, como es el caso de la foca ocelada (*Pusa hispida*) (Stewart *et al.*, 1996).

La descalcificación consiste en la eliminación del calcio superficial de una sección de diente al sumergirlo en ácido (nitrúico, fórmico o hidroclóricúo) o en un agente quelante como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). El proceso de descalcificación termina cuando la muestra se ha reblandecido o bien cuando un test de turbidez de oxalato amónico detecta la presencia de iones de calcio en la solución descalcificadora. Tras la descalcificación, los GLG se visualizan como parejas de crestas y surcos alternos (Hohn, 1980b; Yalman *et al.*, 1959). Este método sirve para la mayoría de especies de odontocetos de gran tamaño, pero los GLG son difíciles de contar en odontocetos pequeños y en fócidos, por lo que es necesario combinarlo con la obtención de secciones más finas y una tinción para mejorar su definición (Pierce y Kajimura, 1980, citados por Evans y Robertson, 2001).

Tras la descalcificación de la muestra, el corte del diente debe realizarse en el plano vestibulo-lingual utilizando un microtomo de congelación o un criostato. El grosor de las secciones recomendado para contar los GLG en la dentina es de 20-25 μm y de 10-25 μm para el cemento

(revisado por Read *et al.*, 2018). Después, las secciones se tiñen para ser visualizadas al microscopio óptico. Barret *et al.* (2024) compararon diferentes agentes descalcificadores (EDTA 10%, solución de Kristensen y RDO [*Rapid Decalcification Solution*]) y tinciones (Hematoxilina y Eosina, Hematoxilina, Giemsa, Wright-Giemsa, Azul de Toluidina, Tricrómico de Masson y Rojo Congo) en dientes de delfín mular, llegando a la conclusión de que el método de descalcificación Kristensen, posterior tinción con Tricrómico de Masson o Rojo Congo y observación bajo luz polarizada ofrecían los mejores resultados.

Hohn (1980b) demostró que la microrradiografía y la microscopía electrónica de barrido (MEB) son técnicas más precisas para determinar los GLG que los métodos convencionales anteriormente descritos y basados en la observación de secciones al microscopio óptico. La microrradiografía permite valorar las variaciones en la densidad mineral de los tejidos mediante el uso de rayos X, mostrándose cada GLG como el conjunto de una capa radiopaca y otra radiolúcida, indicando que cada una de ellas está formada por un área hipermineralizada y otra hipomineralizada. Para esta autora, sin embargo, la MEB es la técnica más sencilla para distinguir GLG en muestras de dientes descalcificados, ofreciendo una imagen tridimensional de la superficie de la sección dental en forma de crestas y surcos (Hohn, 1980b).

Tras el fracaso de otras técnicas alternativas no invasivas para la determinación de la edad como la resonancia magnética (RM) o la tomografía computarizada (TC) (Alstrup *et al.*, 2017; Loch *et al.*, 2013), Baier-Stegmaier *et al.* (2023) demostraron que la microtomografía computarizada (micro-TC) permite visualizar las capas de crecimiento en los dientes de carnívoros y odontocetos. La micro-TC aporta imágenes bidimensionales en diferentes ángulos a partir de una imagen completa en tres dimensiones del objeto de estudio, basándose en las variaciones en la absorción de los rayos X dependiendo de las diferencias en densidad y en número atómico del material investigado. Como permite trabajar con dientes enteros, no requiere de unas preparaciones tan laboriosas y destructivas de las muestras, por lo que es una técnica muy valiosa para muestras que necesitan ser preservadas (Baier-Stegmaier *et al.*, 2023).

1.1.3. Otros métodos para la estimación de la edad absoluta en cetáceos

Con el objetivo de encontrar una técnica alternativa, precisa y menos invasiva que el contaje de GLG, Herrman *et al.* (2020) describieron el uso de la radiografía dental periapical para estimar la edad in vivo en pequeños cetáceos midiendo el ratio del área pulpa:diente. Esta metodología se basa en la oclusión gradual de la cavidad pulpar con la edad, por lo que solamente permite establecer la edad cronológica en animales menores de 10 años, ya que a medida que la edad aumenta y la cavidad pulpar se cierra, la precisión de la estimación disminuye. Es una técnica sencilla de usar en condiciones de campo, que permite detectar y descartar los dientes no vitales

y además aporta información de manera rápida y no invasiva, por lo que puede emplearse en animales vivos sin la necesidad de extraer el diente (Herrman *et al.*, 2020).

Barratclough *et al.* (2019) demostraron que las radiografías dorsoventrales de las aletas pectorales de los delfines mulares permitían establecer la edad cronológica de los individuos mediante la determinación del grado de fusión de las placas epifisarias. Se trata de una técnica muy precisa en animales jóvenes, hasta que las epífisis se consolidan; más allá de ese punto, la edad se estima mediante la evaluación de los cambios degenerativos en huesos y articulaciones, un proceso que puede verse influenciado por múltiples factores (como predisposición genética, infección, daño previo o desórdenes metabólicos) y, por tanto, genera una mayor discrepancia en individuos a partir de los 25 años (Barratclough *et al.*, 2019).

Los últimos avances en epigenética han abierto alternativas menos invasivas y más precisas para la determinación de la edad de los animales. Se basan en la utilización de los patrones de metilación del ADN como biomarcadores de la edad y actualmente se consideran los mejores predictores de la edad (Barratclough *et al.*, 2021; Peters *et al.*, 2022). La metilación del ADN consiste en la adición de grupos metilo (CH₃) a sitios específicos de citosina-fosfato-guanina (CpG) en la secuencia de ADN, una adición directamente relacionada con la edad cronológica. Se han elaborado diferentes patrones basados en muestras de piel y/o sangre (Barratclough *et al.*, 2021), algunos de ellos son multiespecíficos y otros específicos, siendo estos últimos evidentemente más precisos, aunque las edades estimadas a partir de patrones diseñados para especies próximas entre sí pueden ser similares (Peters *et al.*, 2022). En el caso de los cetáceos, Barratclough *et al.* (2021) demostraron que los patrones de metilación también son específicos para cada tejido.

1.2. Métodos para la estimación de la edad relativa

En ocasiones no es posible conseguir las muestras necesarias para estimar la edad absoluta de una especie; también es posible que no se haya validado un método que permita hacerlo para alguna especie en concreto. En estos casos, se lleva a cabo la estimación de la edad relativa, que permite clasificar a los animales en neonatos, juveniles y adultos con el objetivo de aproximarse lo máximo posible a la edad absoluta (Read *et al.*, 2018).

Entre los métodos que permiten establecer la edad relativa en mamíferos marinos se encuentran (Read *et al.*, 2018): determinación de la densidad mineral ósea de las aletas de los delfines (Butti *et al.*, 2007; Guglielmini *et al.*, 2002), medición de la longitud de los telómeros (Izzo *et al.*, 2011; Olsen *et al.*, 2014), racemización del ácido aspártico en los dientes y en el núcleo del cristalino (Bada *et al.*, 1980), análisis de la trazabilidad de los ácidos grasos (Koopman *et al.*, 1996; Herman *et al.*, 2009), conteo de los cuerpos blancos y lúteos ováricos en hembras maduras (Chittleborough, 1959), detección de cambios de coloración del pelaje o la piel con la

edad (Caron y Smith, 1990), determinación de patrones de proporciones de isótopos de carbono estables (Lubetkin *et al.*, 2008), radiometría de la bulla timpánica para determinar el desequilibrio entre el ^{210}Pb y el ^{226}Ra (Kastelle *et al.*, 2003), medición del peso del cristalino (Bauer *et al.*, 1964) y análisis morfométricos (Blundell y Pendleton, 2008).

En este trabajo se ha llevado a cabo la estimación de la edad cronológica en varias especies de odontocetos mediante el contaje de GLG en dentina comparando los resultados obtenidos con diferentes técnicas: estereomicroscopía, microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada. Para ello se ha contado con dientes procedentes de individuos de delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*), delfín mular (*Tursiops truncatus*), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y marsopa común (*Phocoena phocoena*), las cuatro especies que más varan en las costas de Galicia (REVARGAL, 2023).

Estos cuatro odontocetos pertenecen al Orden Artiodactyla, Infraorden Cetacea, Parvorden Odontoceti. Las tres especies de delfines pertenecen a la Familia Delphinidae, mientras que la marsopa común se incluye en la Familia Phocoenidae (Rosel *et al.*, 2023). Dado que las especies objeto de este trabajo no se encuentran entre las estudiadas habitualmente en el Grado en Veterinaria, conviene realizar una breve descripción morfológica de cada una de ellas.

1.3. Descripción de los odontocetos estudiados

1.3.1. Delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*)

El delfín común de hocico corto o *golfinho* común es la especie que vara más frecuentemente en toda la costa de Galicia. Su hábitat se localiza principalmente entre los 100 y 200 m de profundidad, normalmente fuera de las Rías (López, 2003 y 2018).

Presenta el dorso de color negro formando un triángulo invertido a nivel de la aleta dorsal, el costado es amarillento en la parte anterior y gris en la mitad posterior, mientras que la zona ventral es de color blanco. Muestra un pico pronunciado, aletas pectorales largas y afiladas y una aleta dorsal alta y en forma de medialuna (Figura 2). En cuanto a la dentadura, presenta de 40 a 60 dientes cónicos de 2,5-3 mm de diámetro en cada hemiarcada (López 2003, 2018; López *et al.*, 2015).

El tamaño de los individuos neonatos en Galicia es de aproximadamente 100 cm. En torno a los 8-9 años los machos alcanzan la edad de madurez sexual con una longitud superior a los 205-208 cm, mientras que las hembras maduran sexualmente a los 5-7 años presentando un tamaño superior a los 188 cm (López, 2003 y 2018). Su esperanza de vida es de 25-30 años (López *et al.*, 2015).

Está considerada como una especie de preocupación menor por la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) (Genov, 2023) y pertenece al

Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial (LESRPE) del Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico [MITECO], 2023).

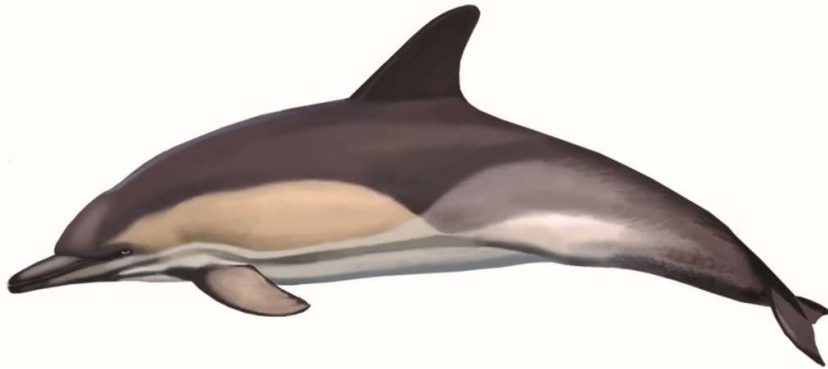


Figura 2. Morfología externa del delfín común de hocico corto (Delphinus delphis). Se muestra un ejemplar adulto. Fuente: cedida por Alfredo López (Tokio Ilustración).

1.3.2. Delfín mular (*Tursiops truncatus*)

Es una especie ampliamente distribuida por aguas templadas y tropicales, tanto costeras como profundas (Uriarte *et al.*, 2021). En Galicia es más frecuente en la costa occidental en zonas de menos de 20 m de profundidad, siendo también habitual en las Rías (López, 2003 y 2018).

Muestran una coloración grisácea, más oscura en el área del lomo y más clara en el vientre (López *et al.*, 2015). Son animales robustos, con el pico corto, las aletas pectorales largas y afiladas y la aleta dorsal con forma de medialuna (López, 2003 y 2018) (Figura 3). Presentan de 21 a 26 dientes cónicos y puntiagudos de 5-7,5 mm de diámetro en cada hemiarcada (López *et al.*, 2015).

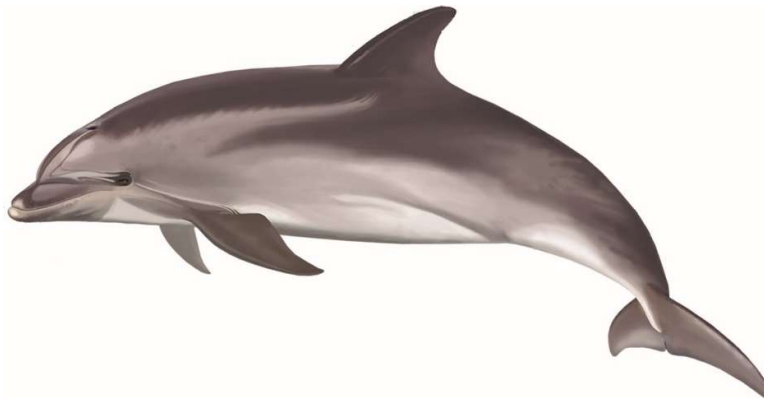


Figura 3. Morfología externa del delfín mular (Tursiops truncatus). Se muestra un ejemplar adulto. Fuente: cedida por Alfredo López (Tokio Ilustración).

La longitud de los neonatos se encuentra entre los 100-120 cm. Los machos alcanzan la maduración sexual sobre los 9-14 años con una longitud aproximada de 300 cm, llegando a alcanzar un tamaño máximo de 338 cm; en las hembras la madurez sexual se alcanza entre los

5-13 años con 277 cm de longitud, pudiendo llegar a medir 331 cm. Tienen una esperanza de vida de 30-40 años (López, 2003; López *et al.*, 2015; Uriarte *et al.*, 2021).

