

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di Laurea in Biologia marina

*Valutazione dell'ormone TSH in
Tursiops truncatus*

Tesi di laurea in:
Evoluzione ed adattamenti dei Vertebrati Marini

Relatore
Dott.ssa. Elena Fabbri

Presentata da
Dott. Sara Chiurazzi

Correlatore
Dott.ssa Annalisa Zaccaroni

Visto, si approva la tesi

Anno Accademico 2014/2015

Session III

INDICE

INDICE	a
Capitolo 1 - INTRODUZIONE	1
1.1 Mysticeti	1
1.2 Odontoceti	4
1.3 Tursiope (Tursiops truncatus)	10
1.3.1 Distribuzione geografica	11
1.3.2 Ciclo vitale e riproduttivo	12
1.3.3 Alimentazione	13
1.3.4 Comportamento sociale	13
1.3.5 Stato di conservazione	14
1.3.6 Cattività	18
Capitolo 2 APPARATO ENDOCRINO	20
2.1 Ipotalamo	20
2.2 Ipofisi	21
2.2.1 Adenoipofisi	21
2.2.2 Neuroipofisi	22
2.3 Asse HPA	23
2.4 Asse HPG	23
2.5 Asse HPT	25
2.5.1 Tiroide	25
2.5.2 Sintesi degli ormoni tiroidei	26
2.5.3 Funzione degli ormoni tiroidei	27
2.5.4 L'asse HPT e <i>Tursiops truncatus</i> : letteratura	28
Capitolo 2 - SCOPO DELLA TESI	34
Capitolo 3 - MATERIALI E METODI	36
3.1 Esemplari	36
3.2 Campionamento	36
3.3 Analisi	38
3.3.1 TSH	38
3.3.2 Ormoni tiroidei	40
3.4 Analisi statistica	41
Capitolo 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE	43
4.1 Metodo per l'analisi del TSH	43
4.2 TSH e ormoni tiroidei	45
Capitolo 5 - CONCLUSIONI	51
Bibliografia	53

Capitolo 1 - INTRODUZIONE

L'ordine Cetacea vanta attualmente 78 specie viventi, suddivise in due sottordini: Mysticeti e Odontoceti. Si tratta di organismi ormai completamente adattati alla vita acquatica, seppur discendenti da un antenato terrestre, per cui non hanno il bisogno di recarsi sulla terra ferma, nemmeno per la riproduzione o più semplicemente per il riposo (Jefferson, 1993).

1.1 Mysticeti



(*Megaptera novaeangliae*)

Sono mammiferi marini di dimensioni molto variabili: *Caperea marginata* è la più piccola, può raggiungere circa 7 metri di lunghezza e 3,5 tonnellate, mentre la Balenottera azzurra (*Balenoptera musculus*) ha una lunghezza media di 33 metri per 190 tonnellate. Inoltre, quasi tutte le specie che vi appartengono sono organismi migratori, per cui possono compiere grandi distanze a carattere stagionale.

Ciò che maggiormente distingue i mysticeti dagli odontoceti sono i fanoni, ovvero delle strutture cheratinizzate poste all'interno della cavità orale, nella quale sono disposti a creare due file laterali. Essi derivano dal palato duro, per quanto riguarda la parte dorsale, mentre ventralmente poggiano sulla lingua e sono quindi liberi. La loro funzione riguarda il nutrimento: essi infatti filtrano l'acqua che viene veicolata all'interno della bocca, per ricavarne il plancton, ovvero l'alimento principale dei mysticeti.

Un'ulteriore differenza rispetto agli odontoceti è rappresentata dallo sfiatatoio, che è costituito da due differenti aperture, collegate a due separate cavità nasali (Jefferson, 1993). Un'eccezione è tuttavia rappresentata dal Capodoglio: pur essendo un odontocete, presenta anch'esso due cavità ben separate.

Il sottordine dei Mysticeti è costituito da 4 famiglie:

- Balaenidae

Non sono presenti nel Mar Mediterraneo. Hanno dimensioni elevate e solitamente la sola testa comprende fino a un terzo della lunghezza totale dell'individuo. Tuttavia mancano di pinna dorsale e pliche nella cavità orale, mentre presentano numerose callosità dermiche sul muso.

Appartengono a questa famiglia la Balena della Groenlandia (*Balaena mysticetus*) e la Balena Franca australe (*Eubalaena australis*).

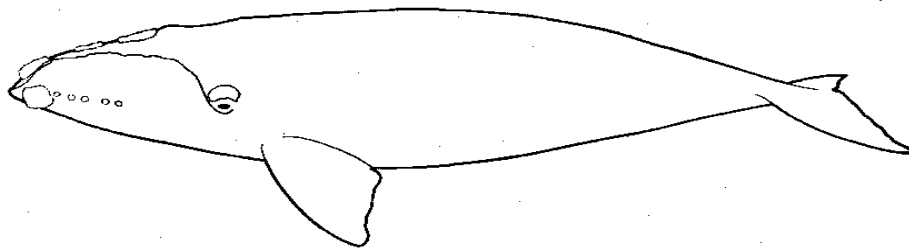


Fig.1: Balaenidae

- Neobalaenidae

E' rappresentata da una sola specie, la Balena Franca Pigmea (*Caperea marginata*). Si tratta di organismi di piccole dimensioni, 7 metri di lunghezza massima per circa 3,5 tonnellate. A differenza dei Balaenidae, presentano però una marcata pinna dorsale. Sono tuttavia esemplari di difficile avvistamento, per cui le loro abitudini sono ancora poco conosciute.

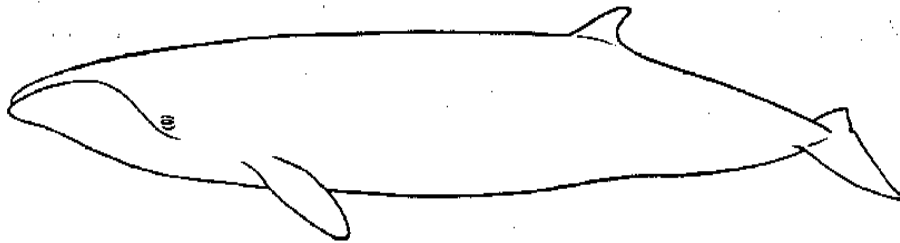


Fig. 2: Neobalaenidae

- Balaenopteridae

Comprende alcuni tra gli animali di dimensioni maggiori al mondo: tutti gli individui hanno infatti lunghezza superiore ai 7 metri, alcuni, come la Balenottera azzurra, arrivano a 33 metri. Sono caratterizzati da numerose pieghe ventrali che si estendono dal mento fino al ventre. La loro funzione è quella di aumentare la grandezza della cavità buccale, permettendo così l'ingresso di una maggiore quantità di acqua al suo interno, da cui verrà poi filtrato il plancton nutritivo.

Appartengono a questa famiglia la Balenottera azzurra (*Balenoptera musculus*), la Balenottera comune (*Balenoptera physalus*) e la Megattera (*Megaptera novaeangliae*).

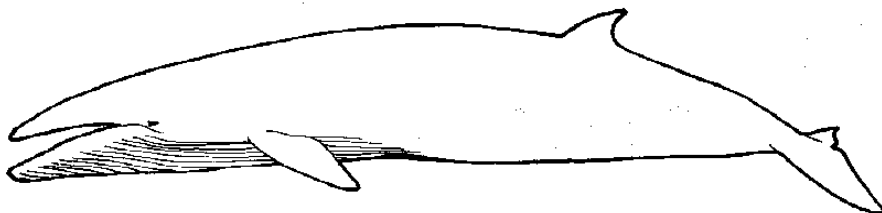


Fig.3: Balaenopteridae

- Eschrichtiidae

E' rappresentata da una sola specie, la Balena grigia (*Eschrichtius robustus*), ormai presente solo nell'oceano Pacifico e sud Atlantico.

Sono degli organismi che tendono ad avvicinarsi molto alla terra ferma, poichè si nutrono principalmente di organismi appartenenti al bentos, che predano dragando il fondo.

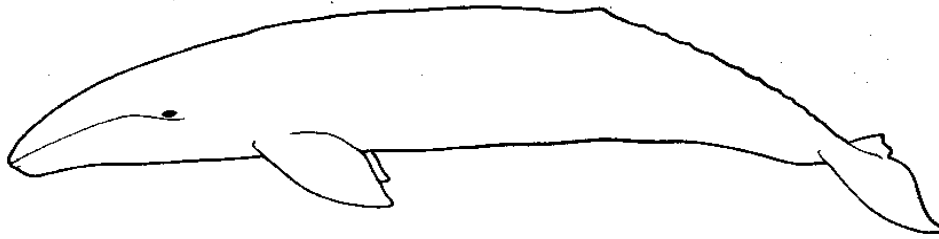


Fig. 4: Eschrichtiidae

1.2 Odontoceti



(*Tursiops truncatus*)

Ad eccezione del Capodoglio, gli Odontoceti sono cetacei di piccole e medie dimensioni, con evidente dimorfismo sessuale. La differenza principale tra Mysticeti e Odontoceti è la presenza, in questi ultimi, di denti all'interno della cavità buccale. Sono infatti organismi omodonti e monofisari e il numero di denti è variabile a seconda della specie presa in considerazione. Possiedono inoltre il melone, un organo costituito da tessuto adiposo, la cui funzione consiste nell'ecolocalizzazione. Infatti è coinvolto nella creazione di

echi specifici e nella loro ricezione, in modo da individuare con precisione la posizione nello spazio di prede e predatori, ma è anche utile alla navigazione (T.A. Jefferson, 1993).

Gli Odontoceti presentano infine un unico sfiatatoio, leggermente spostato a sinistra, collegato ad un'unica cavità nasale, ad eccezione del Capodoglio, che invece presenta due aperture e una sola cavità.

Appartengono al sottordine degli Odontoceti:

- **Physeteridae**

Questa famiglia è rappresentata dal solo Capodoglio (*Physeter macrocephalus*), che è l'Odontocete di maggiori dimensioni. Può infatti raggiungere i 18 metri di lunghezza, ma presenta anche il maggior dimorfismo sessuale per quanto riguarda le dimensioni.

Sono organismi teutofagi, si nutrono di cefalopodi presenti a profondità elevate (fino a 1000 metri). In passato venivano cacciati per lo spermaceti, una sostanza lipidica coinvolta nell'ecolocalizzazione, ma anche per il blubber e l'ambra grigia, una concrezione che ha origine nell'intestino crasso.

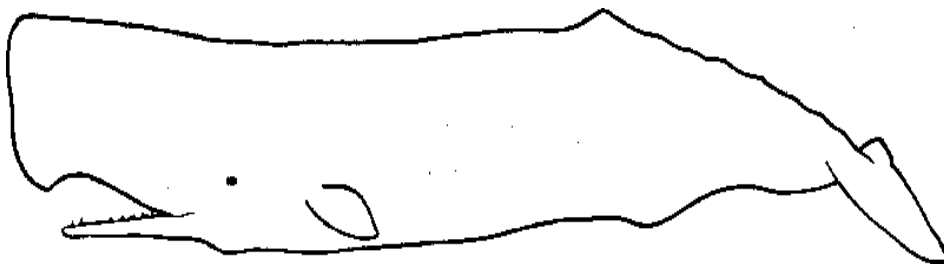


Fig. 5: Physeteridae

- Kogiidae

Sono anatomicamente simili al capodoglio, ma presentano dimensioni molto minori. Tuttavia non sono molto conosciuti, poichè sono animali di grandi profondità, per cui sono difficili da avvistare. Appartiene a questa famiglia il Cogia (*Kogia breviceps* e *K. sima*).

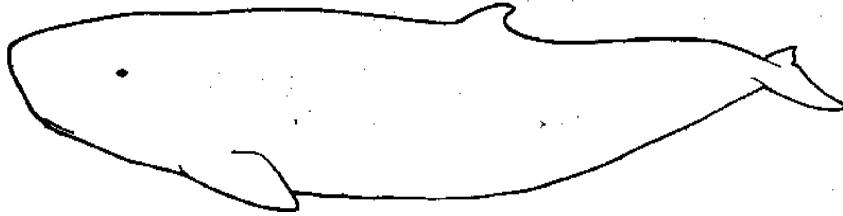


Fig.6: Kogiidae

- Ziphiidae

Sono cetacei di medie dimensioni, con un range piuttosto ampio di lunghezza (4-13 metri), caratterizzati da un dimorfismo sessuale inverso: le femmine sono infatti più grandi dei maschi. Sono caratterizzati da due solchi golari a "V" e una sorte di "tasca delle pinne". Appartiene a questa famiglia lo Zifio (*Ziphius cavirostris*).