Se considera una especie en preocupación menor por la Lista Roja de la UICN (Wells *et al.*, 2019) y vulnerable en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas (MITECO, 2023).

1.3.4. Delfín listado (*Stenella coeruleoalba*)

El delfín listado o *golfinho riscado* es una especie ampliamente distribuida por las aguas templadas de los océanos Pacífico y Atlántico, pero poco frecuente en la costa gallega (López, 2003; López *et al.*, 2015).

Son animales esbeltos, con el pico largo, la aleta dorsal triangular y las pectorales cortas. El dorso es de color azulado y está atravesado por una franja más clara en forma de hoz. La parte ventral es de color blanquecino y muestra varias líneas blancas y negras por todo el cuerpo (Figura 4). Presentan de 40 a 50 dientes en cada hemiarcada, con morfología cónica y de 2,5 mm de diámetro (López *et al.*, 2015).



*Figura 4. Morfología externa del delfín listado (*Stenella coeruleoalba*). Se muestra un ejemplar adulto. Fuente: cedida por Alfredo López (Tokio Ilustración).*

Las crías nacen con 90 cm de longitud (López *et al.*, 2015). Los machos maduran sexualmente en torno a los 9 años con un tamaño comprendido entre los 195 y 220 cm (Perrin y Reilly, 1984, como se citó en López, 2003). La maduración sexual en las hembras ocurre entre los 3 y los 10 años, al alcanzar una longitud total media de 200 cm. La longevidad estimada de esta especie es de 30 años (López, 2003; López *et al.*, 2015).

Pertenece al Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial (LESRPE) del Catálogo Nacional de Especies Amenazada (MITECO, 2023) y es considerada como una especie de preocupación menor por la Lista Roja de la UICN (Braulik, 2019).

1.3.5. Marsopa común (*Phocoena phocoena*)

La marsopa común se distribuye por todo el hemisferio norte. En la costa gallega se denomina *toniña* y es poco frecuente, siendo más abundante en el área suroccidental (López, 2003; López *et al.*, 2015).

Presenta una coloración negra en el dorso y blanca ventralmente, con la aleta dorsal triangular y las aletas pectorales negras y con el extremo redondeado. Su cuerpo es robusto y carece de pico (Figura 5). Tiene de 40 a 60 dientes por hemiarcada, de 3 mm de diámetro y morfología espatulada (López *et al.*, 2015).



Figura 5. Morfología externa de la marsopa común (Phocoena phocoena). Se muestra un ejemplar adulto y una cría. Fuente: cedida por Alfredo López (Tokio Ilustración).

Al nacimiento, las crías presentan un tamaño de 80 cm. Los machos alcanzan la maduración sexual alrededor de los 5 años con 155 cm de longitud, mientras que en las hembras sucede a los 3 años con 166 cm, superando el tamaño de los machos pudiendo llegar a medir 202 cm. Se estima que pueden vivir más de 25 años (López, 2003; López *et al.*, 2015).

Como especie global, la Lista Roja de la UICN la cataloga en el grupo de especies consideradas de preocupación menor (Braulik *et al.*, 2020). Sin embargo, la población que asienta en aguas de Galicia ya fue declarada en 2007 como “vulnerable” (Decreto 88/2007), calificación que alcanzó en 2011 en el resto del estado español (Real Decreto 139/2011), pasando a ser recalificada como “en peligro de extinción” en 2020 (Orden TED/1126/2020, de 20 de noviembre).

2. OBJETIVOS

Con la realización de este trabajo se pretenden alcanzar dos objetivos:

1. Poner a punto en la Facultad de Veterinaria de la USC una técnica económica, rápida y sencilla para la estimación de la edad en odontocetos mediante el contaje de grupos de capas de crecimiento (GLG) en secciones de dientes lijadas y pulidas utilizando un microscopio óptico y un estereomicroscopio.
2. Comprobar la validez de la técnica comparando los resultados con los que se obtengan en las mismas muestras descalcificadas empleando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo la estimación de la edad cronológica en odontocetos mediante el conteo de GLG en dentina, se han utilizado dientes procedentes de cuatro especies de cetáceos: delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*), marsopa común (*Phocoena phocoena*), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) y delfín mular (*Tursiops truncatus*). A partir de estos dientes se obtuvieron secciones longitudinales que se analizaron empleando estereomicroscopía, microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (MEB) y microtomografía computarizada (micro-TC).

3.1. Toma de muestras

Las muestras utilizadas en la elaboración de este trabajo fueron facilitadas por la Coordinadora para el Estudio de los Mamíferos Mariños (CEMMA), ONG que desde 1999 es la responsable de la Red de Varamientos de Galicia con la colaboración económica de la Xunta de Galicia (Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Vivenda).

En total se emplearon dientes procedentes de 34 animales varados entre los años 2009-2024 en distintos puntos de la costa gallega: 7 ejemplares de delfín común de hocico corto (DDE), 7 ejemplares de marsopa común (PPH), 9 ejemplares de delfín listado (SCO) y 11 ejemplares de delfín mular (TTR).

La Figura 6 muestra la morfología externa de los dientes de los odontocetos estudiados. Los dientes de los delfínidos son afilados, cónicos, cóncavos en la cara lingual y convexos en la vestibular; los dientes de marsopa común presentan una corona espatulada, con borde afilado, aplanada en el plano vestíbulo-lingual y están más curvados en la raíz, siendo cóncava la cara lingual y convexa la vestibular.

La Tabla 1 recoge los datos acerca de especie, sexo, longitud total (LT) en cm, fecha y lugar de varamiento de todos los individuos cuyos dientes fueron analizados. La mayoría de los dientes estaban almacenados en alcohol de 70° o en formol tamponado al 10%, solamente los procedentes del ejemplar de DDE “sin datos₁”, de la hembra de PPH de 187 cm y de la hembra de TTR de 159 cm se obtuvieron ya secos a partir de preparaciones museísticas.

La extracción de los dientes de la hembra de delfín mular de 256 cm se realizó en la Sala de Disección del Pabellón III de la Facultad de Veterinaria de la USC a partir de su cabeza, conservada en congelación desde la fecha de varamiento y descongelada durante dos días en refrigeración. Se emplearon pinzas, bisturí y cuchillos de hoja corta para retirar cinco piezas dentales de la porción media de la hemiarcada mandibular izquierda. Este ejemplar presentaba una malformación a nivel de la columna vertebral (cifoescoliosis), por lo que su LT está subestimada.

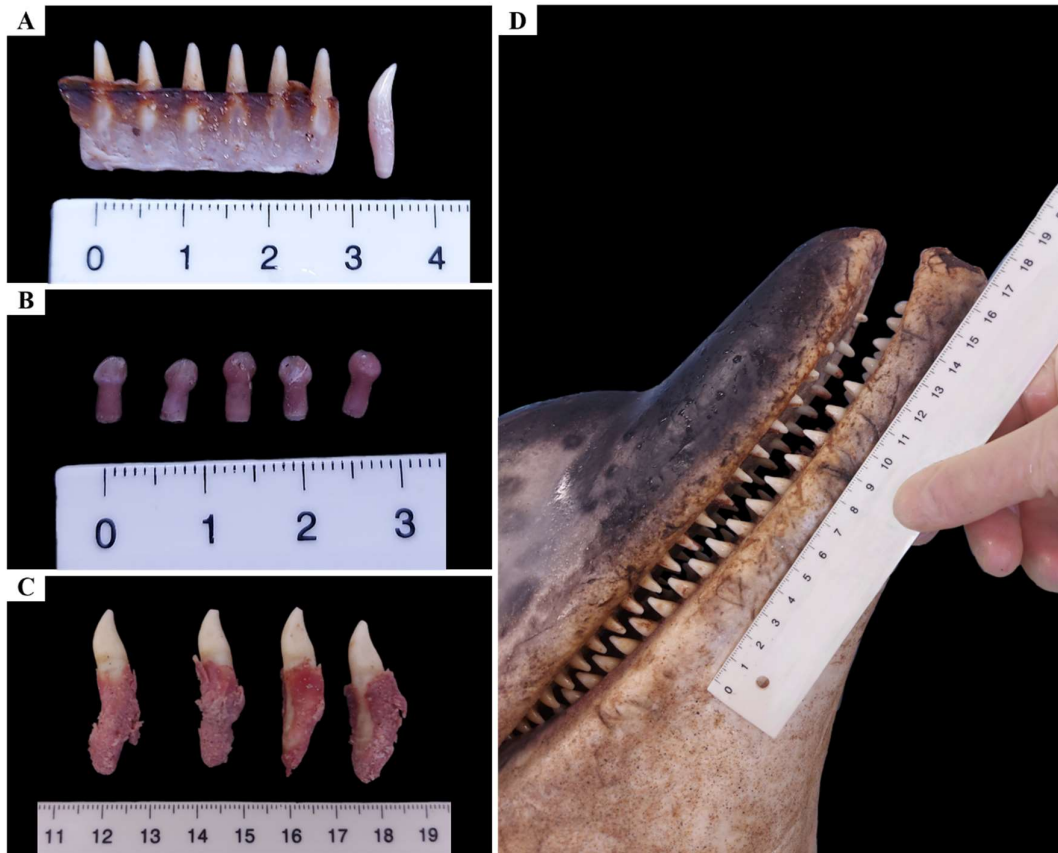


Figura 6. Dientes de los odontocetos estudiados. **A,** Dientes de DDE, morfológicamente indiferenciables de los de SCO; **B,** Dientes de un individuo neonato de PPH; **C,** Dientes de TTR; **D,** Cabeza del ejemplar de TTR hembra de 256 cm donde se aprecia la disposición y morfología de los dientes en la cavidad oral. La unidad de medida es 1 cm.

Tabla 1. Datos de especie, sexo, longitud, fecha y lugar de varamiento y medio de conservación de los dientes utilizados en este trabajo.

ESPECIE	SEXO	LT (cm)	FECHA	LUGAR	MEDIO DE CONSERVACIÓN
DDE	Hembra	97,5	Sin datos	Sin datos	Alcohol
DDE	Macho	151*	23/11/2017	Sanxenxo	Formol
DDE	Macho	156	01/02/2017	Sanxenxo	Alcohol
DDE	Macho	187	23/11/2017	Porto do Son	Formol
DDE	Macho	214	20/01/2017	Carballo	Alcohol
DDE	Sin datos ₁	Sin datos ₁	Sin datos ₁	Sin datos ₁	En seco
DDE	Sin datos ₂	Sin datos ₂	Sin datos ₂	Sin datos ₂	Alcohol
PPH	Macho	95	15/12/2022	Vigo	Alcohol
PPH	Macho	118,5	24/07/2017	Carnota	Alcohol
PPH	Macho	139	28/02/2014	Ferrol	Alcohol
PPH	Macho	143,5	17/04/2021	Barreiros	Alcohol
PPH	Macho	167	11/09/2017	O Grove	Alcohol
PPH	Macho	172	27/08/2021	San Ciprián	Alcohol
PPH	Hembra	187	03/03/2024	Arteixo	En seco
SCO	Hembra	110	21/08/2023	Foz	Alcohol
SCO	Macho	112	19/07/2014	Sin datos	Alcohol
SCO	Hembra	152	29/03/2024	Foz	Alcohol
SCO	Hembra	158	29/04/2024	Foz	Alcohol

SCO	Hembra	160	29/06/2017	Ferrol	Alcohol
SCO	Hembra	169	Sin datos	Sin datos	Alcohol
SCO	Macho	202	20/06/2020	San Ciprián	Alcohol
SCO	Macho	215	02/06/2021	O Vicedo	Alcohol
SCO	Macho	216	05/08/2017	Foz	Alcohol
TTR	Hembra	159	2021	Pontedeume	En seco
TTR	Macho	162	06/07/2017	Cangas	Alcohol
TTR	Hembra	236	23/01/2024	Muros	Alcohol
TTR**	Hembra	256	16/02/2022	Porto do Son	Alcohol
TTR	Hembra	270	06/11/2016	Arteixo	Alcohol
TTR	Macho	271	23/11/2016	Ribeira	Alcohol
TTR	Macho	274	15/12/2017	Muros	Alcohol
TTR	Hembra	280	01/05/2009	Arteixo	Alcohol
TTR	Macho	284	15/06/2023	Ribeira	Alcohol
TTR	Hembra	304	10/12/2016	Carnota	Alcohol
TTR	Hembra	318	31/08/2023	Porto do Son	Alcohol

*DDE, delfin común; LT, longitud total; PPH, marsopa común; SCO, delfin listado; TTR, delfin mular. * Individuo con el pedúnculo caudal cortado. ** Individuo con una malformación a nivel de la columna vertebral.*

Antes del procesamiento de los dientes, se retiraron con un bisturí los restos de encía y de ligamento periodontal adheridos a la raíz y se dejaron secar al aire.

3.2. Lijado y pulido

Se preparó como mínimo una sección de un diente de cada animal para realizar el conteo de GLG con un estereomicroscopio binocular *Olympus SZX16* acoplado a una cámara digital *Olympus EP50* y un fotomicroscopio óptico *Olympus DP74*. En los individuos de los que se disponía de más de una pieza dental, se prepararon hasta 3 secciones.