Fig.7: Ziphiidae

- Plataniistidae, Iniidae, Pontoporiidae, Lipotiidae

Sono Odontoceti caratteristici dei corsi fluviali, quindi di habitat con acque torbide. Per adattarsi all'ambiente in cui vivono, hanno sviluppato una vista molto scarsa, un rostro molto allungato con numerosi denti e un collo mobile.

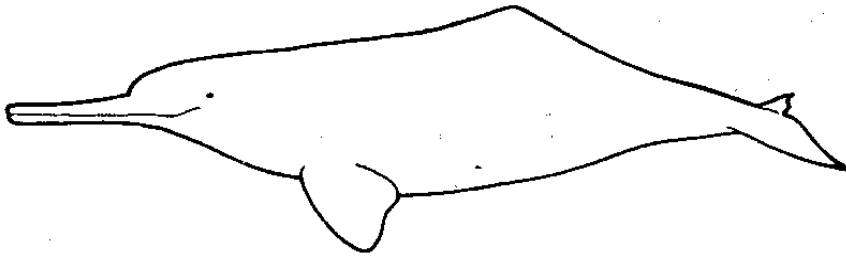


Fig.8: Plataniistidae

- Monodontidae

Sono animali di piccole dimensioni tipici dei mari freddi (max 6 metri di lunghezza). Questa famiglia comprende organismi caratterizzati dalla crescita elevata di un solo dente, mentre gli altri, seppure presenti, non erompono. Appartengono ai Monodontidae il Beluga (*Delphinapterus leucas*) e il Narvalo (*Monodon monocerus*).

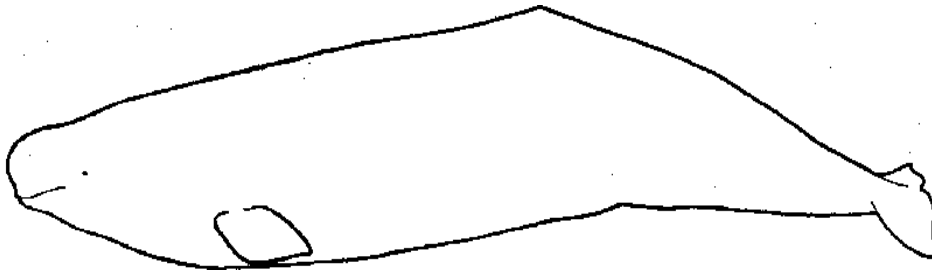


Fig.9: Monodontidae

- Delphinidae

Questa famiglia comprende 35 specie, di dimensioni e colorazioni estremamente variabili. Tra i più comuni organismi del Mediterraneo, appartenenti a questa famiglia, vi sono il Globicefalo (*Globicephala mela*), il Grampo (*Grampus griseus*), il Tursiope (*Tursiops truncatus*), la Stenella (*Stenella coeruleoalba*), il Delfino comune (*Delphinus delphis*) e l'Orca (*Orcinus orca*).

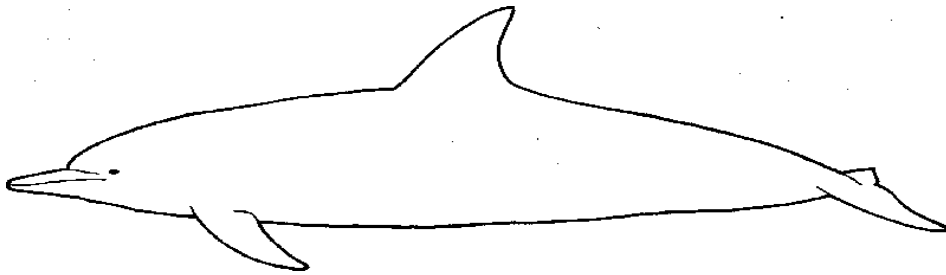


Fig.10: Delphinidae

- Phocoenidae

Sono mammiferi di piccole dimensioni (max 2,5 metri di lunghezza), che mancano di rostro. Presentano inoltre denti a forma di spatola, che risultano essere particolarmente taglienti. Appartengono a questa famiglia la Focena comune (*Phocena phocena*) e la Vaquita (*Phocena sinus*).

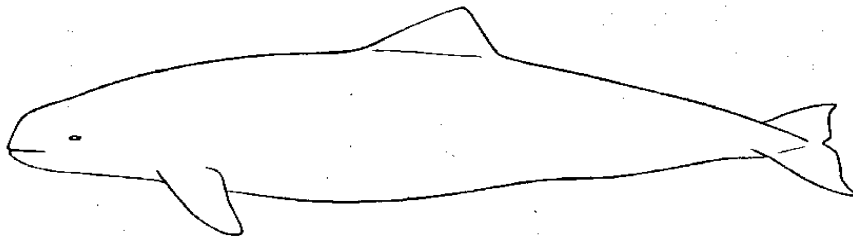


Fig.11: Phocoenidae

1.3 Tursiope (*Tursiops truncatus*)



Ordine: Cetacea
Sottordine: Odontoceti
Famiglia: *Delphinidae*
Genere: *Tursiops*
Specie: *T. truncatus*

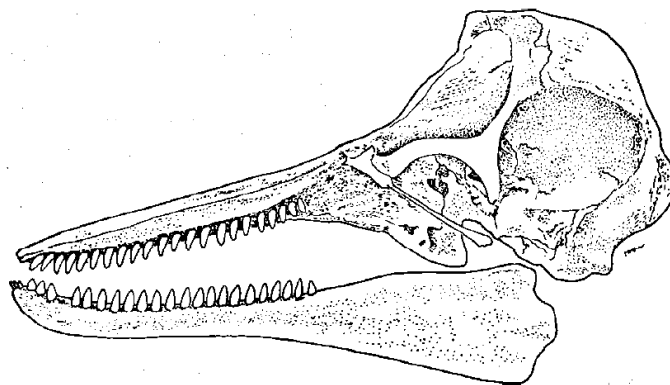


Fig.12: Vista laterale del teschio di *Tursiops truncatus*

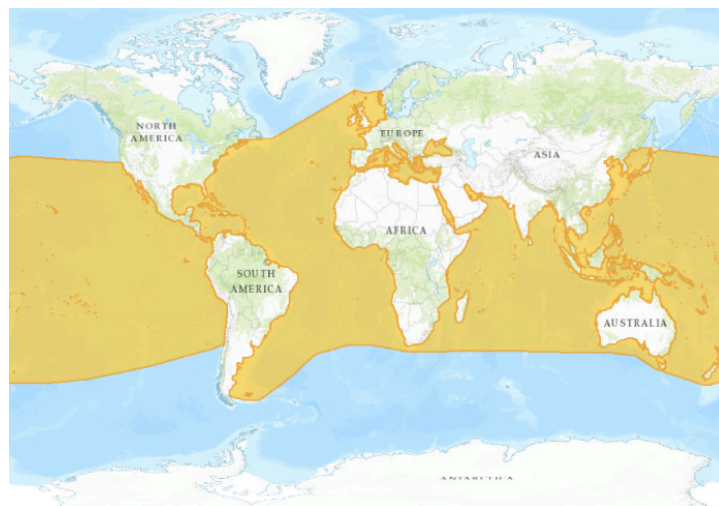
Il Tursiope è probabilmente uno dei cetacei più conosciuti grazie alla sua distribuzione, che permette facili avvistamenti, ma anche e soprattutto alla sua presenza in parchi acquatici in ambienti controllati o per le frequenti apparizioni in televisione e pubblicità (Jefferson et al., 1993).

E' un delfino di media taglia, con corpo fusiforme che si è sviluppato come convergenza evolutiva con lo scopo di garantire idrodinamicità, in modo da ridurre l'attrito con l'acqua. Sul capo presentano una netta demarcazione tra il

melone e il rostro, che è di piccole dimensioni (circa 8 cm). Dorsalmente la pigmentazione presenta varie sfumature del grigio, mentre ventralmente è molto più chiara. Questa assicura agli individui di essere difficilmente identificabili, sia se visti dal basso, che dall'alto nella colonna d'acqua.

Gli adulti presentano una range di lunghezza tra i 2 e i 3,5 metri, per circa 220-500 kg. Questi parametri variano però a seconda della distribuzione geografica e sono inversamente proporzionali alla temperatura dell'habitat in cui si trovano. Infatti, i tursiopi che popolano le acque pelagiche hanno dimensioni maggiori rispetto a quelli delle zone costiere.

1.3.1 Distribuzione geografica



(www.iucnredlist.org)

Il Tursiopo è un mammifero marino cosmopolita, è infatti diffuso in tutte le acque tropicali e temperate, sia nelle zone costiere che in quelle oceaniche con acque più profonde (Reynolds et al.,2000). E' stato infatti avvistato sia nell'Oceano Pacifico, che in quello Atlantico e Indiano. E' diffuso anche nel Mar Nero e nel Mar Mediterraneo. In Italia è di facile avvistamento lungo le coste siciliane, ma anche nel Mar Adriatico e nel Santuario dei cetacei.

La popolazione di *T.truncatus* vanta due differenti ecotipi: il primo si trova in habitat pelagici, soprattutto in prossimità di isole oceaniche, come ad esempio attorno alle isole Faroe, che rappresentano la popolazione più settentrionale,

mentre il secondo si trova nelle zone costiere a profondità di circa 30 metri massimi. Secondo Wells and Scott (1999,2009) gli individui appartenenti alle aree costiere compiono tutta una serie di movimenti riconducibili a:

- migrazioni stagionali
- spostamenti lungo l'habitat costiero
- periodi residenziali
- alternanza tra spostamenti di corto-medio raggio e periodi di residenza.

Spesso sono evidenti differenze tra popolazioni vicine: generalmente, gli esemplari che vivono nel Mar Nero hanno dimensioni minori rispetto a quelli del Nord Atlantico, mentre quelli mediterranei risultano essere una media tra essi. Geneticamente, la popolazione del Mar Nero possiede infatti differenze significative rispetto alle altre due popolazioni e presenta una minore diversità mitocondriale (Viaud-Martinez et al., 2008). Inoltre, si sono notate variazioni tra popolazioni inshore e offshore vicine tra loro. L'analisi del mtDNA ha mostrato che non vi è isolamento genetico tra le popolazioni offshore appartenenti ad habitat diversi, ma tuttavia questo è nettamente presente tra popolazioni inshore e offshore (Rice, 1998).

1.3.2 Ciclo vitale e riproduttivo

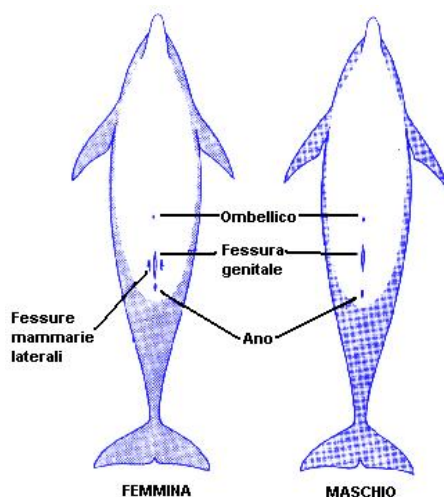


Fig.13: Organi sessuali del Tursiopo

In genere, le femmine raggiungono la maturità sessuale tra i 6 e i 12 anni, i maschi invece tra i 10 e i 13 anni. La gestazione ha durata di 12 mesi e le nascite di solito avvengono nella stagione estiva. I piccoli alla nascita misurano circa 1 metro per 10-12 kg di peso, mentre lo svezzamento avviene 18 mesi dopo la nascita. La riproduzione avviene ogni circa 6 anni, per permettere alla madre le

adeguate cure parentali.

1.3.3 Alimentazione

La differenza tra popolazioni inshore e offshore si riflette anche nella dieta: mentre le prime si nutrono principalmente di una varietà di pesci e invertebrati predati nella zona litorale e sub-litorale, le popolazioni offshore predano pesci mesopelagici e calamari oceanici (Reyes et al., 1991). Tuttavia, la dieta varia anche a seconda dell'habitat di appartenenza e della disponibilità di prede. Le aree di caccia possono quindi spaziare tra reef bentici e fondali sabbiosi, in cui si nutrono dei rispettivi predatori associati (Wells and Scott, 1999). Gannon et al, 2004 sostiene che i Tursiopi ricevano numerose informazioni riguardanti le prede grazie all'ecolocalizzazione: gli permette infatti di indentificarla e individuarne le dimensioni prima della cattura vera e propria.

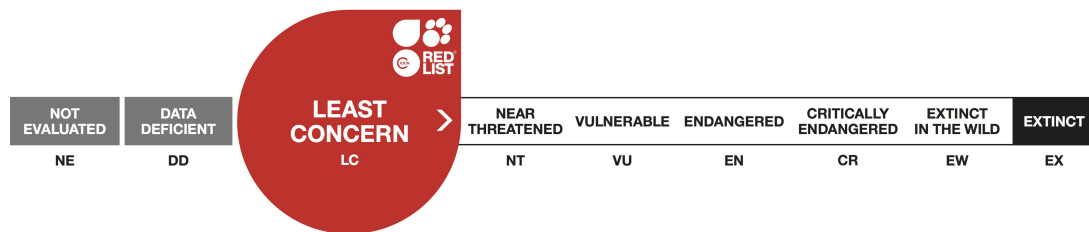
1.3.4 Comportamento sociale

Tursiops truncatus vive generalmente in gruppi di 12-15 individui, anche se in alcuni casi sono stati trovati pod di più di 1000 esemplari. Le popolazioni che vivono in aree costali, come baie ed estuari, tendono a formare gruppi di piccole dimensioni rispetto a quelle offshore, che invece radunano un numero di individui maggiore. Tuttavia, il trend non sembra crescere con l'aumentare della distanza dalla costa (Wells et al., 1999). La composizione di ogni gruppo dipende da sesso, età, maturità sessuale e familiarità (Wells, 2003), per cui le unità sociali includono nursery pod, un insieme di esemplari di giovanili di sesso differente e maschi adulti che possono trovarsi singolarmente o in coppia (Rogers et al., 2004).

In cattività sono stati osservati fenomeni di gerarchia, dove solitamente il maschio dalle dimensioni maggiori domina sui compagni di vasca. Le femmine mostrano una gerarchia meno rigida, anche se la femmina più grande mostra comunque segni di dominanza sugli esemplari più piccoli.

In natura *Tursiops truncatus* è attivo sia di giorno che di notte, portando avanti attività come la caccia, la socializzazione, le migrazioni e il riposo (Wells et al., 1999). La durata e la frequenza di esse dipende da fattori ambientali come la stagionalità, l'habitat, l'ora del giorno, ma anche da fattori fisiologici come il periodo riproduttivo.

1.3.5 Stato di conservazione



Tursiops truncatus è classificata come specie "Least Concern", ovvero non preoccupante, dalla IUCN Red List. Ciò è dovuto al fatto che, sebbene ci siano molti rischi connessi soprattutto ai gruppi che risiedono in habitat vicino alla costa, questi non incidono in maniera significativa sull'abbondanza e la distribuzione degli individui, per cui non ne risulta un declino della popolazione.

Le principali minacce sono:

- Cattura diretta:
in alcuni paesi come Messico, Guatemala, Costa Rica, India, Cina e Perù venivano in passato spesso cacciati per il consumo umano, in numero però sconosciuto. Nonostante la loro uccisione è nettamente diminuita negli ultimi anni, in seguito al divieto per legge nel 1996, circa un centinaio di delfini e altri piccoli cetacei sono oggi ancora vittime di pescatori che utilizzano la loro carne come esca per gli squali. La minaccia più consistente deriva però dal Giappone, dove tutt'ora vengono cacciati.



Fig. 14: cattura di
esemplari di
Tursiops
truncatus

- Catture vive:

Dopo il Marine Mammal Protection Act del 1972, è stata fortemente limitata la cattura di esemplari vivi destinati alla cattività a un valore inferiore al 2% dello stato della popolazione. In passato, erano stati infatti prelevati più di 530 individui di tursiope, in particolar modo dalle acque degli Stati Uniti. Grazie a questo atto però, non vi sono più stati prelievi in queste aree dal 1989. Tuttavia, questa pratica continua in altri paesi come Cuba, dove negli anni 1986-2004 sono stati prelevati 238 esemplari, ma anche nelle isole Solomon, Giappone e Russia.

- Catture accidentali:

I pescherecci di tutto il mondo, in maniera del tutto accidentale, predano individui di *Tursiops truncatus* attraverso reti da posta fisse e derivanti, cianciole, reti da traino e palangari, sia durante la pesca commerciale che quella ricreativa. Tuttavia, non si hanno stime attuali riguardo il numero delle catture (Hammond et al., 2008). Esse sono causate soprattutto da un'interazione basata sul cibo: i tursiopi riescono infatti a catturare prede che si trovano dentro le reti, spesso rimanendo coinvolti in esse. Sono quindi stati sviluppati una serie di deterrenti acustici, chiamati "pingers", che hanno lo scopo di allontanarli dalle reti, anche se il risultato del loro utilizzo non mostra chiari miglioramenti. Ultimamente si stanno invece studiando nuovi materiali per la costruzione delle reti, i quali prevedono l'uso di solfato di bario invece che del nylon, in modo da evitare al tursiope di

rimanere impigliato nelle reti durante la depredazione (Mooney et al., 2004).



Fig. 15: Pingers contro la depredazione dei tursiopi

- Overfishing:
Sono necessari ulteriori studi sulle possibili interazioni dannose dell'overfishing sulle prede di *Tursiops truncatus*. Un aumento della pesca dovuta alla crescente pressione commerciale ha sicuramente un effetto negativo sulla popolazione di questa specie. Ad esempio, per questo motivo, le popolazioni di Namibia e KwaZulu-Natal risultano essere vulnerabili (Peddemors, 1999).
- Abbattimento:
Molti esemplari di tursiope sono stati intenzionalmente uccisi da pescatori del Giappone e Hawaii e probabilmente queste pratiche vengono effettuate anche in altri paesi (Reyes, 1991). Per quanto riguarda l'azione giapponese, questa viene giustificata con la necessità di ridurre la competizione per la pesca commerciale della ricciola (*Seriola sp.*) (Wells and Scott, 1999).
- Inquinamento:
I tursiopi vengono classificati come ottimi indicatori della qualità dell'ecosistema marino, avendo un'ampia distribuzione e la capacità di adattarsi a habitat diversi. Vengono spesso studiati per la concentrazione di contaminanti nei loro tessuti, nei quali essi tendono a bio-accumularsi. L'inquinamento può provocare problemi di

infertilità, mortalità neonatale, immuno-deficienza, soprattutto per quanto riguarda l'accumulo di PCB e DDT. Per quanto riguarda le coste mediterranee di Italia e Francia, negli anni '90 si sono riscontrati livelli molto alti di Mercurio: si parla infatti di concentrazioni minime di 4,250µg Hg/g dw (Frodello et al., 2000).

- Inquinamento acustico:

La navigazione, l'utilizzo di sonar, l'esplorazione scientifica e la perforazione dei fondali producono suoni che possono confondere i mammiferi marini portandoli allo spiaggiamento. Un esempio è quello accaduto nell'aprile del 2006 a Zanzibar, dove è avvenuto uno spiaggiamento massivo di delfinidi, per un numero totale di 600 individui. In questo caso Amir e Jiddawi (2007) hanno ipotizzato una connessione con un evento sismico, originato nel sud della Tanzania, collegato all'esplorazione dei fondali marini per la ricerca di gas, tramite l'utilizzo di esplosivi e sonar.



Fig. 16:
spiaggiamento di
tursiopi a Zanzibar,
Aprile 2006

- Turismo:

Negli ultimi anni si è assistito a un costante aumento delle attività turistiche che propongono gite allo scopo di incontrare mammiferi marini nel loro habitat naturale. A Sarasota, in Florida, si è osservato il comportamento dei tursiopi in presenza di barche: gli individui hanno mostrato una minore distanza tra loro e una velocità nel nuoto molto differente rispetto a quando le imbarcazioni non sono nelle

vicinanze (Novacek et al., 2001). Naturalmente, l'influenza sarà maggiore a seconda del numero di barche presenti (Constantine et al., 2004). Tuttavia in alcuni paesi del mondo, l'attività di dolphin-watching rappresenta un'importante entrata economica, che supera di gran lunga l'interesse che deriva dalla cattura di mammiferi marini per utilizzarli come cibo o come esca. Il turismo ha quindi effetti sia positivi, che negativi.



Fig. 17: dolphin-watching in Nuova Zelanda

1.3.6 Cattività

I mammiferi marini vengono mantenuti in ambiente controllato da molto tempo. Tra di essi, il Tursiope (*Tursiops truncatus*) è sicuramente uno dei più frequenti presenti nei parchi marini, probabilmente per la sua facile addomesticabilità e per la sua abilità nel tollerare la cattività per lungo tempo.

I parchi marini e le associazioni che si occupano di essi sostengono differenti ragioni per cui è possibile mantenere questi animali in cattività, come la ricerca, la riabilitazione e la cura di individui spiaggiati, con lo scopo di un futuro rilascio, il quale incontra anche l'interesse pubblico su argomenti di tutela della natura. Questi però non sono gli unici scopi, poichè il grado di cooperazione tra animale e trainer, il loro utilizzo in show e performance pubbliche hanno dato origine a un grande interesse dei cittadini rivolto a queste specie.

Uno degli scopi maggiormente interessanti a livello scientifico riguarda l'ambito della ricerca, che può fornirci maggiori conoscenze sulle loro

caratteristiche, così da potercene prendere maggiormente cura nel loro habitat naturale.

Grazie ad essa, è stato infatti possibile ottenere diversi dati riguardanti:

- Ematologia;
- Fisiologia;
- Malattie;
- Comportamento;
- Riproduzione.

Tuttavia, è necessario sottolineare che la cattività rappresenta anche un habitat chiuso e controllato in cui non tutti i fattori naturali possono apparire e interagire come avviene in natura. Un esempio è quello riguardante le malattie. Gli studi condotti su animali mantenuti in cattività non sono stati d'aiuto nell'individuare i motivi di alcuni dei maggiori eventi di spiaggiamento avvenuti negli anni recenti, come quelli scatenati dall'epidemia di Morbillivirus.

Capitolo 2 APPARATO ENDOCRINO

L'apparato endocrino è un sistema di cellule, distribuite in più organi, il cui secreto, l'ormone, raggiunge attraverso la circolazione sanguigna un determinato organo o cellula bersaglio. Legandosi a specifici recettori presenti sul target, l'ormone innesca una sequenza di eventi biochimici con lo scopo di raggiungere una risposta biologica. Il sistema ormonale e quello nervoso lavorano quindi in contatto tra loro ed in maniera combinata. Tuttavia intervengono nel controllo di funzioni differenti: mentre il sistema nervoso controlla principalmente le azioni di muscoli e ghiandole specifici, l'apparato endocrino induce cambiamenti metabolici, come il metabolismo azotato, il metabolismo dei carboidrati, ma anche la maturazione sessuale e il periodo riproduttivo. Si tratta comunque di risposte fisiologiche che derivano non solo da segnali proposti da altri organi, ma anche da informazioni che derivano dall'ambiente esterno. L'esposizione, ad esempio, a fattori stressanti può influire negativamente sul benessere animale e sul suo metabolismo, così come l'eccessiva presenza di inquinanti ambientali può disturbare il corretto funzionamento dell'asse endocrino. Ogni risposta biologica agisce parallelamente al fenomeno dell'omeostasi, scatenando quindi una serie di meccanismi con lo scopo di equilibrare l'organismo interno con l'ambiente in cui esso si trova. E' un sistema piuttosto complesso che si avvale del principio del feedback: ogni cellula target invia segnali positivi o negativi, a seconda della situazione, a cellule regolatrici che possono intervenire nella produzioni di ormoni, variandone la secrezione.

2.1 Ipotalamo

L'ipotalamo è una struttura del sistema nervoso centrale che si trova nel diencefalo, tra mesencefalo ed emisferi cerebrali. Ad esso giungono informazioni sensitive di tipo olfattivo, gustativo, visivo e viscerali, che

vengono poi tradotte nella secrezione di neuro-ormoni indirizzati all'ipofisi. Le due ghiandole sono collegate tra loro grazie ad una serie di neuroni che costituiscono il fascio ipotalamo-neuroipofisario, ovvero l'asse ipotalamo-ipofisi vero e proprio. Esse comunicano tra loro attraverso la produzione di Releasing e Inhibiting factors: i primi stimolano la secrezione di ormoni da parte dell'adenoipofisi, i secondi invece la inibiscono.

2.2 Ipofisi

Si trova alla base dell'encefalo ed è il centro coordinatore della maggior parte delle funzioni ormonali dell'organismo. Gli ormoni che produce vengono riversati nel sangue in modo da raggiungere le cellule target.

L'ipofisi è suddivisa in un lobo anteriore, l'adenoipofisi, caratterizzata da una struttura epiteliale molto vascolarizzata, ed un lobo posteriore, la neuroipofisi, costituito da tessuto nervoso.

2.2.1 Adenoipofisi

E' responsabile della produzione di diversi ormoni che vedono come target sia tessuti endocrini che tessuti non endocrini.