Todos los dientes se lijaron con una amoladora (*MD 125/150 CG*) a 2950 r.p.m. en el plano vestibulo-lingual, hasta que la cavidad pulpar quedó expuesta por ambos lados de la muestra, obteniendo una sección de entre 1-2,5 mm de grosor. Un diente del individuo de PPH hembra de 187 cm también se lijó en el plano mesio-distal hasta la línea media y un diente del ejemplar de DDE “sin datos₁” en el plano transversal.

Las secciones se continuaron lijando con los discos de una multiherramienta *Dexter Power DM-130b-1* o *Parkside PFBS 12 B2* o con papel de lija de grano 120 o 180, hasta que se apreciaron los GLG en el microscopio óptico. Todas las muestras se pulieron con los discos de pulido de la multiherramienta *Parkside PFBS 12 B2*.

Finalmente se obtuvieron secciones de entre 0,2-1 mm de grosor de los dientes de DDE, PPH y SCO y secciones de 0,4-2,3 mm de los dientes de TTR.

El conteo de los GLG en dentina de cada una de las secciones fue llevado a cabo por dos lectoras empleando el estereomicroscopio y el fotomicroscopio óptico con los objetivos 4x y 10x.

3.3. Descalcificación

Tras ser observadas al estereomicroscopio y al fotomicroscopio óptico, todas las secciones previamente lijadas y pulidas se descalcificaron introduciéndolas en ácido fórmico al 5% durante 2 horas para las muestras de DDE, PPH y SCO y durante 3 horas en el caso de los dientes de TTR. Pasado este tiempo se extrajeron, se lavaron con agua destilada dos veces durante 5 minutos y se dejaron secar al aire.

Las mismas dos lectoras realizaron de nuevo el contaje de GLG en dentina empleando el fotomicroscopio óptico *Olympus DP74* con el objetivo 4x.

3.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Todas las secciones de dientes previamente lijadas y descalcificadas con ácido fórmico al 5% se prepararon para el MEB, exceptuando los dientes de los ejemplares de DDE hembra de 97,5 cm, PPH macho de 95 cm, TTR hembra de 159 cm y TTR macho de 162 cm, que no fueron analizados con esta técnica.

Cada una de las secciones se colocó en un portamuestras debidamente identificado adhiriéndola con una cinta de carbono de doble cara. Las muestras se introdujeron en un metalizador (*BAL-TEC SCD 005 Cool Sputter Coater*) para cubrirlas con una capa de oro y se observaron con el microscopio electrónico de barrido (*JEOL JSM-6360LV*).

Las micrografías fueron tomadas con una distancia de trabajo de 44-49 mm a 20 kV, con una magnificación desde 8x (para secciones más grandes) hasta 75x (para los detalles) y fueron interpretadas por una observadora.

3.5. Microtomografía computarizada (micro-TC)

Los dientes de tres ejemplares de delfín mular (TTR hembra de 236 cm, TTR hembra de 280 cm y TTR hembra de 318 cm) fueron escaneados con un micro-TC *SkyScan 1172* (*Bruker, Bélgica*).

Se obtuvo una sección de 1,5 mm de cada uno de los dientes con una sierra de diamante (*Exakt 300*). El corte se realizó longitudinalmente a nivel de la línea media en el plano vestibulo-lingual, fijando previamente el diente a un portaobjetos con una resina a base de metacrilato (*Technovit 4000*).

Una vez obtenidas las secciones, se descalcificaron sumergiéndolas en ácido fórmico al 5% durante 2 horas. A continuación se extrajeron, se introdujeron en acetona durante 30 minutos y finalmente se lavaron con agua destilada.

Cada sección se colocó directamente sobre el portamuestras y se realizó la captura con un voltaje de 55 kV, una potencia de 10 W y una intensidad de 181 μ A. Se colocó un filtro de

aluminio de 0,5 mm de espesor en la trayectoria del haz. La muestra fue escaneada en 180° con 0,2° de paso de rotación y la resolución se estableció en un tamaño de píxel de 2,5 μm . Con estos parámetros cada escaneo tuvo una duración promedio de 5 horas y 40 minutos.

La reconstrucción de las microtomografías se realizó utilizando el software *N Recon (Bruker)* basándose en el algoritmo de Feldkamp *et al.* (1984). Para el análisis de las imágenes se emplearon los programas *DataViewer*, que permitió la observación de la sección en dos dimensiones y en una escala de grises; y *CTvox*, que ofreció una imagen tridimensional del diente con diferentes patrones de colores.

4. RESULTADOS

4.1. Almacenamiento de los dientes

No se detectaron variaciones en los procesos de lijado, descalcificación y contaje de GLG entre los dientes almacenados en alcohol, en formol o en los obtenidos ya secos a partir de preparaciones museísticas.

4.2. Obtención de las secciones

Al observar los dientes al estereomicroscopio y al microscopio óptico, no se apreciaron diferencias en el número o estructura de los GLG entre las secciones obtenidas con la sierra de diamante y las lijadas y pulidas con la amoladora y la multiherramienta.

Sin embargo, como para conseguir cada sección empleando la sierra de diamante se necesitaron aproximadamente 3 horas, mientras que el proceso de lijado y pulido solamente requirió de unos 10 minutos por diente, únicamente se cortaron con la sierra los dientes que fueron escaneados con el micro-TC, mientras que el resto de secciones se obtuvieron con la amoladora y la multiherramienta.

4.3. Descalcificación

Los resultados del proceso de descalcificación variaron dependiendo del grosor de la muestra. En el caso de los dientes de TTR, las secciones que mejor respondieron a la descalcificación fueron aquellas con un grosor comprendido entre 0,5-2 mm; las que medían menos de 0,5 mm se descalcificaron en exceso y se deformaron, empeorando la definición de los GLG; las secciones cuyo grosor superaba los 2 mm no permitían diferenciar las capas de crecimiento.

Para el resto de especies estudiadas, los mejores resultados se obtuvieron de las secciones cuyo grosor se encontraba entre 0,3-0,8 mm. De nuevo encontramos que las secciones más gruesas no permitían identificar los GLG y las de grosor inferior a 0,3 mm se descalcificaban en exceso.

4.4. Estructura dental

Las cuatro técnicas empleadas permitieron diferenciar la estructura de los dientes, distinguiéndose el esmalte, la dentina prenatal y la postnatal —separadas por la línea neonatal— el cemento y la cavidad pulpar (Figura 7). En algunos dientes el esmalte se perdió parcial o totalmente como consecuencia del proceso de descalcificación.

La cavidad pulpar de los ejemplares jóvenes, con longitud total menor, presentó un mayor tamaño. En individuos de mayor edad, de mayor longitud total, a medida que aumentaba el número de GLG y, por tanto, el grosor de la dentina postnatal, se reducía el tamaño de la cavidad pulpar (Figura 8).

Como hallazgo singular, en uno de los dientes de TTR hembra de 280 cm y en otro de TTR hembra de 318 cm se encontraron piedras pulpares (Figura 9).

A pesar de que la observación de la morfología dental interna resultó más sencilla con el MEB, todas las técnicas realizadas en este trabajo pusieron de manifiesto los GLG de los dientes, siempre que las secciones se hubiesen realizado correctamente en el plano medio y la cavidad pulpar estuviese expuesta.

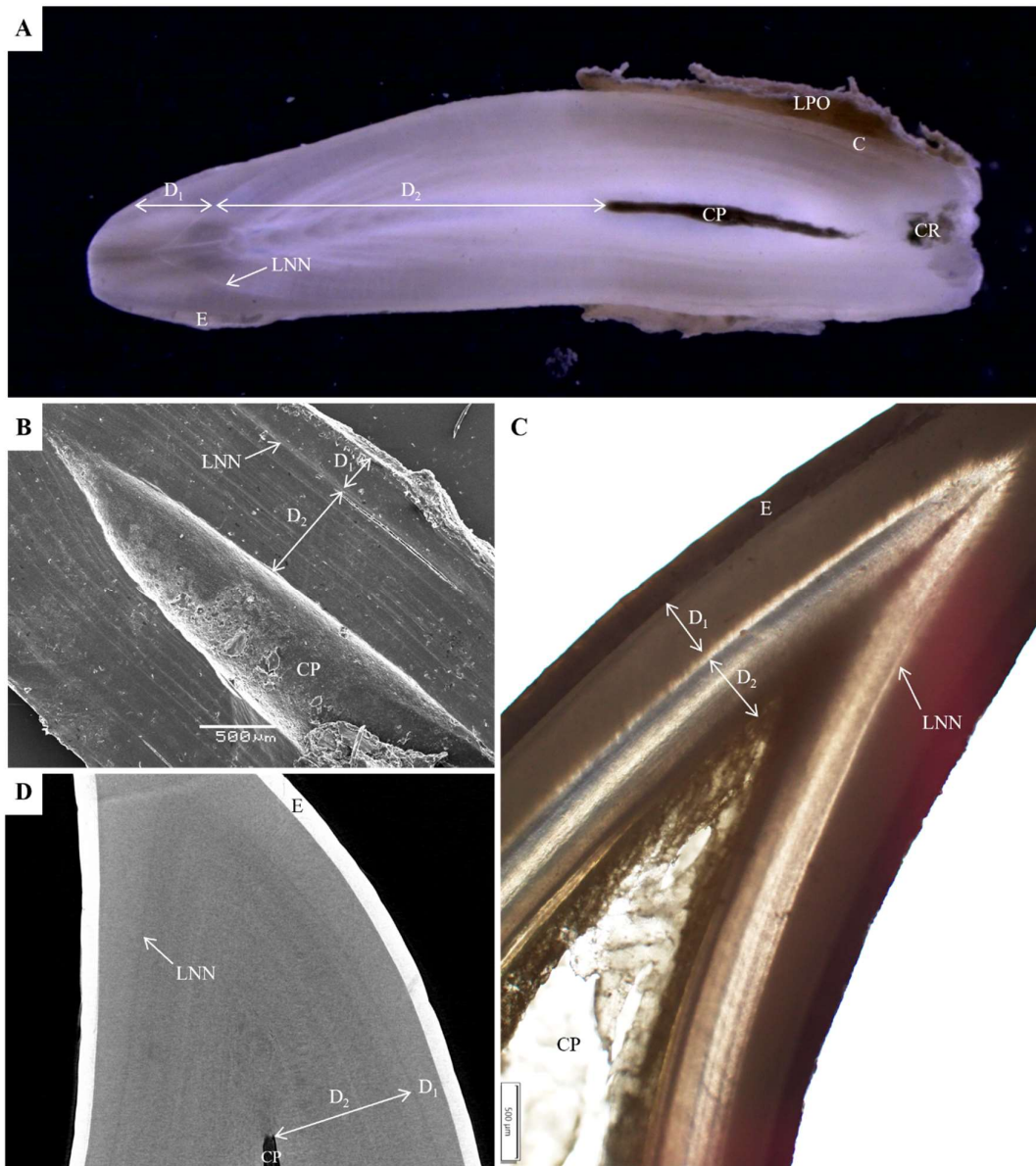


Figura 7. Estructura de los dientes con diferentes técnicas. **A**, Diente de PPH macho de 143,5 cm sin descalcificar visto al estereomicroscopio a 1x; **B**, Diente de DDE “sin datos₁” visto al MEB con una magnificación de 40x; **C**, Diente de SCO macho de 158 cm descalcificado visto al microscopio óptico a 4x; **D**, Sección en 2D de la imagen en 3D obtenida con el micro-TC del diente de la hembra de TTR de 280 cm; C, cemento; CP, cavidad pulpar; CR, canal radicular; D₁, dentina prenatal; D₂, dentina postnatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal; LPO, ligamento periodontal.

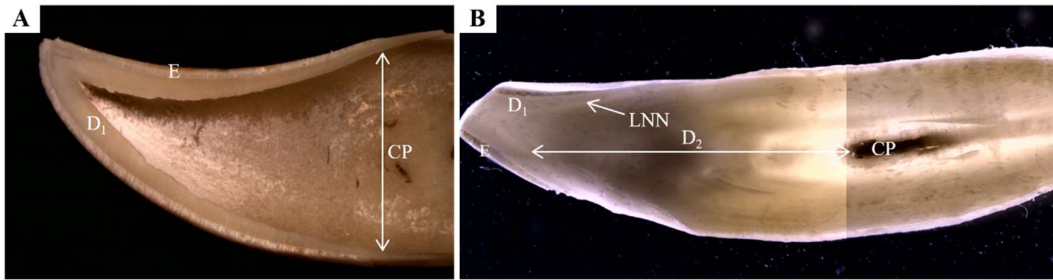


Figura 8. Dientes de TTR observados con el estereomicroscopio. Se aprecia el crecimiento centripeto de la dentina y el consiguiente cierre de la cavidad pulpar con la edad. **A,** Diente de TTR hembra de 159 cm a 0,8x, solamente presenta dentina prenatal; **B,** Diente de TTR hembra de 318 cm a 1x; CP, cavidad pulpar; D₁, dentina prenatal; D₂, dentina postnatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal.