- GH, ormone somatotropo: agisce su fegato, tessuto osseo e muscolare stimolando la crescita corporea e la sintesi proteica.
- PRL, prolattina: agisce sulla ghiandola mammaria stimolando lo sviluppo e la secrezione di latte.
- TSH, ormone tireotropo: agisce sulla tiroide stimolandone la secrezione di ormoni tiroidei.
- ACTH, ormone adenocortitropo: agisce sulla ghiandola surrenale stimolandone la produzione di corticosteroidi.
- LH, ormone luteinizzante: agisce sulle cellule interstiziali dell'ovario e del testicolo stimolando nella femmina l'ovulazione

e la formazione del corpo luteo; nel maschio la secrezione di androgeni dalle cellule del Leydig del testicolo.

- FSH, ormone follicolostimolante: agisce sui follicoli ovarici e sui tubuli seminiferi stimolando nell'ovario lo sviluppo dei follicoli e la secrezione di estrogeni; nel testicolo la spermatogenesi.

2.2.2 Neuroipofisi

E' responsabile della produzione di due ormoni:

- ADH, vasopressina: interviene nella regolazione dell'equilibrio idro-salino, della pressione osmotica e dei liquidi dell'organismo. Agisce a livello renale, dove interviene promuovendo il riassorbimento di acqua dal liquido intratubulare. Le sue cellule target sono quelle epiteliali del tubo distale e del dotto collettore dei nefroni.
- Ossitocina: interviene nella gravidanza inducendo le contrazioni dell'utero durante la fase di espulsione del feto e stimola l'eiezione del latte durante l'allattamento.

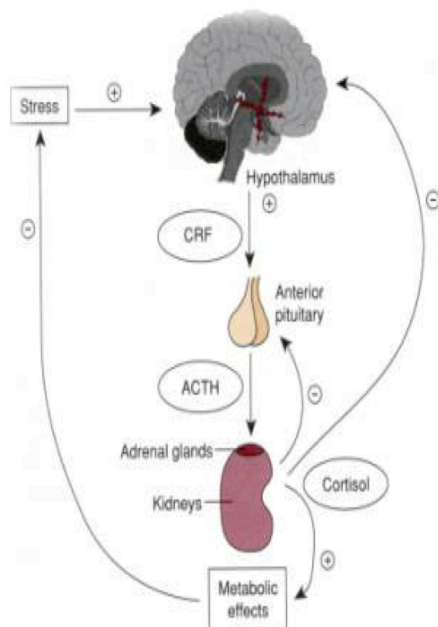
Il sistema endocrino si avvale di tre principali assi, che sono:

- HPG (asse ipotalamo – ghiandola pituitaria - gonade)
- HPA (asse ipotalamo – ghiandola pituitaria - ghiandole surrenali)
- HPT (asse ipotalamo – ghiandola pituitaria – tiroide)

2.3 Asse HPA

Le ghiandole surrenali si possono suddividere, a livello endocrino, in due importanti porzioni:

- Corteccia surrenale, che è la parte più esterna. Essa produce ormoni steroidei tra cui glucocorticoidi come il cortisolo, che è fondamentale nel momento stressante poiché interviene nel mantenimento di un costante livello di glucosio nel sangue.



La sua secrezione è stimolata dalla produzione di ACTH da parte dell'ipofisi anteriore.

- Zona midollare, che è la parte interna, che produce principalmente adrenalina, noradrenalina e dopamina.

Fig. 18: asse HPA

2.4 Asse HPG

Oltre alla funzione gametogena, le gonadi sono responsabili anche di una funzione endocrina, che avviene tramite la secrezione di ormoni steroidei, i quali sono fondamentali per lo sviluppo e per la funzionalità dell'apparato riproduttivo stesso. Gli ormoni sessuali sono inoltre necessari per la comparsa dei caratteri sessuali secondari, ovvero quei tratti che differenziano gli individui di sesso maschile da quelli femminili. L'attività delle gonadi si trova sotto stretto controllo dell'adenoipofisi attraverso la produzione di gonadotropine come l'ormone follicolostimolante, o FSH, e l'ormone

luteinizzante, o LH, la cui secrezione dipende dai centri ipotalamici con la liberazione di GnRH.

Per quanto riguarda l'organismo femminile, l'FSH aumenta nella sua concentrazione plasmatica durante la fase follicolare, poiché stimola lo sviluppo dei follicoli ovarici agendo a livello delle cellule della teca interna e della granulosa.

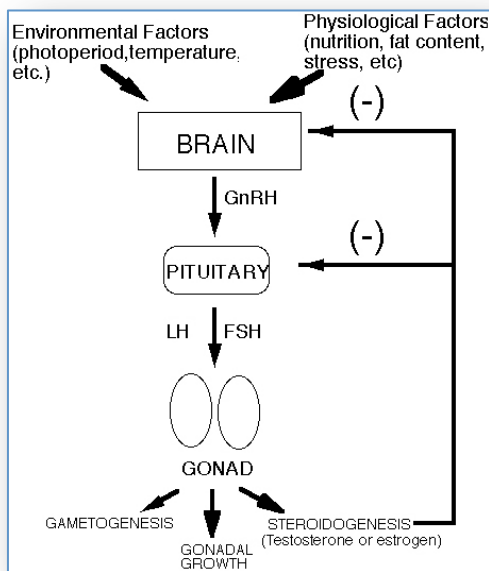


Fig.19: asse HPG

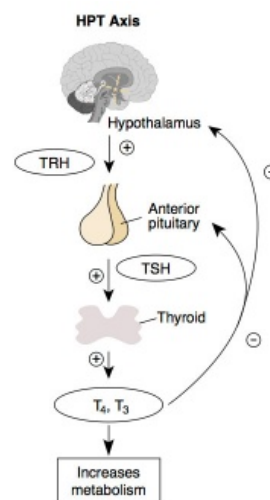
L'LH stimola invece la sintesi di androgeni, che vengono poi convertiti in estrogeni dalle cellule della granulosa.

Per quanto riguarda l'organismo maschile, invece, l'FSH stimola la produzione di estrogeni, ABP e inibina da parte delle cellule del Sertoli, mentre l'LH interviene nella secrezione di testosterone e quindi nella maturazione degli spermatozoi.

2.5 Asse HPT

2.5.1 Tiroide

La tiroide è una ghiandola endocrina situata a livello del collo, che avvolge anteriormente la trachea. E' formata da due lobi uniti tra loro da una porzione di tessuto chiamato istmo. Internamente è costituita da un elevato numero di cavità dette follicoli, composte da un epitelio monostratificato, che le avvolge esternamente, e una sostanza viscosa all'interno chiamata colloide. Tra i vari follicoli sono inoltre presenti numerosi capillari sanguigni fenestrati. Istologicamente si tratta di una struttura molto variabile a seconda dello stato funzionale della ghiandola: quando la ghiandola è in attività, lo spazio occupato dalla colloide risulta essere molto ridotto, mentre le cellule follicolari assumono forma cilindrica e la membrana laminare è ricca di microvilli. Quando la ghiandola si trova in stato di inattività, le cellule follicolari sono invece appiattite, mentre i follicoli sono ampi e contengono grandi quantità di colloide. All'interno delle cellule follicolari avviene la sintesi di tiroglobulina, a partire dall'amminoacido tirosina immagazzinato nell'apparato del Golgi. In seguito alla diffusione di molecole di iodio nel lume follicolare, avviene la produzione degli ormoni tiroidei T_3 e T_4 , che vengono poi immessi nel circolo sanguigno. Tra i follicoli tiroidei sono interposte le cellule C, o cellule parafollicolari, che sono responsabili della secrezione di calcitonina, un ormone peptidico ipocalcemizzante. Essa riduce il livello della calcemia e della fosfemia agendo sul tessuto osseo inibendo il riassorbimento della matrice ossea a carico degli osteoclasti. Inoltre favorisce l'escrezione degli ioni Ca^{2+} a livello renale.



2.5.2 Sintesi degli ormoni tiroidei

La sintesi degli ormoni tiroidei prevede più tappe:

1. Assunzione di iodio dal circolo sanguigno
2. Ossidazione dello ione ioduro a iodio molecolare (I_2)
3. Legame tra iodio molecolare e amminoacido tirosina
4. Sintesi di T_3 e T_4 .

Le molecole di iodio si trovano nel sangue sotto forma di ione ioduro (I^-): esse vengono trasportate a livello della membrana basale delle cellule follicolari grazie alla presenza di un meccanismo di trasporto attivo (pompa dello iodio), contro gradiente. Queste vengono poi ossidate a iodio molecolare ad opera di perossidasi e diffondono nel lume follicolare. Si legano quindi con la tireoglobulina, immagazzinata in vescicole a livello dell'apparato del Golgi, con una reazione di iodazione catalizzata dall'enzima iodasi, portando alla formazione di MIT (Monoiodotironina) e di DIT (Diiodotironina). Di conseguenza si verificano le reazioni di accoppiamento tra due molecole di DIT, con produzione di T_4 , e tra una molecola di DIT e una di MIT, con produzione di T_3 . Questi, una volta sintetizzati, vengono accumulati nel lume follicolare, legati alla tireoglobulina, in attesa dell'utilizzo.

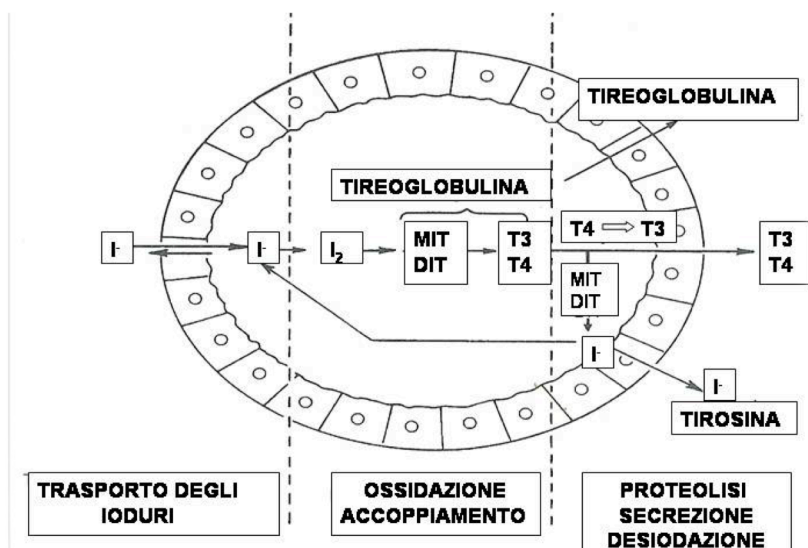


Fig.20: sintesi degli ormoni tiroidei

La Tiroxina (T_4) è un ormone non metabolicamente attivo: per svolgere la sua azione deve prima essere convertito, da enzimi deiodinasi localizzati a livello del fegato, in T_3 . Si ritiene quindi che la T_4 rappresenti una riserva di ormone T_3 , inoltre viene prodotta in quantità molto maggiori rispetto a quest'ultimo (il rapporto nella colloide è di circa 18:1).

2.5.3 Funzione degli ormoni tiroidei

Gli ormoni tiroidei svolgono diverse funzioni che possono essere suddivise in azioni metaboliche e sullo sviluppo somatico.

Azioni metaboliche:

- Azione calorigena: avviene prevalentemente a livello di fegato e muscoli scheletrici e consiste nell'aumento del metabolismo cellulare per produrre calore. Questo avviene incrementando il consumo di ossigeno ed il metabolismo ossidativo. In questo caso gli ormoni tiroidei operano in stretto contatto con le catecolammine: mentre queste ultime agiscono rapidamente stimolando il metabolismo ossidativo, gli ormoni tiroidei favoriscono la sintesi della Na^+/K^+ - ATPasi, portando ad un maggior consumo di ATP e di conseguenza ad un maggior sviluppo di calore.
- Metabolismo dei carboidrati: stimolano l'assorbimento a livello intestinale di glucosio e la glicogenolisi.
- Metabolismo lipidico: favoriscono l'utilizzo metabolico di lipidi e la diminuzione della lipemia. Intervengono inoltre nella rimozione del colesterolo dal sangue, poiché stimolano la sintesi di recettori di membrana per le lipoproteine plasmatiche a bassa densità (LDL).

- Metabolismo proteico: stimolano l'assorbimento di amminoacidi e la sintesi proteica.

Azioni per lo sviluppo somatico

- Induzione della crescita: permettono il rilascio dell'ormone della crescita (GH) e stimolano la funzionalità delle sue cellule target. Possono inoltre stimolare la produzione di IGF (insulin-like growth factor) favorendo ulteriormente l'azione del GH sulle sue cellule bersaglio.
- Sviluppo del sistema nervoso
- Riproduzione: intervengono nello sviluppo e sulla funzionalità delle gonadi tramite la secrezione di gonadotropine (GTH) dall'ipotalamo.

2.5.4 L'asse HPT e *Tursiops truncatus*: letteratura

Tursiops truncatus è una delle specie più comuni all'interno di acquari e parchi marini, trovandosi quindi in situazioni di cattività. Il continuo contatto con l'uomo e l'ambiente in cui si trova, permette di ottenere facilmente campioni di sangue e di ripetere il prelievo periodicamente. Di conseguenza può servire come specie modello per l'analisi delle variazioni delle concentrazioni di ormoni tiroidei lungo l'arco di vita e quindi anche durante i periodi riproduttivi e la gravidanza.

Sono stati condotti numerosi studi per valutare le possibili differenze tra esemplari wild e semidomesticated: St. Aubin et al, nel 1996, propone uno studio di comparazione tra queste due condizioni e la possibile relazione tra età e sesso, per quanto riguarda tT4, fT4, tT3 e FT3.

Hormone	Sex	Wild (at capture)			Semidomesticated			Significance
		<i>n</i>	$\bar{x} \pm SD$	Range	<i>n</i>	$\bar{x} \pm SD$	Range	
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	female	18	2.7 ± 0.6	1.7–4.1	18	1.8 ± 0.7	0.5–3.1	<0.01
	both	36	2.6 ± 0.8	1.2–4.1	36	1.9 ± 0.8	0.5–4.0	<0.01
Aldosterone (pg/mL)	female	18	108 ± 72	3–277	18	19 ± 22	3–78	<0.001
	male	18	124 ± 102	3–408	18	37 ± 47	3–188	<0.01
	both	36	116 ± 89	3–408	36	28 ± 38	3–188	<0.001
	both	36	16.2 ± 3.5	10.1–24.2	18	13.5 ± 2.4	8.5–18.5	<0.05
tT4 ($\mu\text{g/dL}$)	both	36	14.3 ± 4.5	8.6–24.2	36	12.8 ± 2.0	8.5–18.5	<0.05
fT3 (pg/mL)	both	36	1.38 ± 0.35	0.79–2.33	36	1.20 ± 0.38	0.59–2.28	<0.05
rT3 (ng/mL)	both	36	1.58 ± 0.51	0.67–2.92	36	2.02 ± 0.55	0.77–3.52	<0.001

Tabella 1: comparazione di ormoni tra esemplari wild e in ambiente controllato

Le femmine wild mostrano valori maggiori per quanto riguarda tT4, fT4 e fT3, che può essere giustificato dallo stato riproduttivo o dal periodo di allattamento. Al contrario, le femmine in ambiente controllato presentano livelli maggiori di tT3. Da queste analisi risulta inoltre evidente anche un pattern di concentrazione che segue l'età degli individui: infatti la produzione di ormoni tiroidei sembra essere inversamente proporzionale all'età degli esemplari. In più anche il sesso ha un'importante influenza, poichè i valori di TH risultano sempre maggiori nelle femmine piuttosto che nei maschi, anche se ciò può dipendere dal momento riproduttivo in cui le analisi sono state condotte.

Fair et al., nel 2011 ha condotto una serie di studi per quanto riguarda le popolazioni wild di Charleston, SC (CHS) and the Indian River Lagoon, FL (IRL). Lo scopo era quello di individuare le possibili relazioni tra le concentrazioni di TH sanguigne e età, sesso, stato riproduttivo, distribuzione geografica e temperatura dell'acqua del loro habitat.

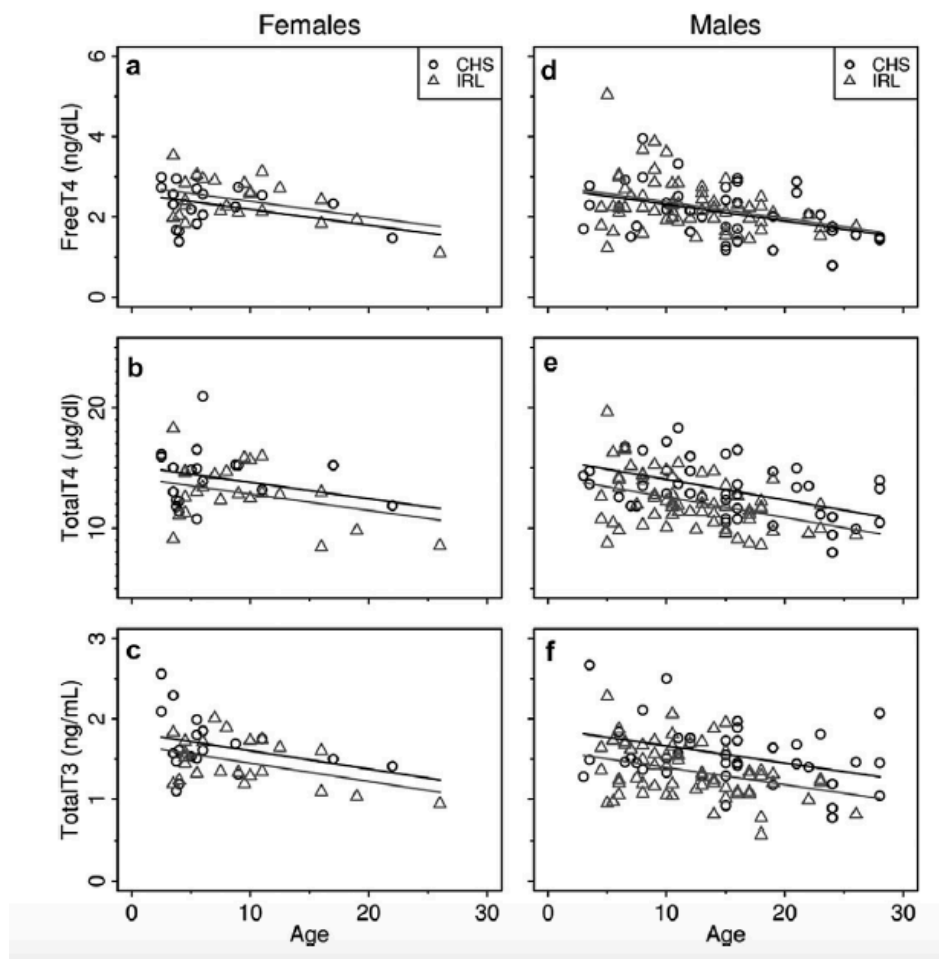


Tabella 2: Livelli di ormoni tiroidei in funzione dell'età in tursiopi provenienti da Charleston, SC (CHS) e dell'Indian River Lagoon, FL (IRL) (Fair et al., 2011).

Le analisi condotte mostrano una relazione, come precedentemente riportato da St. Aubin et al, tra la concentrazione di TH e l'età, i quali risultano essere inversamente proporzionali. Questo perchè si tratta di ormoni che intervengono nello sviluppo e nella maturazione sessuale degli individui. Anche il sesso e la distribuzione geografica risultano essere correlati ad essi, come anche la temperatura dell'acqua: si riscontrano infatti valori maggiori quando queste ultime sono minori, il che può essere giustificato dal fatto che gli ormoni tiroidei intervengono anche nei meccanismi necessari alla produzione di calore.

Vengono poi riportati i livelli riscontrati sia nell'uomo che in altri mammiferi, sia marini che terrestri:

Species	Total T ₃ (ng/ml)	Total T ₄ (ng/ml)	Free T ₄ (pg/ml)	Source
Mouse	0.8–1.2	30–80	–	Evan [14]
Rat	0.3–1.2	40–70	2.5–50	Evan [14]
Dog	0.4–1.6	15–40	6–30	Evan [14]
Dairy cow	1.6 ± 0.2	50 ± 2	NR	Bitman et al. [1]
Asian elephant	1.1 ± 0.5	86.8 ± 6.5	7.2 ± 0.9	Brown et al. [4]
African elephant	1.1 ± 0.5	100.4 ± 0.7	7.6 ± 0.6	
Human				
Adult	0.6–2.3	40–115	28–48	Daniels [7]
Child		64 – 133		
<i>Marine mammals</i>				
<i>Bottlenose dolphin</i>				
Adult	0.6–2.5	77–180	8–36	This study
Juvenile	1.0–2.7	88–209	14–50	
<i>Bottlenose dolphin</i>				St. Aubin et al. [57]
Semi-domesticated males	1.24 (1.0–1.65)	124 (85–183)	NR	
Semi-domesticated females	1.49 (0.9–2.58)	135 (85–185)	NR	
Free-ranging males	NR	162 (101–242)	12.4 (7.3–21.4)	
Free-ranging females	NR	143 (86–242)	14.7 (10.6–20.0)	
Domestic & free-ranging	1.31 (0.8–2.58)	136 (85–242)	13.6 (8.5–24.4)	
<i>Beluga whale</i>				St. Aubin and Geraci [55]
Captive	1.0 ± 0.5	93 ± 27	NR	
Free-ranging	1.8 ± 1.1	194 ± 23	NR	
<i>Manatee</i>				Ortiz et al. [45]
Captive	1.9–2.8	19–45	5–11	
Free-ranging	1.4–1.6	45–83	13–16	
<i>Harbor seal</i>				
Captive	0.5 ± 0.1	29 ± 1	16 ± 1	Renouf and Brotea [48]
<i>Harbor seal</i>				
Summer	0.4 ± 0.1 SE	5.2 ± 4.1SE	1.9 ± 0.9 SE	Oki and Atkinson [42]
Winter	0.6 ± 0.1 SE	8.5 ± 4.2 SE	1.9 ± 0.9 SE	
<i>Steller sea lion</i>				Myers et al. [39]
Free-ranging pups	0.6 (nd-1.4)	20.7 (nd-58.5)	4.2 (nd-13.4)	
Free-ranging juveniles	0.6 (nd-1.3)	17.3 (nd-44.3)	3.6 (nd-7.2)	
Free-ranging adult	0.4 (nd-0.7)	15.4 (2.2–29.6)	3.1 (nd-7.6)	
Captive juveniles	0.6 (nd-1.1)	7.0 (nd-16.5)	2.4 (nd-7.9)	
Captive adult	0.5 (nd-0.9)	14.4 (1.51–34.6)	2.8 (nd-7.1)	

NR = not reported; nd = not detected; means ± S.D. or ranges are reported; SE where listed.

Tabella 3: Comparazione tra le concentrazioni di ormoni tiroidei in diverse specie di mammiferi (St. Aubin et al., 1996)

West et al., nel 2014, conduce uno studio simile su esemplari tenuti in cattività. Questa infatti, può essere responsabile di anomalie tiroidee (Harrison, 1969). Anche in questo caso si indaga la relazione tra TH e età, sesso e periodo riproduttivo. I risultati rispecchiano gli studi condotti precedentemente:

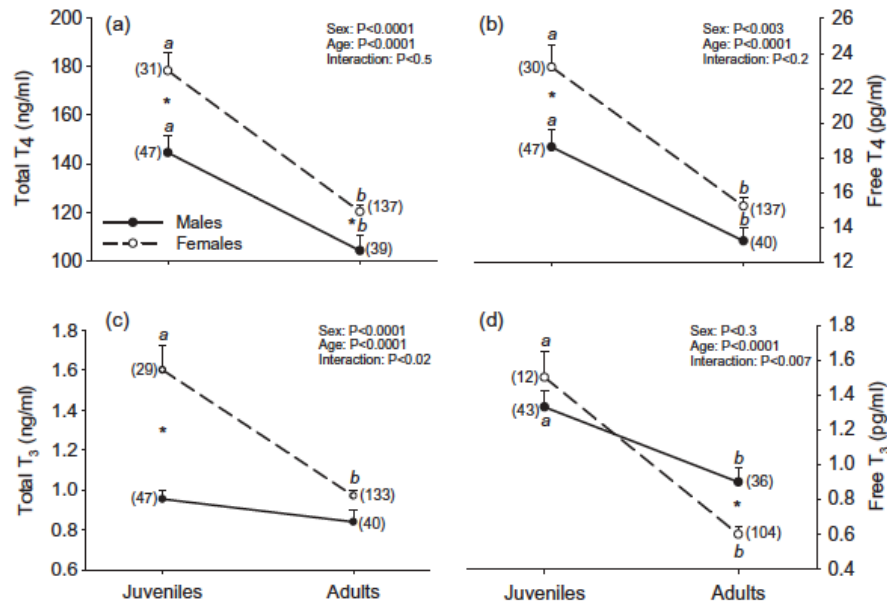


Tabella 4: Concentrazione plasmatica di ormoni tiroidei in esemplari di tursiope a seconda del genere e dell'età (West et al., 2014)

Vista l'influenza del sesso nelle concentrazioni sanguigne degli ormoni tiroidei, Brian et al., nel 2012, ha condotto uno studio su esemplari di *Tursiops aduncus* indo-pacifici. Prendendo in esame il ciclo estrale, ha evidenziato che durante la fase follicolare il volume della tiroide è maggiore rispetto alla fase luteale, ipotizzando una possibile influenza sulle concentrazioni rilasciate operata dagli ormoni steroidei femminili, come estrogeni e progesterone.