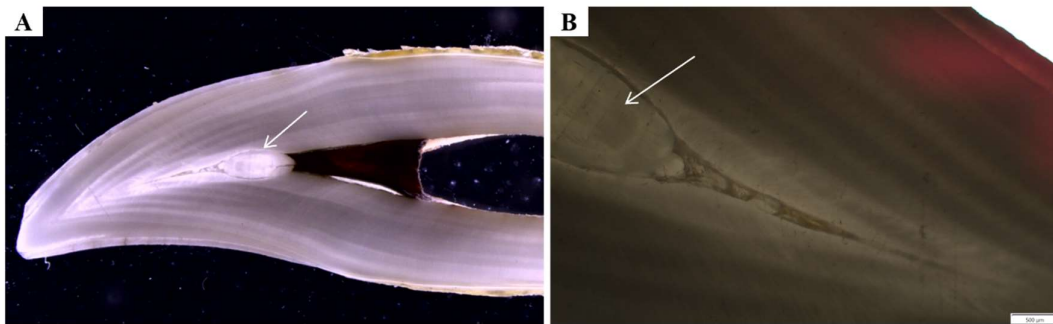


Figura 9. Piedra pulpar en uno de los dientes del ejemplar de TTR hembra de 280 cm. **A,** Con el estereomicroscopio a 1x sin descalcificar; **B,** Con el microscopio óptico a 4x sin descalcificar.

Los dientes del individuo PPH macho de 167 cm presentaban una morfología externa e interna anormal, lo que dificultó la preparación de las secciones longitudinales e impidió que la cavidad pulpar quedase expuesta, por lo que no pudo realizarse el conteo de GLG (Figura 10).

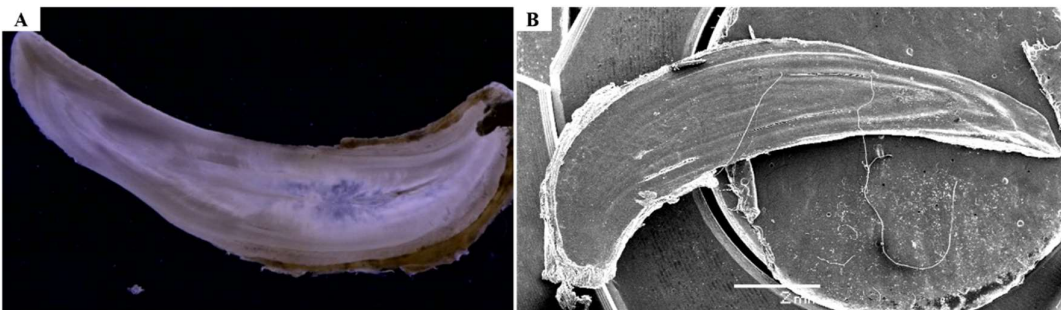


Figura 10. Dientes con morfología anormal del individuo de PPH macho de 167 cm. El diente presenta forma de coma y no se observa la cavidad pulpar; **A,** con el estereomicroscopio a 1x sin descalcificar; **B,** con el MEB a 10x.

4.5. Contaje de GLG

Para llevar a cabo el conteo de GLG se siguieron las mismas pautas en las cuatro técnicas empleadas. En primer lugar, se identificó la línea neonatal como punto de referencia del nacimiento y límite entre la dentina prenatal y la postnatal. A continuación, se procedió a contar los GLG en la dentina postnatal de la porción apical del diente, bien en la corona sobre la cavidad pulpar o bien en la zona media del diente en la dentina contigua a la cavidad pulpar. Para la estimación de la edad se siguió el criterio establecido por Myrick *et al.* (1984) por el que la tasa de depósito de los GLG es anual.

Teniendo en cuenta las longitudes al nacimiento de las diferentes especies estudiadas (López *et al.*, 2015), los dientes de los individuos DDE hembra de 97,5 cm, PPH macho de 95 cm, SCO hembra de 110 cm, SCO macho de 112 cm, TTR hembra de 159 cm y TTR macho de 162 cm se emplearon como control para cada una de las especies, ya que al tratarse de animales recién nacidos o con pocos meses de vida todavía no se había iniciado la formación de la dentina postnatal y, por tanto, carecían de GLG.

4.6. Contaje de GLG en secciones lijadas y pulidas

Tanto en el estereomicroscopio como en el microscopio óptico, en las secciones lijadas y pulidas la línea neonatal se observó como una capa fina y translúcida. La dentina prenatal presentó una opacidad variable pero uniforme en todos los ejemplares, mientras que en la dentina postnatal cada GLG estaba formado por una capa translúcida y otra opaca (Figura 11).

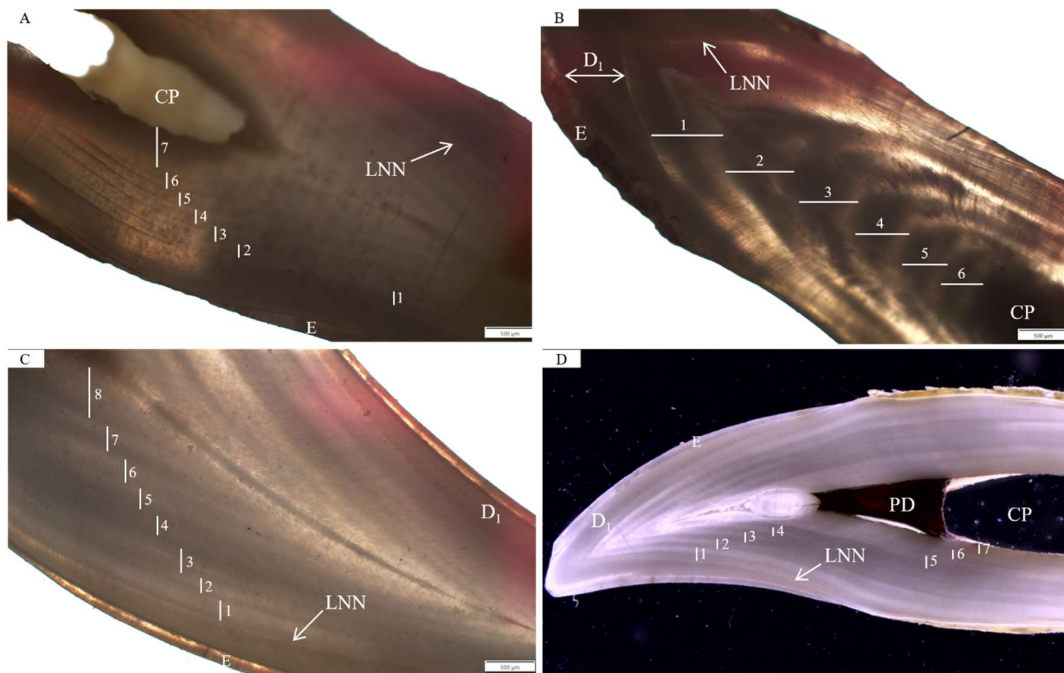


Figura 11. Contaje de GLG con el estereomicroscopio y el microscopio óptico en secciones de dientes sin descalcificar. **A**, Diente de DDE "sin datos", al microscopio óptico a 4x, se cuentan 7 GLG; **B**, Diente de PPH macho de 172 cm al microscopio óptico a 4x, se cuentan 6 GLG; **C**, Diente de SCO macho de 202 cm al microscopio óptico a 4x, se cuentan 8 GLG; **D**, Diente de TTR hembra de 280 cm al estereomicroscopio a 0,7x, se cuentan 7 GLG; **C**, cemento; **CP**, cavidad pulpar; **D₁**, dentina prenatal; **E**, esmalte; **LNN**, línea neonatal; **PD**, pulpa dental.

En todas las especies resultó más sencilla la identificación de los primeros grupos de capas de crecimiento depositados, es decir, los más próximos a la línea neonatal. Los GLG también estaban mejor definidos en los dientes con una cavidad pulpar de gran tamaño y que correspondían a individuos de menor longitud; a medida que se cerraba la cavidad pulpar con la edad, los GLG estaban más próximos entre sí y peor delimitados. Por tanto, en ejemplares con la cavidad pulpar muy cerrada no se pudo completar el contaje de GLG y solamente se estimó una edad mínima (Figura 12).

Los contajes de GLG en la zona de la raíz subestimaron el número real de capas, por lo que el recuento se llevó a cabo en la dentina de la porción apical del diente (Figura 12).

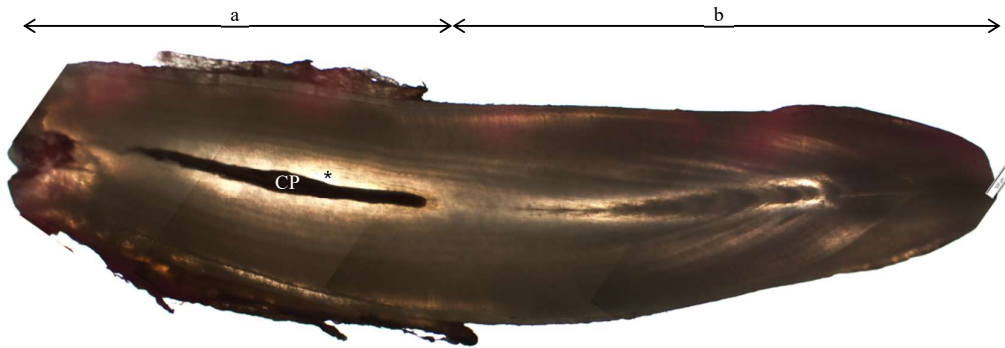


Figura 12. Sección de un diente del ejemplar PPH de 143,5 cm sin descalcificar, observada al microscopio óptico a 4x. Presenta la cavidad pulpar prácticamente cerrada. Se aprecia una pérdida de definición de los GLG en la dentina más próxima a la cavidad pulpar (), por lo que solamente se pudo estimar una edad mínima de 10 años (10 GLG). El número de GLG identificables en la raíz (a) es menor que el que se visualiza en la dentina de la porción apical del diente (b). CP, cavidad pulpar.*

Se registraron variaciones en el contaje de GLG entre diferentes dientes de un mismo individuo y entre las dos caras de la sección de un mismo diente, tomando en ambos casos el valor más alto como válido para la estimación de la edad.

La visualización de los GLG fue más sencilla en las secciones que presentaban un grosor entre 0,4-0,8 mm. Las secciones de los dientes de los ejemplares TTR macho de 284 cm y TTR hembra de 304 cm no permitieron identificar los grupos de capas de crecimiento por ser demasiado gruesas (2,3 mm).

En la sección transversal del diente del individuo DDE “sin datos₁” no se apreció ninguna capa de crecimiento. La sección en el plano mesio-distal del diente de PPH hembra de 187 cm no mostró ninguna diferencia en cuanto a la definición de los GLG con respecto a la sección obtenida en el plano vestibulo-lingual.

Como ya se ha comentado anteriormente, no se pudo estimar la edad del ejemplar PPH macho de 167 cm ya que sus dientes no presentaban una morfología normal ni externa ni internamente, lo que impidió obtener una buena sección que mostrase sus GLG.

Los dientes de DDE, SCO y PPH ofrecieron unos resultados semejantes en cuanto a la definición de GLG y facilidad de contaje de cada una de las capas. Los dientes de TTR ofrecieron los peores resultados con este método debido a que los límites entre los GLG se mostraron menos definidos.

El microscopio óptico permitió una identificación más precisa de los GLG, facilitando el contaje especialmente en ejemplares de mayor edad y en los dientes de TTR. Con el estereomicroscopio la definición de los GLG fue peor, lo que en ocasiones impidió su contaje o llevó a una subestimación de la edad.

4.7. Contaje de GLG en secciones descalcificadas

En las secciones descalcificadas vistas al microscopio óptico, la línea neonatal se mostró de nuevo como una franja fina y translúcida y la dentina prenatal como una capa amorfa de opacidad variable entre individuos. Los GLG también estaban formados por una capa translúcida y una opaca, pero el contraste entre ambas resultó ser mayor que en las secciones no tratadas (Figura 13).

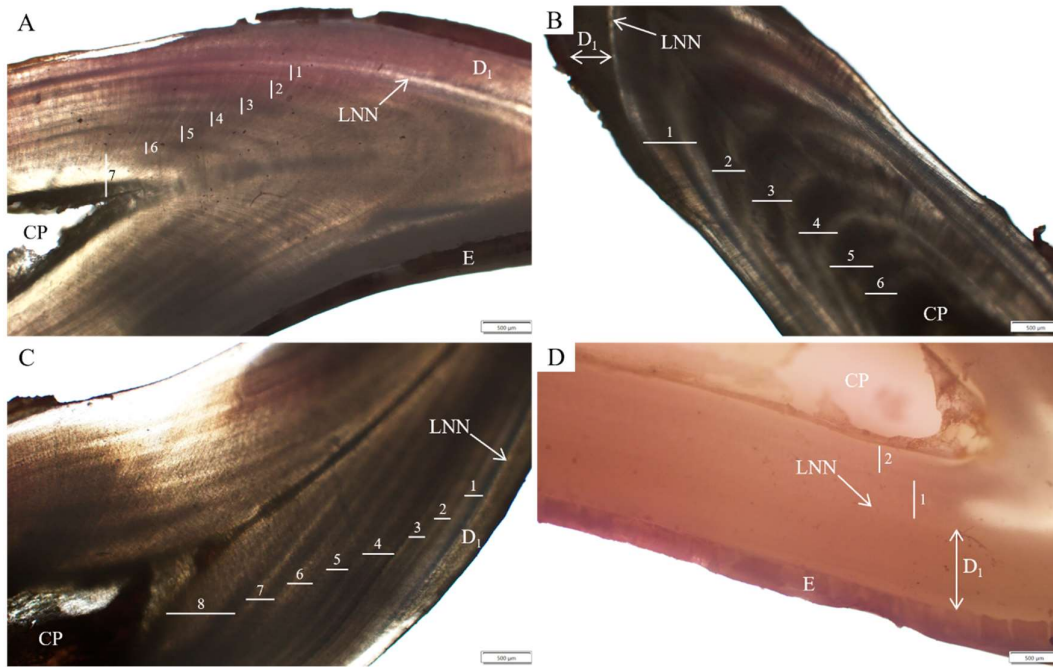


Figura 13. Contaje de GLG con el microscopio óptico a 4x en secciones de dientes descalcificados. **A**, Diente de DDE "sin datos", se cuentan 7 GLG; **B**, Diente de PPH macho de 172 cm, se cuentan 6 GLG; **C**, Diente de SCO macho de 202 cm, se cuentan 8 GLG; **D**, Diente de TTR hembra de 236 cm, se cuentan 2 GLG; C, cemento; CP, cavidad pulpar; D₁, dentina prenatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal; PD, pulpa dental.