L'ipertrofia del tessuto cellulare tiroideo e l'aumento del flusso sanguigno riscontrato, dipende dall'attività della ghiandola, che infatti durante il ciclo estrale rilascia una concentrazione maggiore di ormoni nella circolazione.

Di conseguenza, è interessante valutare come varia la produzione di ormoni tiroidei durante la gravidanza in *Tursiops truncatus*. Come evidenziato sia da Fair (2011) e West (2014), vengono secrete alte concentrazioni soprattutto durante il primo trimestre, mentre negli stadi successivi queste diminuiscono significativamente. Ciò dipende dal fatto che la tiroide del feto si sviluppa ed entra in attività a partire dalla 14[°] settimana di gestazione, per cui nel periodo precedente la madre deve assicurare al feto gli ormoni necessari al suo

sviluppo.

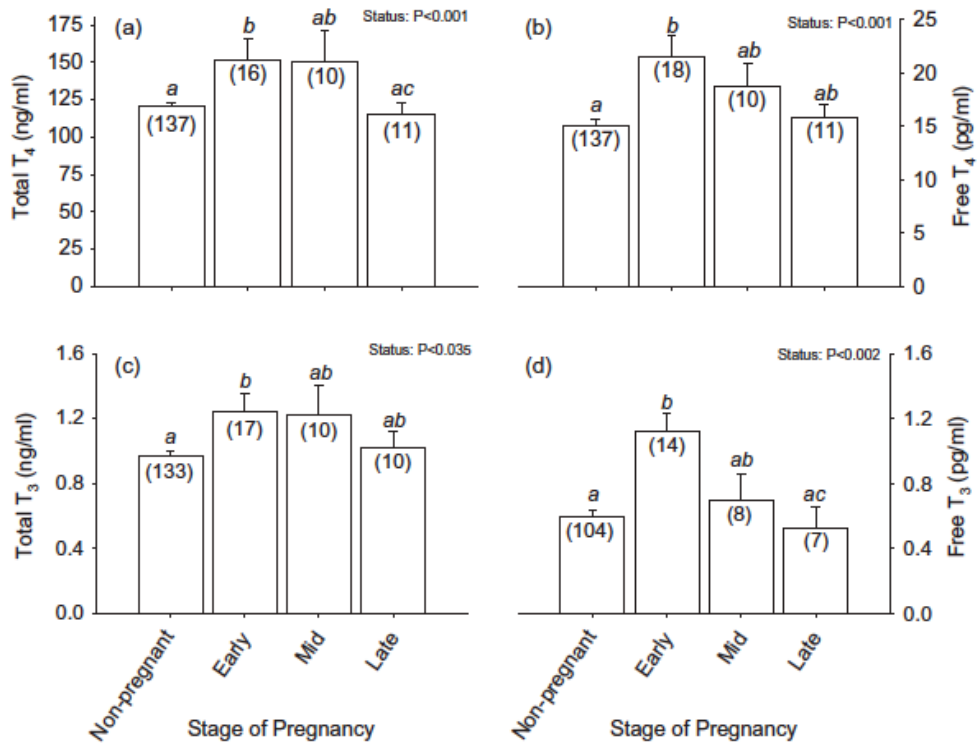


Tabella 5: Concentrazioni plasmatiche di ormoni tiroidei durante le varie fasi della gestazione di esemplari di tursiope (West et al., 2014)

Capitolo 2 - SCOPO DELLA TESI

La tesi si focalizza sulla valutazione del funzionamento dell'asse HPT (ipotalamo - ipofisi - tiroide). Questo viene effettuato tramite l'analisi sia dell'ormone TSH, prodotto dall'ipofisi e diretto alla ghiandola tiroidea attraverso la circolazione sanguigna, sia degli ormoni tiroidei T3 e T4. Essi sono stati analizzati lungo un periodo di tempo tra febbraio 2015 e febbraio 2016, in modo da fornire un quadro generale sul funzionamento e sui meccanismi adattativi che interessano questa ghiandola endocrina.

La valutazione della concentrazione sierica di TSH non è mai stata eseguita prima in esemplari di *Tursiops truncatus*, per cui il seguente progetto si pone anche come scopo quello di creare una baseline di riferimento per le analisi future. Per quanto riguarda i mammiferi marini, questo tipo di analisi sono state condotte solamente in individui di *Delphinapterus leucas*, campionati tra il 1996 e il 2001 ed analizzati negli anni seguenti (Villanger et al., 2011). In questo caso si voleva individuare come l'azione di endocrine disruptors potesse influenzare il sistema endocrino, in particolare quello tiroideo, portando a diversi squilibri come una ridotta capacità di termoregolazione e metabolizzazione.

Le problematiche legate alla quantificazione del TSH in specie "non convenzionali" derivano dal fatto che questo ormone è specie-specifico, e che al momento non esistono sistemi specifici per i cetacei in generale e per i tursiopi in particolare. Si è voluto quindi verificare se l'utilizzo di un sistema canino, che utilizza anticorpi policlonali, fosse effettivamente efficace per la quantificazione del TSH in cetacei, come riportato nel lavoro di Villanger et al. (2011).

Le presenti analisi sono quindi state effettuate su campioni di siero di tursiope tramite un kit per dosaggio immunometrico enzimatico a fase solida (ELISA), nel formato micropiastra, progettato per la misurazione quantitativa di TSH canino, in quanto quello per uso umano è risultato insoddisfacente su campioni di beluga.

La presente tesi ha quindi lo scopo finale di valutare l'efficacia di tale strumento per l'analisi del TSH anche in individui di *Tursiops truncatus*.

Si è poi voluta valutare la funzionalità tiroidea degli animali oggetto di studio utilizzando sistemi in chemiluminescenza ad uso umano, nonché individuare le eventuali correlazioni esistenti tra TSH, T3 e T4. L'uso di sistemi pensati per l'uomo nel caso degli ormoni tiroidei risulta efficace anche nei tursiopi, in ragione dell'elevata costanza degli ormoni stessi, in funzione della loro natura peptidica e non proteica.

Per tutti e tre i sistemi utilizzati si è anche provveduto ad effettuare una validazione del metodo, in modo da avere la certezza che le analisi hanno fornito una reale lettura degli ormoni ricercati e non di falsi positivi.

Capitolo 3 - MATERIALI E METODI

3.1 Esempolari

Per questo studio sono stati presi in considerazione otto esemplari di *Tursiops truncatus* mantenuti in ambiente controllato.

Individui	Sesso	Data di nascita	Origine
Ali	M	19/03/1993	Captive Born
Da	M	20/05/1999	Captive Born
Lot	F	1/08/1982	Wild Born
Mal	F	1/08/1985	Wild Born
Na	F	3/06/2010	Captive Born
Ne	M	23/12/2006	Captive Born
Roc	M	13/03/1997	Captive Born
Sha	F	1/08/1982	Wild Born

Tab. 6: Esempolari presi in esame

Gli esemplari sono stati suddivisi per sesso (4 maschi e 4 femmine) e per età, considerando come adulti gli individui maschili maggiori di 10 anni e i femminili maggiori di 7 anni.

3.2 Campionamento

Il campionamento è stato effettuato su otto diversi individui di *Tursiops truncatus* nel periodo tra febbraio 2015 e febbraio 2016. E' stato prelevato in maniera opportunistica un campione di sangue in coincidenza dei controlli veterinari. Il campione è stato poi sottoposto a centrifugazione per ottenere la separazione del siero, che è stato rimosso tramite una pipetta e trasferito in un contenitore apposito, opportunamente etichettato. Esso è stato conservato a -18°C fino all'analisi, avvenuta presso il laboratorio di ecotossicologia della

Facoltà di Acquacoltura e Igiene delle produzioni ittiche, situato a Cesenatico (FC).

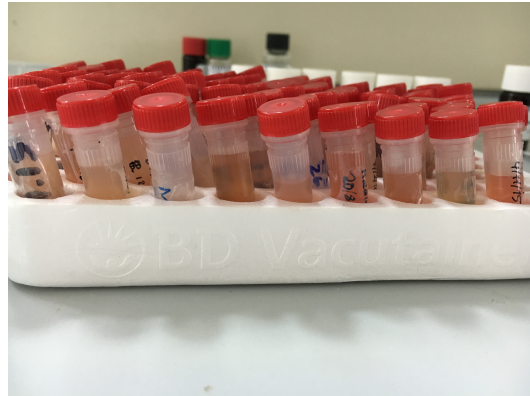


Fig. 21: Campioni analizzati

I campioni analizzati sono:

Ali	Da	Lot	Mal	Na	Ne	Roc	Sha
03/04/15	09/07/15	17/02/15	11/04/15	17/03/15	14/02/15	21/07/15	01/02/15
20/07/15	21/07/15	26/02/15	01/07/15	21/07/15	26/02/15	15/09/15	14/02/15
21/07/15	15/09/15	17/03/15	20/08/15	10/08/15	03/04/15	03/12/15	26/02/15
06/08/15	20/11/15	09/07/15	24/08/15	01/10/15	16/11/15	18/12/15	03/04/15
14/08/15	08/12/15	21/07/15	29/08/15	21/10/15	05/01/16	28/12/15	15/04/15
13/09/15		04/09/15	31/08/15	16/11/15		31/12/15	21/07/15
25/09/15		15/09/15	04/09/15	27/11/15		18/01/16	31/08/15
05/10/15		25/09/15	11/09/15	18/12/15		25/01/16	15/09/15
12/10/15		04/11/15	25/09/15	31/12/15		01/02/16	11/01/16
03/11/15						04/02/16	21/01/16
07/12/15						12/02/16	7/08/15
18/12/15						15/02/16	
31/12/15						08/08/16	
21/01/16							
01/02/16							
15/02/16							
Tot. 16	Tot. 5	Tot. 9	Tot. 9	Tot. 9	Tot. 5	Tot. 13	Tot. 11

Tab.7: Lista dei campioni presi in esame in ordine cronologico

3.3 Analisi

3.3.1 TSH

L'analisi del TSH è stata condotta tramite il kit "Thyroid Stimulating Hormone (TSH) Canine ELISA" (DRG). Si tratta di un kit di dosaggio immunometrico enzimatico a fase solida (ELISA) nel formato micropiastra, progettato per la misurazione quantitativa di TSH canino.

La micropiastra è rivestita di anticorpi monoclonali specifici per TSH canino.

I calibratori e i campioni vengono pipettati all'interno della micropiastra, a cui vengono aggiunti anticorpi marcati con perossidasi di rafano policlonali. Dopo un periodo di incubazione di 2 ore, si formano complessi sandwich costituiti dai due anticorpi e l'ormone TSH. I componenti non reattivi vengono eliminati tramite uno step di lavaggio.

In seguito viene aggiunto in ogni pozzetto un substrato cromogenico, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) e viene incubato il tutto per ulteriori 30 minuti. In questo modo, il substrato viene convertito in un prodotto di colore blu derivante dalla fissazione dell'enzima utilizzato. La reazione viene poi fermata grazie all'aggiunta di acido cloridrico come soluzione di arresto, che porta ad un viraggio della colorazione da blu a gialla. L'intensità di essa risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di TSH presente nel campione. La densità ottica della soluzione è misurata tramite un lettore di micropiastre a 450nm.

6.2 ASSAY PROCEDURE

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators (A through F) and samples in duplicates.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	S3	S..								
b	A	E	S3	S..								
c	B	F	S4									
d	B	F	S4									
e	C	S1	S5									
f	C	S1	S5									
g	D	S2	S6									
h	D	S2	S6									

2. Pipet **100 µl** of each **calibrator** and **sample** into the wells prepared.
3. Add **100 µl** of **Enzyme-Labeled Anti-Canine TSH antibody** to all wells.
4. Rotate for **2 hours** on a plate mixer (600 – 900 rpm).
5. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl buffered wash solution**. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
6. Add **200 µl** of **TMB/Substrate Solution** to all wells.
7. Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
8. Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
9. Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.

The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time.

Fig. 22: Procedura per l'analisi del TSH

Per il kit utilizzato si è anche valutata la riproducibilità del metodo e la sua specificità, effettuando analisi ripetute di 4 campioni nello stesso giorno (intra-assay reproducibility) e su tre giorni diversi (inter-assay reproducibility) e valutando anche il parallelismo della curva.