Al igual que en las secciones no tratadas, el contaje de GLG resultó más sencillo en los dientes de individuos jóvenes con la cavidad pulpar de mayor tamaño. A medida que se cerraba la cavidad pulpar, la aproximación de los GLG dificultó la identificación de los límites de cada capa, por lo que en individuos con la cavidad pulpar muy cerrada no se pudo completar el recuento y solamente se llevó a cabo una estimación de la edad mínima. Con este método también se realizó el contaje en la dentina de la parte apical del diente, pues los recuentos en la zona de la raíz fueron siempre más bajos.

De igual manera que con las secciones sin descalcificar, se registraron variaciones en el número de GLG entre las dos caras de un mismo diente y entre dientes diferentes de un mismo individuo. En ambos casos, se consideró como válido para la estimación de la edad el número más elevado.

La descalcificación no mejoró la visualización de los GLG en los dientes de los ejemplares de DDE, PPH y SCO. Por el contrario, en ocasiones dificultó su identificación al resaltar las capas

accesorias, conduciendo a recuentos más elevados, como en el caso de la hembra TTR de 280 cm; o bien a una subestimación de la edad en secciones demasiado delgadas (de menos de 0,3 mm de grosor) que sufrieron una descalcificación excesiva, lo que provocó deformaciones de las muestras y la pérdida de definición de los GLG, impidiendo el conteaje en el caso del ejemplar DDE macho de -151 cm y en un diente del individuo DDE macho de 214 cm. Solamente en la sección transversal del diente del individuo DDE “sin datos₁” la descalcificación facilitó la visualización de los primeros GLG.

En los dientes de TTR el proceso de descalcificación sí mejoró la definición de los GLG, especialmente en los ejemplares TTR macho de 284 cm, permitiendo en este caso realizar la estimación de la edad, y TTR hembra de 304 cm, en el que aun así no se pudo completar el recuento.

4.8. Contaje de GLG en el microscopio electrónico de barrido

En el MEB la línea neonatal se identificó como una cresta a continuación de la dentina prenatal y en cada GLG se diferenciaron una cresta y un surco adyacente (Figura 14).

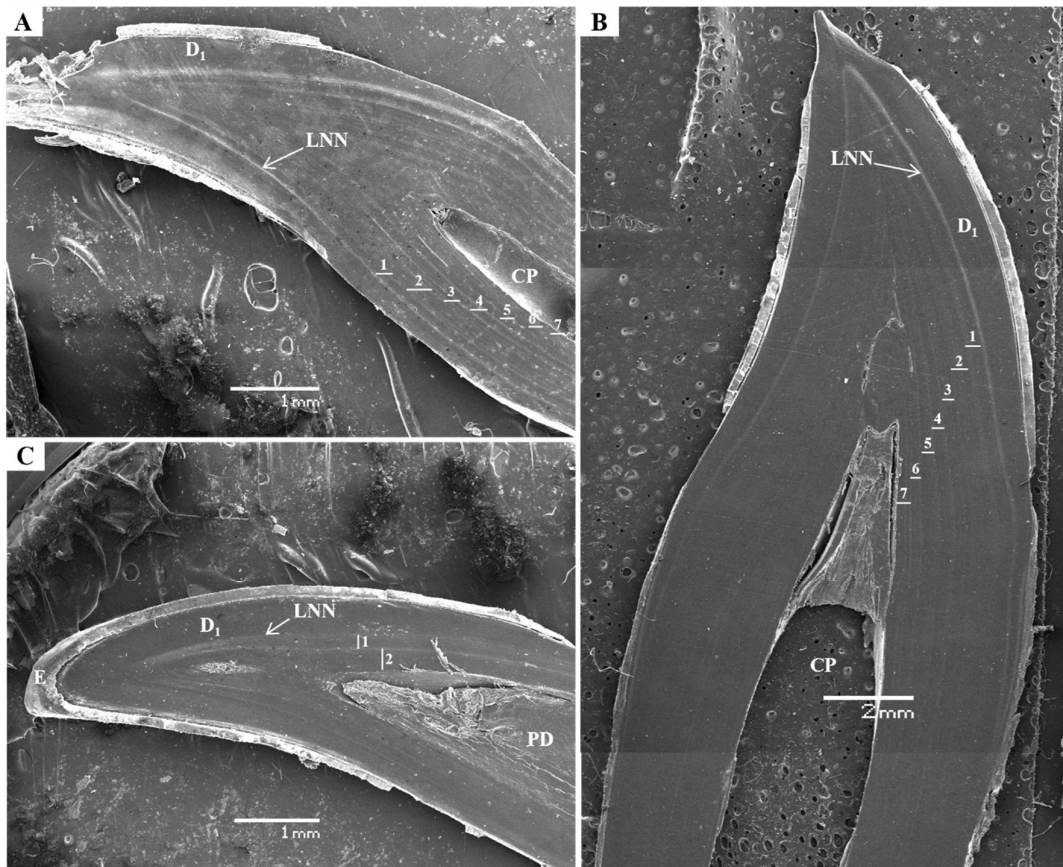


Figura 14. Contaje de GLG con el MEB. A, Diente de DDE “sin datos₁” (20x), se cuentan 7 GLG; B, Diente de TTR hembra de 280 cm (8x), se cuentan 8 GLG; C, Diente de SCO macho de 152 cm (19x), se cuentan 8 GLG; C, cemento; CP, cavidad pulpar; D₁, dentina prenatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal; PD, pulpa dental.

El conteo de los GLG en secciones de dientes de DDE, SCO y TTR fue más sencillo con esta técnica que con los métodos anteriores, ya que facilitó su identificación y permitió diferenciarlos de las capas accesorias. Sin embargo, en los dientes de PPH el MEB empeoró la definición de los GLG, por lo que no se obtuvieron buenos resultados, especialmente en los individuos de mayor longitud total.

En los dientes pertenecientes a los ejemplares de mayor tamaño y con la cavidad pulpar cerrada se observó una pérdida de definición de los últimos GLG depositados, por lo que no se pudo completar el conteo y solamente se estimó una edad mínima.

La Tabla 2 recoge el conteo de GLG y, por tanto, la edad en años estimada para cada individuo empleando las tres técnicas anteriores.

Tabla 2. Contaje de GLG/ edad en años estimada para cada uno de los individuos empleando secciones de dientes sin descalcificar observadas con el estereomicroscopio y el microscopio óptico, y secciones descalcificadas vistas con el microscopio óptico y el microscopio electrónico de barrido.

ESPECIE	SEXO	LT (cm)	NÚMERO DE GLG/ EDAD ESTIMADA EN AÑOS			
			Secciones sin descalcificar		Secciones descalcificadas	
			Microscopio óptico	Estereomicroscopio	Microscopio óptico	MEB
DDE	Hembra	97,5	0	0	0	-
DDE**	Macho	-151	1	1	No valorable	0
DDE	Macho	156	3	3	3	3
DDE*	Macho	187	+7	No valorable	+7	+10
DDE*	Macho	214	7	6	6	7
DDE	SD ₁	SD ₁	7	7	7	7
DDE	SD ₂	SD ₂	2	2	No valorable	2
PPH	Macho	95	0	0	0	-
PPH	Macho	118,5	2	2	1	1
PPH	Macho	139	+8	+7	+7	2
PPH*	Macho	143,5	+10	+10	+10	+9
PPH*	Macho	167	No valorable	No valorable	No valorable	No valorable
PPH	Macho	172	6	6	6	4
PPH*	Hembra	187	+15	No valorable	+12	+7
SCO	Hembra	110	0	0	0	-
SCO	Macho	112	0	0	0	-
SCO	Hembra	152	2	2	2	2
SCO	Hembra	158	2	2	2	2
SCO	Hembra	160	3	2	2	3
SCO	Hembra	169	2	2	2	1
SCO	Macho	202	8	8	8	No valorable
SCO*	Macho	215	+10	+10	+10	+10
SCO*	Macho	216	+20	+11	+20	+20
TTR	Hembra	159	0	0	0	-
TTR	Macho	162	0	0	0	-
TTR	Hembra	236	2	2	2	1
TTR***	Hembra	256	+16	No valorable	+15	+15
TTR	Hembra	270	6	6	8	7
TTR	Macho	271	4	3	+6	5
TTR	Macho	274	8	7	8	+7
TTR	Hembra	280	7	7	10	7
TTR	Macho	284	No valorable	No valorable	7	6

TTR*	Hembra	304	No valorable	No valorable	No valorable	No valorable
TTR*	Hembra	318	+8	No valorable	+8	+20

*DDE, delfin común; LT, longitud total; PPH, marsopa común; SCO, delfin listado; SD, sin datos; TTR, delfin mular. * Individuos con la cavidad pulpar muy cerrada dificultando el contaje; ** individuo con el pedúnculo caudal cortado; *** individuo con cifoescoliosis y con la cavidad pulpar muy cerrada.*

Las diferencias en el contaje de GLG entre las distintas técnicas fueron más significativas en los animales de mayor tamaño con la cavidad pulpar cerrada, mientras que en los ejemplares de menor longitud las estimaciones de la edad se aproximaron más entre sí. Para un mismo individuo, los resultados obtenidos en el recuento de GLG fueron similares en los cuatro métodos. El MEB fue la técnica que ofreció unos resultados más variables con respecto al resto.

4.9. Contaje de GLG con microtomografía computarizada

Las imágenes bidimensionales obtenidas con el programa *DataViewer* mostraron la línea neonatal como una capa hipomineralizada y cada GLG como un conjunto de dos capas de diferente mineralización en una escala de grises (Figura 15). Las imágenes tridimensionales visualizadas con el programa *CTvox* permitieron identificar las estructuras dentales empleando diferentes patrones de colores (Figura 16).

A pesar de que con esta técnica se pudo diferenciar el patrón de GLG en todas las secciones, solamente se completó el contaje en el individuo TTR hembra de 236 cm, obteniendo un resultado de 1 GLG (Figuras 15 y 16). En los ejemplares TTR hembra de 280 cm y de 318 cm no se consiguieron identificar todas las capas de crecimiento ya que, al tratarse de individuos de más edad y, por tanto, con la cavidad pulpar más cerrada, los parámetros seleccionados para escanear la muestra no permitieron obtener una imagen que incluyese un área suficiente de la corona y la cavidad pulpar para realizar el contaje completo de GLG. Además, al igual que en técnicas anteriores, a medida que avanzaba el cierre de la cavidad pulpar, los GLG se aproximaban y perdían definición.

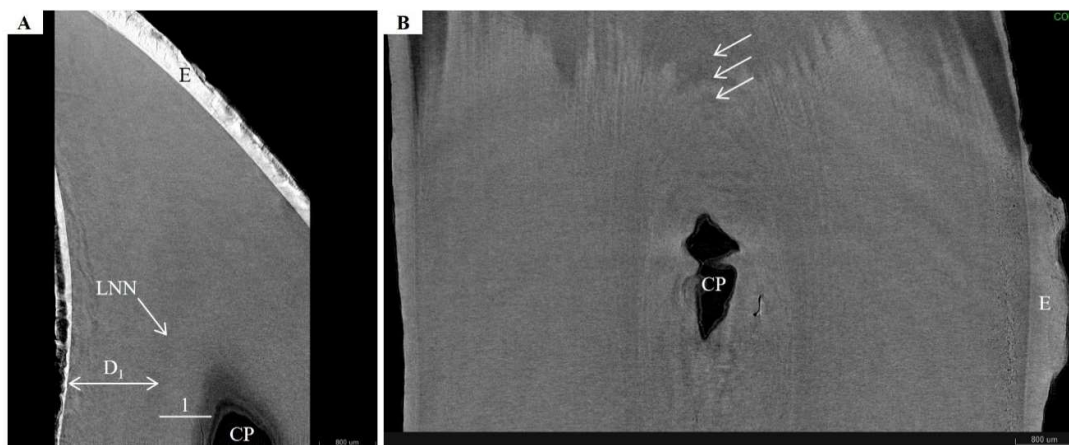


Figura 15. Contaje de GLG en secciones de dientes escaneadas con el micro-TC y visualizadas con el programa *DataViewer*. **A**, Corte en 2D de un diente del ejemplar TTR hembra de 236 cm, se cuenta 1 GLG; **B**, Corte en 2D de un diente del ejemplar TTR hembra de 318 cm, cada flecha señala un GLG, pero no se puede completar el contaje. CP, cavidad pulpar; D₁, dentina prenatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal.

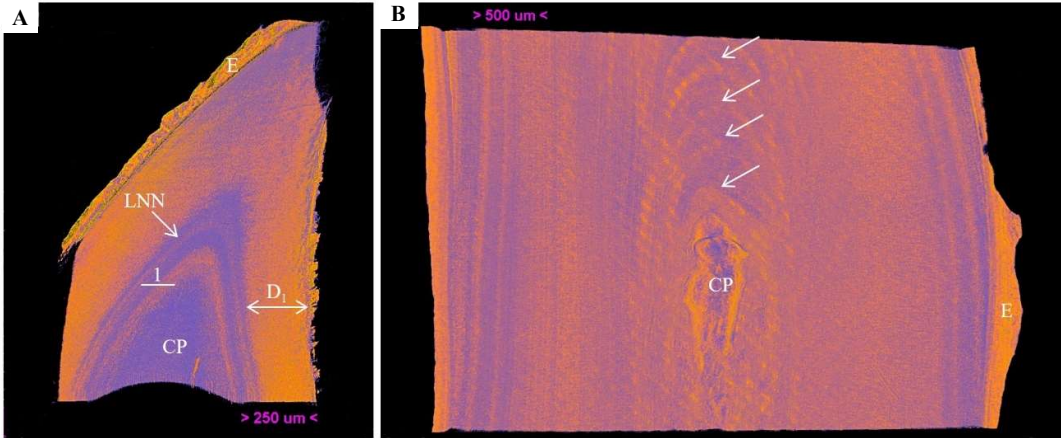


Figura 16. Contaje de GLG en secciones de dientes escaneadas con el micro-TC y visualizadas con el programa CTvox. **A,** Corte en 2D de un diente del ejemplar TTR hembra de 236 cm, se cuenta 1 GLG; **B,** Corte en 2D de un diente del ejemplar TTR hembra de 318 cm, cada flecha señala un GLG, pero no se puede completar el contaje. CP, cavidad pulpar; D₁, dentina prenatal; E, esmalte; LNN, línea neonatal.

5. DISCUSIÓN

La elaboración de este TFG ha permitido implementar en la Facultad de Veterinaria de la USC la técnica de estimación de la edad en odontocetos mediante el contaje de grupos de capas de crecimiento (GLG) en secciones de dientes lijadas y pulidas, utilizando estereomicroscopía y microscopía óptica. Para ello se ha seguido el método descrito por Henriksen *et al.* (2024) para la marsopa común, un método que ofrece una alternativa económica, rápida y sencilla a otras técnicas como el recuento de GLG en secciones de dientes incluidos en parafina (Luque *et al.*, 2009), puesta a punto en la Facultad de Veterinaria de la USC por Álvarez (2018). Además, se confirmó su validez comparando los resultados con los obtenidos en las mismas secciones descalcificadas empleando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (MEB) (siguiendo el modelo de Hohn, 1980b), y microtomografía computarizada (micro-TC) (según el método descrito por Baier-Stegmaier *et al.*, 2023).

Para llevar a cabo las técnicas anteriores se contó con dientes procedentes de 34 individuos de las cuatro especies de odontocetos que más varan en la costa gallega (REVARGAL, 2023): delfín común de hocico corto (*Delphinus delphis*) (DDE), marsopa común (*Phocoena phocoena*) (PPH), delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) (SCO) y delfín mular (*Tursiops truncatus*) (TTR).

El método que ofreció mejores resultados, tanto para la identificación de las estructuras dentales como para llevar a cabo el contaje de GLG en los dientes de DDE, SCO y TTR, fue la MEB. Esta técnica permitió distinguir con claridad las capas accesorias, que son el resultado de alteraciones en el patrón de depósito de los GLG debidas a factores extrínsecos, como cambios ambientales, o intrínsecos, como modificaciones en el organismo del animal que afectan al crecimiento de los dientes (Hohn, 1980b). La MEB no fue igual de eficaz en los dientes de PPH, posiblemente debido a que en esta especie los dientes presentan muchas anomalías morfológicas que dificultan la lectura de los GLG, probablemente derivadas de situaciones de estrés asociadas a variaciones ambientales, al cambio climático o a determinados eventos a lo largo de su historia vital (Read *et al.*, 2010).

Hohn (1980b) y Pribanic (2000) utilizaron la MEB para la estimación de la edad en dientes de TTR. A pesar de que otros autores han usado la MEB para el estudio de la estructura de los dientes en diferentes especies de cetáceos fósiles (Loch *et al.*, 2015; Viglino *et al.*, 2023), el nuestro es el primer trabajo en el que se emplea la MEB para estimar la edad en dientes de DDE, PPH o SCO. En cuanto a la metodología, Hohn (1980b) y Pribanic (2000) utilizaron secciones de 1-2,5 mm de grosor, cortadas con una sierra de diamante y descalcificadas; en nuestro trabajo se emplearon secciones más delgadas, obtenidas mediante el lijado de los dientes con una amoladora y una multiherramienta (los grosores fueron de 0,2-1 mm para los dientes de

DDE, PPH y SCO y de 0,8-2,3 mm para los dientes de TTR), consiguiendo igualmente buenos resultados.

El método de conteo de GLG mediante microscopía óptica a partir de secciones no tratadas y secciones descalcificadas es menos laborioso que la MEB, aunque para algunos autores menos fiable para llevar a cabo el recuento de los GLG con precisión (Hohn, 1980b). Lockyer *et al.* (2010) y Myrick *et al.* (1980) recomiendan utilizar secciones descalcificadas, obtenidas con criostato y teñidas para llevar a cabo el conteo de GLG, pues afirman que el mayor coste y tiempo necesarios para la preparación de dichas secciones se compensan con una mejor resolución de los GLG y de otras estructuras dentales. Estos autores consideran que usar solo secciones descalcificadas, sin teñir, es un buen método en dientes de gran tamaño, como los de TTR, y como última preferencia estarían las secciones sin tratar, en cuyo caso recomiendan realizar el conteo con microscopios de alta calidad y luz polarizada. Para Henriksen *et al.* (2024), sin embargo, la técnica más sencilla para preparar los dientes es igualmente válida. Estos autores compararon los conteos de GLG obtenidos observando al microscopio óptico secciones lijadas y pulidas y secciones descalcificadas de dientes de PPH, concluyendo que la estimación de la edad en secciones de dientes no tratadas era una alternativa fiable a la descalcificación, además de ser más simple, más rápida y necesitar de menos material.

En nuestro trabajo la microscopía óptica en secciones no tratadas permitió la estimación de la edad en todas las especies, resultando más sencilla la identificación de los GLG que con estereomicroscopía. El proceso de descalcificación tampoco supuso ninguna ventaja en cuanto a la resolución y facilidad de conteo de los GLG, obteniéndose resultados similares en las dos técnicas para los dientes de PPH, SCO y DDE. La descalcificación sí facilitó la resolución de los GLG en los dientes de TTR, probablemente debido a su mayor tamaño (Myrick *et al.*, 1980). Para la descalcificación de los dientes se siguió el método descrito por Hohn (1980b), sumergiendo las secciones en ácido fórmico al 5% durante 3 h en el caso del TTR y durante 2 h para los dientes de DDE, PPH y SCO, lavándolos después con agua destilada. Como el tiempo necesario para la descalcificación depende del tamaño y la densidad de cada diente (Lockyer *et al.*, 2010), se redujo la duración del proceso de descalcificación para los dientes de DDE, PPH y SCO, ya que su tamaño es menor que el de los dientes de TTR.

Por otro lado, el escaneo de los dientes de TTR mediante micro-TC permitió diferenciar las distintas estructuras dentales e identificar algunos GLG como capas alternas de tejidos hipo- e hipermineralizados en la dentina postnatal (Hohn, 1980b). Sin embargo, como los parámetros seleccionados no permitieron escanear el diente completo, la estimación de la edad solamente pudo realizarse en el ejemplar TTR hembra de 236 cm, pues al tratarse del individuo más joven y, por tanto, con la cavidad pulpar más grande, se pudo completar el conteo de GLG. En los ejemplares TTR hembra de 280 y 318 cm, a pesar de que la técnica resaltó algunos GLG, no se

pudo determinar la edad ya que la imagen obtenida no permitió visualizar toda la dentina postnatal. Para realizar el escaneo se emplearon secciones de dientes de 1,5 mm obtenidas con una sierra de diamante y descalcificadas. La principal ventaja del micro-TC es que se trata de una técnica no invasiva para la determinación de la edad que no necesita de la preparación de las secciones, por lo que es muy útil en piezas de museo que necesitan ser preservadas (Alstrup *et al.*, 2017; Baier-Stegmaier *et al.*, 2023; Loch *et al.*, 2013). Por tanto, en futuros trabajos podrían escanearse dientes enteros, reduciendo el tiempo del proceso al prescindir del corte y descalcificación de las secciones.

Los primeros autores en emplear el micro-TC para la estimación de la edad en odontocetos (Alstrup *et al.*, 2017; Loch *et al.*, 2013) fracasaron en visualizar los GLG en la dentina, pero sí aportaron información acerca de la anatomía del diente. Baier-Stegmaier *et al.* (2023) publicaron el primer estudio exitoso para la determinación de la edad en carnívoros y odontocetos mediante el escaneo de los dientes con un micro-TC, obteniendo resultados comparables con los métodos tradicionales. Las diferencias con nuestro trabajo podrían deberse a que el micro-TC empleado en su estudio permitió utilizar una potencia de 15 W, mientras que el equipo que nosotros empleamos trabaja con una potencia máxima de 10 W.

El conteo de GLG utilizando estereomicroscopía, microscopía óptica, MEB y micro-TC resultó más sencillo en individuos jóvenes con la cavidad pulpar de gran tamaño. A medida que la cavidad pulpar se cerraba, la pérdida de definición y aproximación de los últimos GLG depositados dificultó el proceso. Esto ocurrió en los ejemplares PPH macho de 139 y 143,5 cm, PPH hembra de 187 cm, SCO macho de 215 y 216 cm y TTR hembra de 318 cm, en los que no se pudo completar el conteo de GLG y solo se estimó una edad mínima. Otros trabajos coinciden en que la estimación de la edad mediante el conteo de GLG es más sencilla en individuos jóvenes. En animales viejos el cierre de la cavidad pulpar dificulta el proceso, ya que los GLG se vuelven más finos y difíciles de leer (Gallo-Reynoso *et al.*, 2014; Henriksen *et al.*, 2024).

Además de la morfología de los dientes, la presencia de piedras pulpares también condiciona la identificación de GLG. Las piedras pulpares son centros secundarios de depósito de dentina que se forman en una región de la cavidad pulpar y en ocasiones pueden causar compresiones de los GLG que conducen a errores en el recuento (Hohn *et al.*, 1989; Mead *et al.*, 1980). En las secciones de los dientes de TTR hembra de 280 cm y TTR hembra de 318 cm visualizadas al microscopio óptico y al estereomicroscopio se encontraron piedras pulpares; este hallazgo dificultó el conteo en el caso del ejemplar TTR hembra de 318 cm, pero no en el individuo TTR hembra de 280 cm.

Un resultado llamativo de nuestro estudio fue encontrar variaciones en el conteo de GLG entre diferentes dientes de un mismo individuo y entre las dos caras de una misma sección, tanto empleando una misma técnica como entre técnicas distintas. Por ejemplo, para el ejemplar hembra de TTR de 236 cm se estimaron dos años con estereomicroscopía y microscopía óptica, mientras que con MEB y micro-TC solamente se contó un GLG. Estas variaciones individuales en la estimación de la edad podrían ser debidas a alteraciones en el depósito de los GLG, cuyas causas son todavía desconocidas, pero es probable que se vea influenciado por cambios estacionales, nutritivos, la tasa de crecimiento y el estado general de salud de cada animal (Barratclough *et al.*, 2023; Hohn, 1989). Además de su posible relación con procesos fisiológicos, las fluctuaciones en el conteo para un mismo individuo también pueden ser el resultado de errores de los lectores por una identificación deficiente de los GLG. Estos errores son principalmente causados por una preparación inadecuada de las secciones, lo que resulta en una exposición incompleta de la cavidad pulpar, un exceso de lijado, una descalcificación insuficiente o excesiva y la rotura de los dientes durante su preparación (Henriksen *et al.*, 2024; Hohn, 1989, 2018).

En este trabajo, las secciones que fueron lijadas en exceso y alcanzaron un grosor inferior a los 0,4 mm ofrecieron peores resultados al ser visualizadas con el estereomicroscopio y el microscopio óptico; las que superaron los 2 mm de grosor, como en el caso de TTR macho de 284 cm y TTR hembra de 304 cm, tampoco mostraron una buena resolución de los GLG y no permitieron realizar el conteo. En cuanto a la descalcificación, como la duración del proceso fue independiente del grosor de la sección, aquellas secciones con un grosor inferior a 0,3 mm (como los dientes de los ejemplares de DDE macho de 151 cm y de 214 cm) sufrieron una descalcificación excesiva, perdiéndose la definición de los GLG al microscopio óptico. En el caso de la sección del diente de TTR hembra de 304 cm, el tiempo de descalcificación no fue suficiente ya que tras el proceso no mejoró la resolución de los GLG. Por tanto, es importante trabajar con secciones de igual grosor para poder estandarizar la duración de la descalcificación. Por otro lado, los dientes desgastados o con morfologías anormales, como en el caso del individuo PPH macho de 167 cm, impiden una correcta preparación de la sección ya que dificultan realizar el lijado hasta la línea media, por lo que la cavidad pulpar no queda completamente expuesta y no se puede llevar a cabo el conteo de GLG. Por todo lo descrito anteriormente, es fundamental disponer de 3-5 piezas dentales de un mismo ejemplar para poder preparar varias secciones por si en alguna de ellas los GLG no son valorables (Henriksen *et al.*, 2024; Hohn, 1989).