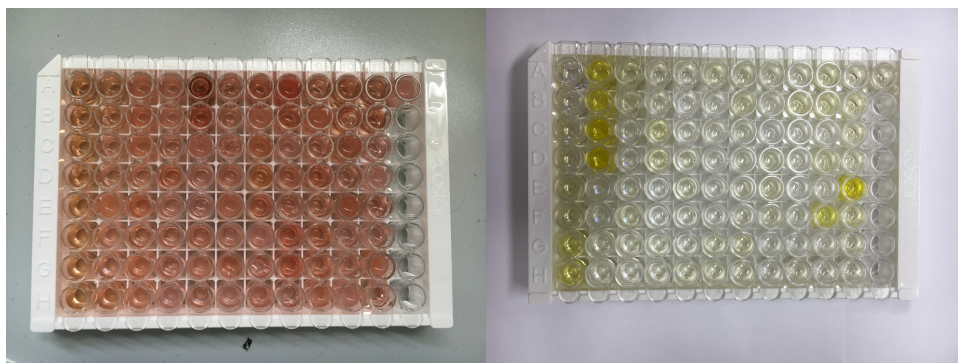


Fig. 23: Micropiastra subito dopo l'aggiunta di anticorpi marcati con perossidasi di rafano policlonali.

Fig. 24: Micropiastra dopo l'aggiunta della soluzione di arresto.

Per quanto riguarda la riproducibilità, il coefficiente di variabilità (CV) per il test intra-assay si è dimostrato pari al 5.32% sulla media dei 4 campioni analizzati,

mentre per quella inter-assay il CV è risultato pari al 6.4%. Tali CV dimostrano un'ottima riproducibilità del metodo.

Per determinare il parallelismo tra standard e TSH endogeno, il campione a più alto tenore di TSH è stato diluito in maniera seriale con il buffer fornito dal kit, per ottenere concentrazioni comparabili a quelle degli standards, che sono poi stati letti col kit. Per determinare il grado di parallelismo tra le due curve ottenute, si è applicata un'analisi di regressione. I risultati di questa analisi hanno dimostrato un buon parallelismo, dimostrando l'affidabilità del metodo.

3.3.2 Ormoni tiroidei

L'analisi degli ormoni tiroidei T3 e T4 è stata condotta tramite il metodo CLIA. Si tratta di un saggio a chemiluminescenza, basato sull'utilizzo di marcatori chemiluminescenti, i quali producono luce quando eccitati da energia chimica.

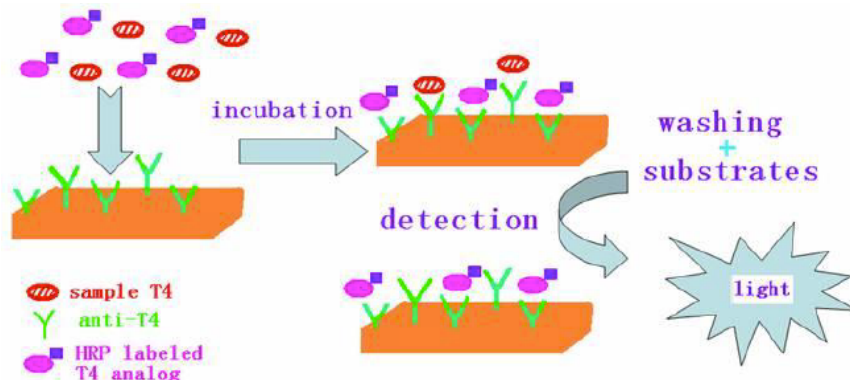


Fig.25: Principi di base del metodo Clia

Il metodo si basa sul mix tra anticorpi immobilizzati, il complesso enzima-antigene e il campione contenente gli antigeni naturali. Da essi si ottiene una reazione di competizione tra il complesso enzima-antigene e l'antigene del campione per un numero limitato di siti di legame. Dopo un periodo di incubazione, la frazione contenente l'antigene legato viene rimossa da quella non legata tramite lavaggio. L'attività dell'enzima, determinata dalla reazione con un substrato che genera luce, è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene presente originariamente nel campione.

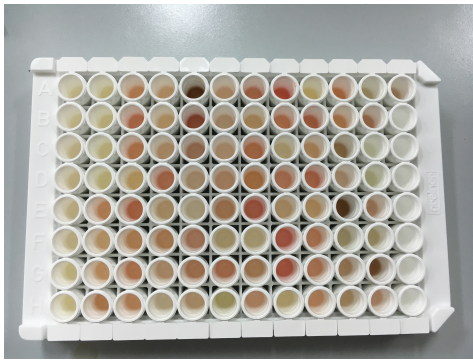


Fig. 26: Micropiastra contenente i campioni da analizzare.

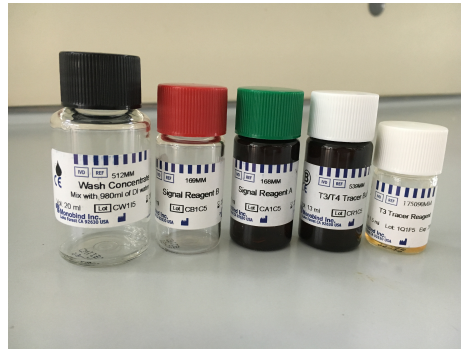


Fig. 27: Reagenti e soluzioni utilizzate.

Anche per questi kit si è proceduto a validare il sistema, ottenendo un ottimo parallelismo per le curve di T3 e T4 e CV intra- ed inter-assay pari a 5.13% e 6.8% per il T3 e 5.36% e 3.26% per il T4. Anche in questo caso l'affidabilità del metodo nei confronti degli ormoni tiroidei di tursiope è stata quindi verificata.

3.4 Analisi statistica

Ai fini dell'analisi dei dati si è innanzitutto valutata la normalità della distribuzione degli stessi utilizzando il test Shapiro-Wilk. Tale analisi ha evidenziato una distribuzione normale solo per i valori di T3, mentre TSH e T4 seguono una distribuzione non normale. Conseguentemente, le valutazioni statistiche relative alle concentrazioni di T3 sono state effettuate con test parametrici, ed in particolare si sono effettuate comparazioni tra sessi con il test t di Student, e tra individui con un'analisi della varianza (ANOVA). Per TSH e T4 sono state effettuate le medesime comparazioni utilizzando rispettivamente i test non parametrici Mann-Whitney U e Kruskal Wallis. Si è inoltre valutata la presenza di dati outliers, cioè valori molto diversi rispetto alla media. Quando presenti, essi sono stati eliminati dal database e la statistica è stata ripetuta. Va sottolineato che solo nel caso del T4 l'eliminazione degli outliers, per altro tutti appartenenti ad un unico esemplare, ha modificato il risultato statistico, portando alla scomparsa delle differenze rilevate.

Infine si è effettuata una valutazione delle correlazioni esistenti tra i vari ormoni considerati, anche nell'ottica delle relazioni metaboliche e dei sistemi di feedback esistenti. Tali correlazioni sono state valutate sia con test non parametrici (Spearman Rank Order) che con sistemi parametrici, in considerazione delle diverse distribuzioni (normali e non normali) osservate. Le analisi statistiche sono state effettuate con il programma STATISTICA 8.0 (StatSoft Italia S.r.l.) e per tutti i tests statistici il livello di significatività è stato settato a $p < 0.05$.

Capitolo 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati analitici ottenuti per i tre ormoni considerati sono riportati, come media \pm d.s., in tabella 8, suddivisi per media totale, genere e singolo individuo.

	T3 (ng/ml)	T4 (μ g/dl)	TSH (ng/ml)
Media generale	1,117 \pm 0,337	10,806 \pm 16,933	0,2733 \pm 0,3543
Maschi	1,0149 \pm 0,355	12,165 \pm 23,783	0,308 \pm 0,480
Femmine	1,222 \pm 0,284	9,411 \pm 2,011	0,237 \pm 0,136
Ali*	0,151 \pm 0,151	6,641 \pm 2,352	0,231 \pm 0,242
Da	0,229 \pm 0,229	9,366 \pm 2,012	0,252 \pm 0,132
Lot	0,233 \pm 0,233	10,359 \pm 1,161	0,169 \pm 0,079
Mal	0,234 \pm 0,234	8,937 \pm 3,328	0,300 \pm 0,185
Na	0,254 \pm 0,254	9,332 \pm 1,451	0,204 \pm 0,114
Ne	0,292 \pm 0,292	8,952 \pm 0,511	0,318 \pm 0,182
Roc	0,196 \pm 0,196	9,776 \pm 1,949	0,208 \pm 0,147
Sha	0,274 \pm 0,274	9,089 \pm 1,486	0,268 \pm 0,126

Tabella 8: Dati analitici ottenuti

*Le medie sono riportate senza gli outliers

4.1 Metodo per l'analisi del TSH

A seguito dell'analisi con sistema ELISA per TSH canino tutti i campioni di tursiope hanno presentato concentrazioni superiori al limite di rilevabilità della metodica, pari a 0.01 ng/ml. Questo evidenzia una buona specificità del sistema per il dosaggio del TSH sierico nel tursiope, dimostrandosi quindi idoneo per la quantificazione dell'ormone in questa specie. Infatti si è evidenziato un buon parallelismo tra la diluizione del campione di tursiope a concentrazione nota e la curva di calibrazione. Il sistema analitico utilizzato si

è quindi dimostrato un'ottima opzione per la valutazione della concentrazione di tale ormone nel siero di *Tursiops truncatus*, nonostante il kit utilizzato sia specifico per TSH canino. Si tratta quindi di una scoperta che consente di fare un passo avanti nella ricerca e nello studio di questi mammiferi marini.

Il presente studio ha infatti permesso di individuare i valori corrispondenti alla concentrazione sanguigna di TSH nel periodo tra febbraio 2015 e febbraio 2016 di 8 individui. In questo modo, questa tesi si pone come il primo step per la creazione di una baseline di riferimento per analisi future. Questo significa che i valori riscontrati non possono essere attualmente paragonati alla letteratura precedente, poiché non esistente per questa specie, ma si pongono come primo riferimento per lo studio dell'azione del TSH sulla ghiandola tiroidea in esemplari di tursiope in ambiente controllato.

L'unico studio effettuato precedentemente sull'attività del TSH in mammiferi marini risale al 2011, ma in questo caso l'oggetto di studio erano 12 esemplari di *Delphinapterus leucas*, catturati vivi lungo le coste delle Isole Svalbard in Norvegia (Villanger et al., 2011). I valori osservati in questa specie, pur non discostandosi eccessivamente da quanto da noi rilevato, risultano più bassi rispetto ai tursiopi. Tale differenza è legata presumibilmente non solo alla diversa specie, ma anche alle diverse condizioni ambientali (temperatura dell'acqua, latitudine, periodo dell'anno) che possono aver influito sulla funzionalità tiroidea.

4.2 TSH e ormoni tiroidei

I valori di TSH riscontrati rispecchiano e sottolineano la loro attività biologica: il TSH viene infatti prodotto a livello ipofisario per stimolare la ghiandola tiroidea a produrre T3 e T4, la cui concentrazione sanguigna innesca un meccanismo di feedback per cui può stimolare o inibire l'ulteriore produzione di TSH.

Questo significa che a concentrazioni maggiori di TSH, corrispondono concentrazioni minori di T3 e T4, e viceversa.

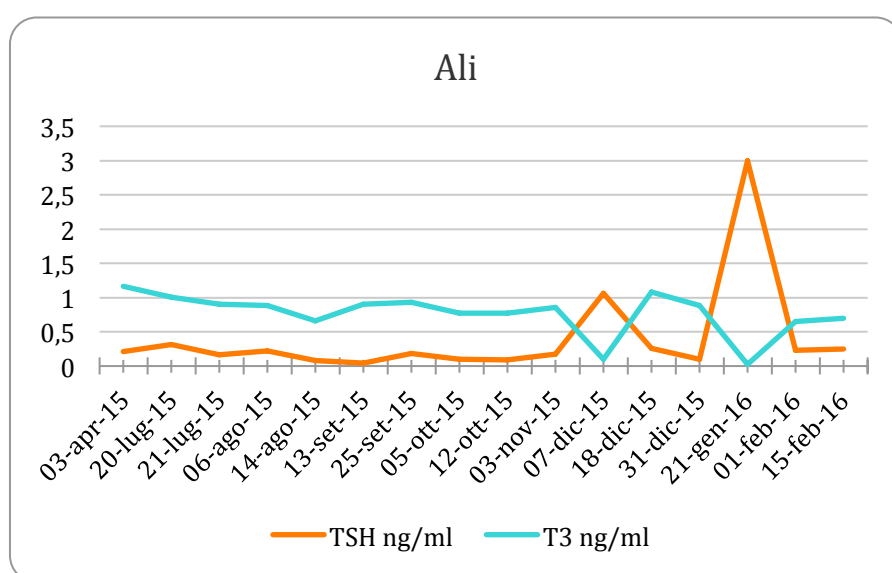


Grafico 1: valori ottenuti di TSH e T3 di Ali. Le due curve rispecchiano l'attività biologica dei due ormoni considerati

Il meccanismo di feedback positivo/negativo tra ormoni tiroidei e TSH è evidenziato dall'analisi statistica: infatti, esiste una correlazione positiva tra T3 e TSH e tra T3 e T4, confermando quindi la relazione metabolica esistente tra tali ormoni.