La longitud total de los animales también se puede utilizar para estimar la edad de los individuos. Los cetáceos crecen rápidamente tras el nacimiento y después sufren una disminución gradual de la tasa de crecimiento hasta alcanzar el tamaño asintótico adulto

(Herrman *et al.*, 2020; Read *et al.*, 1993). Por lo tanto, teniendo también en cuenta los tamaños al nacimiento y las longitudes máximas para cada especie (López *et al.*, 2015), en un principio supusimos que los individuos de menor tamaño serían los más jóvenes y, por ende, aquellos con un menor número de GLG, mientras que los individuos con una longitud total mayor deberían ser los más viejos y presentar un contaje de GLG más elevado. Sin embargo, esta predicción solamente se cumplió en el caso de los animales de menor longitud total. A medida que los individuos se aproximaban a la longitud adulta, los resultados fueron más variables, encontrando dentro de una misma especie animales de gran tamaño con menos GLG que otros de menor longitud. Por ejemplo, en el individuo de PPH macho de 143,5 cm se estimó una edad mínima de 9 años, mientras que en el ejemplar macho de 172 cm de la misma especie solamente se identificaron 4 GLG con el MEB. Estas incoherencias se deben a que la tasa de crecimiento y, por tanto, la longitud de los individuos se ven influenciadas por diversos factores como la nutrición, el hábitat, el estado de salud general, el sexo o la estación, de forma que para una misma edad se observan amplios rangos de longitud, incluso en individuos jóvenes. Además, el tamaño es menos informativo cuando los delfines se aproximan a la longitud asintótica, es decir, cuando la tasa de crecimiento se aproxima a 0. Por tanto, la longitud no se considera un índice preciso para la estimación de la edad en odontocetos (McFee *et al.*, 2012; Read *et al.*, 1993; Schwarz, 2009, citado por Herrman *et al.*, 2020).

Para completar la validación de los resultados obtenidos en este trabajo, además de la comparación entre las distintas técnicas, sería interesante poder contar con individuos de historia o edad conocida como en otros estudios (Baier-Stegmaier *et al.*, 2023; Henriksen *et al.*, 2024), pero ese tipo de muestras son muy difíciles o imposibles de conseguir en individuos salvajes. Además, se ha utilizado una muestra pequeña y distribuida de manera desigual entre las diferentes categorías de edad y sexo, por lo que en el futuro deberían incluirse en el estudio dientes de más individuos que cubriesen todos los grupos de edad.

6. CONCLUSIONES

Con este TFG se ha puesto a punto en la Facultad de Veterinaria de la USC una técnica económica, rápida y sencilla para la estimación de la edad en odontocetos mediante el conteo de grupos de capas de crecimiento (GLG) en secciones de dientes lijadas y pulidas, utilizando estereomicroscopía y microscopía óptica. Además, se ha validado la técnica comparando los resultados con los obtenidos en secciones descalcificadas de los mismos dientes empleando microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y microtomografía computarizada.

Aunque la microscopía óptica en secciones no tratadas ha demostrado ser una técnica valiosa para la estimación de la edad en todas las especies, los mejores resultados tanto para la identificación de las estructuras dentales como para el conteo de GLG en los dientes se obtuvieron con el microscopio electrónico de barrido.

El conteo de GLG en todas las técnicas resultó más sencillo en animales jóvenes con la cavidad pulpar de mayor tamaño, pues a medida que se cierra la cavidad pulpar los GLG están más próximos y son más delgados, empeorando su definición y dificultando el recuento.

Para obtener unos buenos resultados es fundamental contar con 3-5 dientes de cada ejemplar y realizar una buena preparación de las secciones, de un grosor adecuado, exponiendo completamente la cavidad pulpar y evitando el exceso o la falta de descalcificación.

7. **BIBLIOGRAFÍA**

- Aguilar, R., García, S., de la Torre, A. y Peñalver, J. (2009). *Cetáceos del área galaico-cantábrica. Zonas de importancia para su conservación*. Oceana. <https://europe.oceana.org/es/reports/cetaceos-del-area-galaico-cantabrica-zonas-de-importancia-para-su-0/>
- Alstrup, A. K. O., Munk, O. L., Jensen, T. H., Jensen, L. F., Hedayat, A. y Hansen, B. (2017). Magnetic resonance imaging and computed tomography as tools for the investigation of sperm whale (*Physeter macrocephalus*) teeth and eye. *Acta veterinaria Scandinavica*, 59(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0307-y>
- Álvarez, A (2018). *Estimación de la edad en diferentes especies de odontocetos mediante el estudio histológico de sus dientes*. Trabajo de Fin de Grado. Universidade de Santiago de Compostela.
- Bada, J., Brown, S. y Masters, P. (1980). Age determination of marine mammals based on aspartic acid racemization in the teeth and lens nucleus. En W. F. Perrin y A. C. Myrick (Eds.); *Age determination of toothed whales and sirenians* (pp. 113-118). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 3), Cambridge.
- Baier-Stegmaier, S., Gundlach, C., Chriél, M., Hansen, M. S., Vedel-Smith, C., Hansen, C. V., Johansson, D. K., Henriksen, L. B., Wahlberg, M., Thøstesen, C. B., Alstrup, A. K. O., Gregersen, K. M., Pertoldi, C. y Pagh, S. (2023). Computed Tomography as a Method for Age Determination of Carnivora and Odontocetes with Validation from Individuals with Known Age. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(11), 1783. <https://doi.org/10.3390/ani13111783>
- Barratclough, A., McFee, W. E., Stolen, M., Hohn, A. A., Lovewell, G. N., Gomez, F. M., Smith, C. R., Garcia-Parraga, D., Wells, R. S., Parry, C., Daniels, R., Ridgway, S. H. y Schwacke, L. (2023). How to estimate age of old bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*); by tooth or pectoral flipper? *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1135521>
- Barratclough, A., Sanz-Requena, R., Marti-Bonmati, L., Schmitt, T. L., Jensen, E. y García-Párraga, D. (2019). Radiographic assessment of pectoral flipper bone maturation in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), as a novel technique to accurately estimate chronological age. *PLoS one*, 14(9), e0222722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222722>
- Barratclough, A., Smith, C. R., Gomez, F. M., Photopoulou, T., Takeshita, R., Pirotta, E., Thomas, L., McClain, A. M., Parry, C., Zoller, J. A., Horvath, S. y Schwacke, L. H. (2021). Accurate Epigenetic Aging in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*), an

- Essential Step in the Conservation of at-Risk Dolphins. *Journal of Zoological and Botanical Gardens*, 2(3), 416-420. <https://doi.org/10.3390/jzbg2030030>
- Barrett, C. E., Evans, I., Morgan, T. y Olivier, A. K. (2024). Novel processing and staining methodology of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) teeth for age determination. *Journal of Histotechnology*, 1–8. <https://doi.org/10.1080/01478885.2024.2327155>
- Bauer, R. D., Johnson, A. M. y Scheffer, V. B. (1964). Eye Lens Weight and Age in the Fur Seal. *The Journal of Wildlife Management*, 28(2), 374–376. <https://doi.org/10.2307/3798101>
- Bernt, K. E., Hammill, M. O. y Kovacs, K. M. (1996). Age estimation of grey seals (*Halichoerus grypus*) using incisors. *Marine Mammal Science*, 12(3), 476-482. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1996.tb00602.x>
- Blundell, G. M. y Pendleton, G. W. (2008). Estimating age of harbor seals (*Phoca vitulina*) with incisor teeth and morphometrics. *Marine Mammal Science*, 24(3), 577-590. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2008.00194.x>
- Braulik, G. (2019). *Stenella coeruleoalba*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T20731A50374282. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T20731A50374282.en>
- Braulik, G., Minton, G., Amano, M. y Bjørge, A. (2020). *Phocoena phocoena*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T17027A50369903. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-2.RLTS.T17027A50369903.en>
- Butti, C., Corain, L., Cozzi, B., Podestà, M., Pirone, A., Affronte, M. y Zotti, A. (2007). Age estimation in the Mediterranean bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu 1821) by bone density of the thoracic limb. *Journal of anatomy*, 211(5), 639–646. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00805.x>
- Calzada, N., Lockyer, C. H. y Aguilar, A. (1994). Age and sex composition of the striped dolphin die-off in the Western Mediterranean. *Marine Mammal Science*, 10(3), 299-310. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1994.tb00484.x>
- Campana, S. y Stewart, R. (2014). Bomb dating, age validation and quality control of age determinations of monodontids and other marine mammals. *NAMMCO Scientific Publications*, 10. <https://doi.org/10.7557/3.2987>
- Caron, L. y Smith, T. (1990). Philopatry and site tenacity of belugas (*Delphinapterus leucas*) hunted by the Inuit at the Nastapoka Estuary, eastern Hudson Bay. En T. G. Smith, D. J. ST. Aubin y J. R. Geraci (Eds.), *Advances in Research on the Beluga Whale (Delphinapterus leucas)* (pp. 69-79). Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences 224.

- Chittleborough, R. (1959). Determination of age in the humpback whale (*Megaptera nodosa* Bonaterre). *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 10(2), 125-143. <https://doi.org/10.1071/MF9590125>
- Decreto 88/2007 [Consellería de Medio Ambiente y Desarrollo Sostenible]. Por el que se regula el Catálogo gallego de especies amenazadas. 19 de abril de 2007.
- Evans, K., Kemper, C., Mckenzie, J. y Mcintosh, R. (2007). *Age determination of marine mammals using tooth structure*. Marine Mammal Ageing Facility, South Australian Museum.
- Evans, K. y Robertson, K. (2001). A note on the preparation of sperm whale (*Physeter macrocephalus*) teeth for age determination. *The Journal of Cetacean Research and Management*, 3(1), 101-107. <https://doi.org/10.47536/jcrm.v3i1.907>
- Feldkamp, L., Davis, L. C., y Kress, J. (1984). Practical Cone-Beam Algorithm. *Journal of the Optical Society of America*, 1(6), 612-619.
- Gallo-Reynoso, J. P., Francisco, E. y Ortiz, C. (2014). Age estimation on long-beaked common dolphins, *Delphinus capensis*, from the Gulf of California. *Therya*, 5(2), 449-460. <https://doi.org/10.12933/therya-14-198>
- Genov, T. (2023). *Delphinus delphis* (Europe assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2023: e.T134817215A219009724. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://www.iucnredlist.org/species/134817215/219009724>
- Guglielmini, C., Zotti, A., Bernardini, D., Pietra, M., Podestá, M. y Cozzi, B. (2002). Bone density of the arm and forearm as an age indicator in specimens of stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *The Anatomical record*, 267(3), 225–230. <https://doi.org/10.1002/ar.10107>
- Henriksen, L., Thøstesen, C., Alstrup, A., Larsen, H., Wahlberg, M., Siebert, U. y Pagh, S. (2024). A New Simple Method for Age Determination of Harbour Porpoises (*Phocoena phocoena*). *Aquatic Mammals*, 50(1), 30-38. <https://doi.org/10.1578/AM.50.1.2024.30>
- Herman, D. P., Ylitalo, G. M., Robbins, J., Straley, J. M., Gabriele, C. M., Clapham, P. J., Boyer, R. H., Tilbury, K. L., Pearce, R. W. y Krahn, M. M. (2009). Age determination of humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) rough blubber fatty acid compositions of biopsy samples. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 277-293. <http://www.jstor.org/stable/24873697>
- Herrman, J. M., Morey, J. S., Takeshita, R., de Guise, S., Wells, R. S., McFee, W., Speakman, T., Townsend, F., Smith, C. R., Rowles, T. y Schwacke, L. (2020). Age determination of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) using dental radiography

- pulp:tooth area ratio measurements. *PLoS ONE*, 15(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242273>
- Hohn, A. A. (1980a). Age determination and age related factors in the teeth of Western North Atlantic bottlenose dolphins. *Scientific Reports of the Whales Research Institute*, 32, 39-66.
- Hohn, A. A. (1980b). Analysis of growth layers in the teeth of *Tursiops truncatus* using light microscopy, microradiography, and SEM. En W. F. Perrin y A. C. Myrick (Eds.), *Age determination of toothed whales and sirenians* (pp. 155-160). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 3), Cambridge.
- Hohn, A. A. (2018). Age Estimation. En B. Würsig, J. G. M. Thewissen y K. M. Kovacs (Eds.), *Encyclopedia of Marine Mammals* (3^a ed., pp. 10–14). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00041-8>
- Hohn, A. A., Scott, M., Wells, R., Sweeny, J. S. y Irvine, A. B. (1989). Growth layers in teeth from known age, free-ranging bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science*, 5(4), 315-342. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1989.tb00346.x>
- Izzo, C., Hamer, D. J., Bertozzi, T., Donnellan, S. C. y Gillanders, B. M. (2011). Telomere length and age in pinnipeds: the endangered Australian sea lion as a case study. *Marine Mammal Science*, 27(4), 841-851. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2010.00450.x>
- Kastelle, C. R., Shelden, K. E. W. y Kimura, D. K. (2003). Age determination of mysticete whales using ²¹⁰Pb/²²⁶Ra disequilibria. *Canadian Journal of Zoology*, 81(1), 21-32.
<https://doi.org/10.1139/z02-214>
- Kesselring, T., Viquerat, S., Brehm, R. y Siebert, U. (2017). Coming of age: - Do female harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the North Sea and Baltic Sea have sufficient time to reproduce in a human influenced environment? *PLoS ONE*, 12(10).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186951>
- Klevezal, G. A. (1980). Layers in the hard tissues of mammals as a record of growth rhythms of individuals. En W. F. Perrin y A. C. Myrick (Eds.), *Age determination of toothed whales and sirenians* (pp. 89-94). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 3), Cambridge.
- Klevezal, G.A. y Kleinenberg, S.F. (1969). *Age determination of mammals from annual layers in teeth and bones*. Trad. Israel Program for Scientific Translations. (Trabajo original publicado en 1967).
- Koopman, H. N., Iverson, S. J. y Gaskin, D. E. (1996). Stratification and age-related differences in blubber fatty acids of the male harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of comparative physiology B*, 165(8), 628–639. <https://doi.org/10.1007/BF00301131>

- Kuiken, T. y Hartmann, M. G. (Eds.). (1991). Cetacean pathology: dissection techniques and tissue sampling. *European Cetacean Society Special Publication Series*, 17, 26-34. <https://www.europeancetaceansociety.eu/ecs-special-publication-series>
- Laws, R. M. (1952). A new method of age determination for mammals. *Nature*, 169(4310), 972–973. <https://doi.org/10.1038/169972b0>
- Laws, R. (1953). A new method of age determination in mammals with special reference to the Elephant Seal (*Mirounga leonina* L.). *Scientific Reports Falkland Islands Dependencies Survey*, 2.
- Loch, C., Kieser, J. A. y Fordyce, R. E. (2015). Enamel ultrastructure in fossil cetaceans (Cetacea: Archaeoceti and Odontoceti). *PloS one*, 10(1), e0116557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116557>
- Loch, C., Schwass, D. R., Kieser, J. A. y Fordyce, R. E. (2013). Use of Micro-Computed Tomography for Dental Studies in Modern and Fossil Odontocetes: Potential Applications and Limitations. *NAMMCO Scientific Publications*, 10. <https://doi.org/10.7557/3.2616>
- Lockyer, C. (1995). A review of factors involved in zonation in odontocete teeth, and an investigation of the likely impact of environmental factors and major life events on harbour porpoise tooth structure. En A. Bjørge y G. P. Donovan (Eds.), *Biology of the phocoenids* (pp. 511-529). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 16), Cambridge.
- Lockyer, C., Mackey, B., Read, F., Härkönen, T. y Hasselmeier, I. (2010). Age determination methods in harbour seals (*Phoca vitulina*) with a review of methods applicable to carnivores. *NAMMCO Scientific Publications*, 8, 245-263. <https://doi.org/10.7557/3.2688>
- López, A. (2003). *Estatus dos pequenos cetáceos na plataforma de Galicia*. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- López, A. (2018). *Cetáceos: guía de identificación*. Coordinadora para o Estudo dos Mamíferos Mariños (CEMMA).
- López, A., Covelo, P. y Martínez, J. A. (2015). *Asistencia e estudo dos réptiles e mamíferos mariños en Galicia*. *Caderno de campo*. Dirección Xeral de Conservación da Natureza, Consellería de Medio Ambiente, Territorio e Infraestruturas. Xunta de Galicia.
- Lubetkin, S., Zeh, J., Rosa, C. y George, J. (2008). Age estimation for young bowhead whales (*Balaena mysticetus*) using annual baleen growth increments. *Canadian Journal of Zoology*. 86(6), 525-538. doi: <https://doi.org/10.1139/Z08-028>

- Luque, P. L., Learmonth, J. A., Santos Vazquez, M. B., Ieno, E. N. y Pierce, G. J. 2009. Comparison of two histological techniques for age determination in small cetaceans. *Marine Mammal Science*, 25(4), 902-919. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00304.x>
- Mbizah, M. M., Steenkamp, G. y Groom, R. J. (2016). Evaluation of the applicability of different age determination methods for estimating age of the endangered African wild dog (*Lycaon Pictus*). *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164676>
- McFee, W.E., Adams, J. D., Fair, P. A. y Bossart, G. D. (2012). Age distribution and growth of two bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) populations from capture-release studies in the Southeastern United States. *Aquatic Mammals*, 38(1), 17-30. <https://doi.org/10.1578/AM.38.1.2012.17>
- Mead, J. G., Stuart, L. J., Hohn, A. A., Kasuya, T., Marsh, H. D., Mitchell, E. D., Miyazaki, N., Myrick, A. C. y Sheldrick, M. C. (1980). Report of the Workshop, Session reports: Beaked whales. En W. F. Perrin y A. C. Myrick (Eds.), *Age determination of toothed whales and sirenians* (pp. 2-9). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 3), Cambridge.
- Medill, S., Derocher, A. E., Stirling, I. y Lunn, N. (2009). Reconstructing the reproductive history of female polar bears using cementum patterns of premolar teeth. *Polar Biology*, 33(1), 115-124. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0689-z>
- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (21 de junio de 2023). *Situación actual del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y Catálogo Español de Especies Amenazadas*. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion-de-especies/especies-proteccion-especial/ce-proteccion-listado-situacion.html>
- Moore, M., Early, G., Touhey, K., Barco, S., Gulland, F. y Wells, R. (2007). Rehabilitation and release of marine mammals in the United States: Risks and benefits. *Marine Mammal Science*, 23(4), 731-750. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2007.00146.x>
- Murphy, S., Perrott, M., McVee, J., Read, F. L. y Stockin, K. A. (2014). Deposition of growth layer groups in dentine tissue of captive common dolphins *Delphinus delphis*. *NAMMCO Scientific Publications*, 10. <https://doi.org/10.7557/3.3017>
- Myrick, A. C., Hohn, A. A., Sloan, P., Kimura, M. y Stanley, D. (1983). *Estimating age of spotted and spinner dolphins (Stenella attenuata and Stenella longirostris) from teeth*. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Report NMFS.
- Myrick, A.C., Klevezal, G. A., Prime, J., Boyde, A., Clarke, R., Gurevich, V. S., Hohn, A. A., Kasuya, T., Kimura, M., Kozicki, V. M., Lockyer, C., Marsh, H. D., Mitchell, E. D.,

- Miyazaki, N., Perrin, W. F., Stewart, B. S. y Sergeant, D. E. (1980). Session reports: Dolphins. En W. F. Perrin y A. C. Myrick (Eds.), *Age determination of toothed whales and sirenians* (pp. 21-30). Reports of the International Whaling Commission (Special Issue 3), Cambridge.
- Myrick, A. C., Shallenherger, E. W., Kasg, I. y Mackay', D. B. (1984). Calibration of dental layers in seven captive hawaiian spinner dolphins, *Stenella longirostris*, based on tetracycline labeling. *Fishery Bulletin*, 82(1), 207-225.
- Olsen, M. T., Robbins, J., Bérubé, M., Rew, M. B. y Palsbøll, P. J. (2014). Utility of telomere length measurements for age determination of humpback whales. *NAMMCO Scientific Publications*, 10. <https://dx.doi.org/10.7557/3.3194>
- Olson, Å. y Stenlid, J. (2022). Population dynamics of forest tree pathogens. En F. O. Asiegbu y A. Kovalchuk (Eds.), *Forest Microbiology* (Vol. 2, pp. 131–143). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85042-1.00041-0>
- Orden TED/1126/2020 [Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico]. Por la que se modifica el Anexo del Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas, y el Anexo del Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras. 20 de noviembre de 2020.
- Owen, R. (1845). *Odontography; or, A treatise on the comparative anatomy of the teeth; their physiological relations, mode of development, and microscopic structure, in the vertebrate animals*. (Vol. 1). Hippolyte Baillièrre. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.16281>
- Perrin, W. F. y Myrick, A. C. (Eds.). (1980). *Age determination of toothed whales and sirenians*. Reports of the International Whaling Commission (Special Issue, 3), Cambridge.
- Peters, K. J., Gerber, L., Scheu, L., Ciciarella, R., Zoller, J. A., Fei, Z., Horvath, S., Allen, S. J., King, S. L., Connor, R. C., Rollins, L. A. y Krützen, M. (2022). An epigenetic DNA methylation clock for age estimates in Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Evolutionary applications*, 16(1), 126–133. <https://doi.org/10.1111/eva.13516>
- Pribanic, S., Miokovic, D. y Kovacic, D. (2000). Preliminary growth rate and body lengths of the bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* (Montagu,1821) from the Adriatic Sea. *Natura Croatica*, 9(3), 179-188.
- Read, A. J., Wells, R. S., Hohn, A. A. y Scott, M. D. (1993). Patterns of growth in wild bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Journal of Zoology*, 231(1), 107-123. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1993.tb05356.x>

- Read, F. L., Hohn, A. A. y Lockyer, C. H. (2018). A review of age estimation methods in marine mammals with special reference to monodontids. *NAMMCO Scientific Publications*, 10. <https://doi.org/10.7557/3.4474>
- Read, F.L., Santos, M.B., González, A.F., López, A., Ferreira, M., Vingada, J. y Pierce, G.J. (2010). *Understanding harbour porpoise (Phocoena phocoena) and fishery interactions in the north-west Iberian Peninsula*. Document AC20/Doc.6.1b (S), 20th ASCOBANS Advisory Committee Meeting.
- Real Decreto 139/2011 [Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino]. Para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. 4 de febrero de 2011.
- Rede de Varamentos de Galicia, REVARGAL. (2023). *Datos generales de la Red de Varamentos de Galicia en 2023*. Boletín REVARGAL nº 2. http://www.cemma.org/inve/Revargal_boletin_2_esp.pdf
- Rosel, P., Archer, F., Baker, C. S., Boness, D. J., Brownell, R. L., Churchill, M., Costa, A. P., Domning, D. P., Jefferson, T. A., Kinze, C., McGowen, M., Oliveira, L. R., Wang, J. Y. y Yamada, T. K. (Junio de 2023). *List of marine mammal species and subspecies*. The Society for Marine Mammalogy. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://marinemammalscience.org/science-and-publications/list-marine-mammal-species-subspecies/>
- Rouby, E., Ridoux, V. y Authier, M. (2021). Flexible parametric modeling of survival from age at death data: A mixed linear regression framework. *Population Ecology*, 63(1), 108–122. <https://doi.org/10.1002/1438-390X.12069>
- Saavedra, C., Pierce, G. J., Gago, J., Jusufovski, D., Cabrero, Á., Cerviño, S., López, A., Martínez-Cedeira, J. A. y Santos, M. B. (2017). Factors driving patterns and trends in strandings of small cetaceans. *Marine Biology*, 164(8), 164-165. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3200-3>
- Scheffer, V. B. (1950). Growth layers on the teeth of Pinnipedia as an indication of age. *Science*, 112(2907), 309–311. <https://doi.org/10.1126/science.112.2907.309-a>
- Schwacke, L. H., Marques, T. A., Thomas, L., Booth, C. G., Balmer, B. C., Barratclough, A., Colegrove, K., De Guise, S., Garrison, L. P., Gomez, F. M., Morey, J. S., Mullin, K. D., Quigley, B. M., Rosel, P. E., Rowles, T. K., Takeshita, R., Townsend, F. I., Speakman, T. R., Wells, R. S., ... Smith, C. R. (2022). Modeling population effects of the Deepwater Horizon oil spill on a long-lived species. *Conservation biology: the journal of the Society for Conservation Biology*, 36(4), e13878. <https://doi.org/10.1111/cobi.13878>

- Sergeant, D. E. (1959). Age determination in odontocete whales from dentinal growth layers. *Norsk Hvalfangsttid*, 48(6), 273-288.
- Sergeant, D.E. (1967). Age determination of land mammals from annuli. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 32, 297-300.
- Stewart, R., Stewart, B., Stirling, I. y Street, E. (1996). Count of growth layer groups in cementum and dentine of ringed seals (*Phoca hispida*). *Marine Mammal Science*, 12(3), 383-401.
- Uriarte, A., García-Barón, I., Franco, J. y Louzao, M. (2021). *Delfín mular *Tursiops truncatus*. Evaluación espacial de la Red Natura 2000 para la conservación de especies de interés comunitario en la Demarcación Noratlántica*. AZTI. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25984.76807>
- Viglino, M., Ezcurra, M. D., Fordyce, R. E. y Loch, C. (2023). The better to eat you with: morphological disparity and enamel ultrastructure in odontocetes. *Scientific reports*, 13(1), 16969. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44112-8>
- Wells, R.S., Natoli, A. y Braulik, G. (2019). *Tursiops truncatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2019: e.T22563A156932432. Recuperado el 26 de junio de 2024 de <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2019-1.RLTS.T22563A156932432.en>
- Yalman, R. G., Bruegemann, William., Baker, P. T. y Garn, S. M. (1959). Volumetric Determination of Calcium in Presence of Phosphate. *Analytical Chemistry*, 31(7), 1230-1233. <https://doi.org/10.1021/ac60151a001>