Tuttavia, le differenze riscontrate tra individui per la produzione di TSH non risultano essere statisticamente significative ($p=0,636956$).

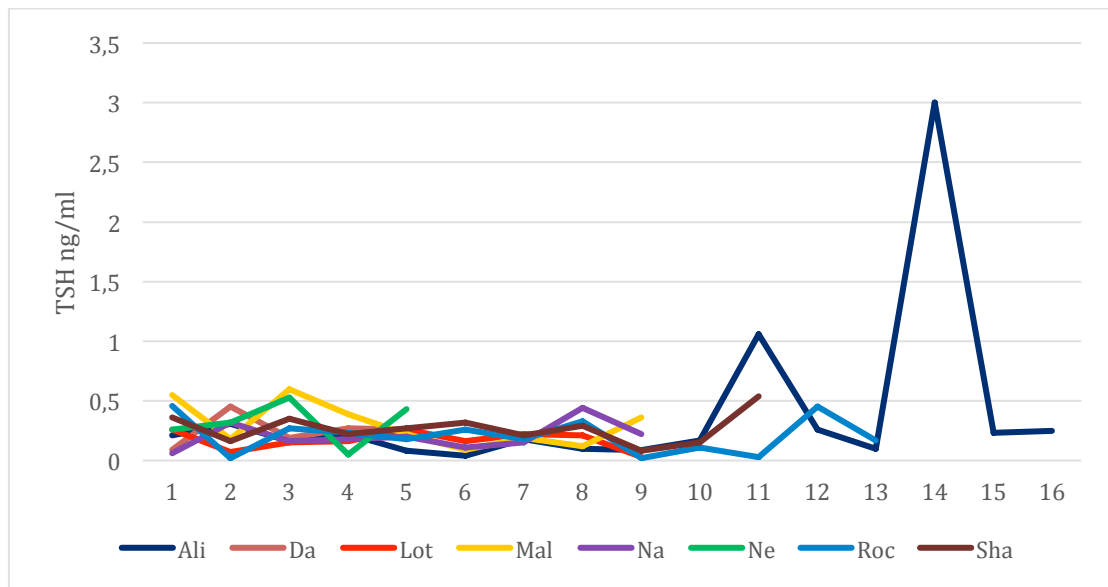


Grafico 2: andamento delle concentrazioni di TSH in ng/ml ottenuti per tutti gli individui considerati.

Per quanto riguarda i valori di T3 e T4 rilevati, anche in questo caso la letteratura risulta essere scarsa. Gli studi precedenti, che prendono in considerazione la concentrazione plasmatica di tali ormoni in esemplari di tursiope, mantenuti in ambiente controllato, riportano range di valori piuttosto simili a quelli riscontrati nel presente studio.

Fair et al. (2011) indicano come range di concentrazioni plasmatiche 0.6 - 2.5 ng/ml per quanto riguarda il T3, e 77 - 180 ng/ml per il T4.

St. Aubin et al. (1996) riportano range molto simili di 0.77 - 3.52 ng/ml per il T3 e 8.5 - 18.5 µg/dl per il T4.

Le medie ottenute dal presente studio indicano per il T3 valori di $1,117 \pm 0,337$ ng/ml e per il T4 $10,806 \pm 16,933$ µg/dl. Tuttavia, essi comprendono anche quelli appartenenti ad Ali, il quale presenta concentrazioni sieriche che si differenziano significativamente da tutti gli altri individui. Tali outliers corrispondono a picchi di produzione di T4, che si riflettono nei livelli più bassi di TSH, e a minimi di T3, a cui corrisponde però una maggiore produzione di TSH.

In generale, i valori di T3 e T4 ottenuti risultano costanti nel tempo, probabilmente perché gli individui sono mantenuti in ambiente controllato, con alimentazione e apporto calorico costante, che comporta sbalzi limitati nelle

richieste energetiche per il mantenimento della temperatura e dell'efficienza metabolica. Questa considerazione è rafforzata anche dal fatto che per la quasi totalità dei campioni considerati il rapporto T3/T4, considerato come indice della funzionalità tiroidea e misura dell'azione degli ormoni sui tessuti (un suo aumento viene quindi considerato come indicativo di attivazione metabolica), rimane costante intorno a valori di 0,11 (Fair et al., 2011). Va anche sottolineato che nessuno degli esemplari si ritrovava in particolari condizioni fisiologiche quali gravidanza o allattamento, che sono noti per modificare in maniera significativa i livelli di ormoni tiroidei (St. Aubin et al., 1996; Fair et al., 2011). Ali rappresenta tuttavia un'eccezione, che ha necessità di ulteriori studi e chiarimenti. Le differenze nei livelli ormonali risultano essere significative rispetto a tutti gli altri individui, sia per il T3 ($p=0,000001$), che per il T4 ($p=0,001558$).

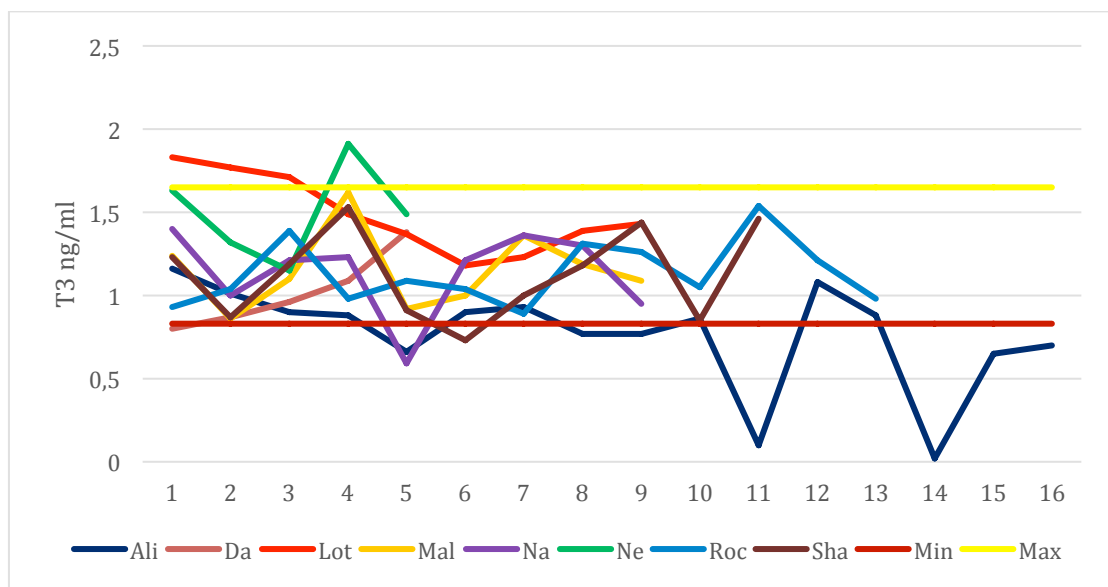


Grafico 3: andamento delle concentrazioni di T3 in ng/ml ottenuti per tutti gli individui considerati.

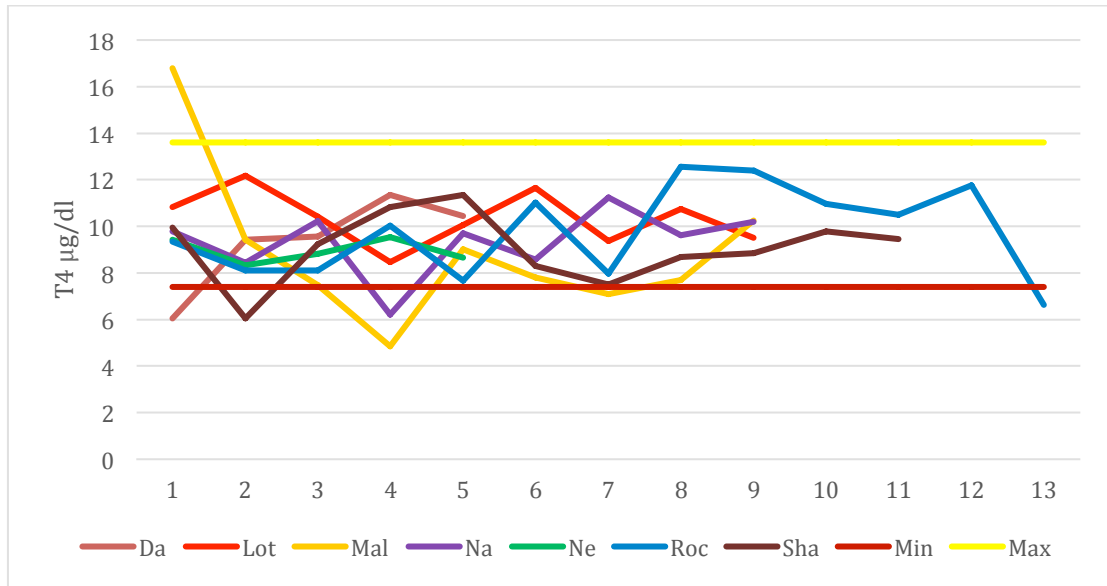


Grafico 4: andamento delle concentrazioni di T4 in µg/dl ottenuti, per tutti gli individui considerati, ad eccezione di Ali.

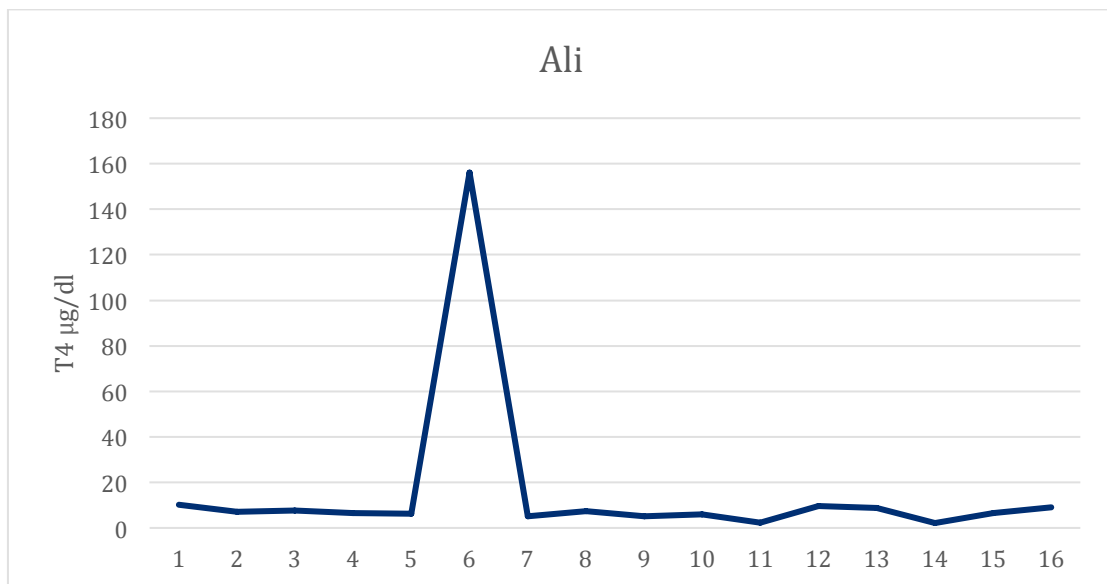


Grafico 5: andamento delle concentrazioni di T4 in µg/dl ottenuti per l'individuo Ali.

Le analisi statistiche hanno poi mostrato differenze nelle concentrazioni sieriche di tali ormoni, tra maschi adulti, femmine adulte, maschio giovane e femmina giovane. Esse sono però significative solo nel caso del T3 ($p=0,006203$), mentre per quanto riguarda TSH e T4, esse non risultano significative (rispettivamente $p=0,951254$ e $p=0,131574$). I valori medi di T3 osservati per maschi e femmine (senza differenziare per età) sono pari

rispettivamente a $1,015 \pm 0,355$ ng/ml e $1,221 \pm 0,284$ ng/ml. Nonostante la significatività statistica osservata, per altro in accordo con quanto osservato da St. Aubin et al. (1996), va rilevato come dal punto di vista biologico la differenza riscontrata non abbia alcun significato (Fair et al., 2011). Nel caso di St. Aubin et al. (1996) le differenze rilevate tra maschi e femmine erano comparabili a quanto rilevato nel presente studio, anche se le concentrazioni erano più elevate (1,24 ng/ml vs. 1,49 ng/ml rispettivamente per maschi e femmine). Questo testimonia come sia sempre necessario, quando si studiano aspetti di fisiologia delle specie, valutare con estrema attenzione i risultati analitici.

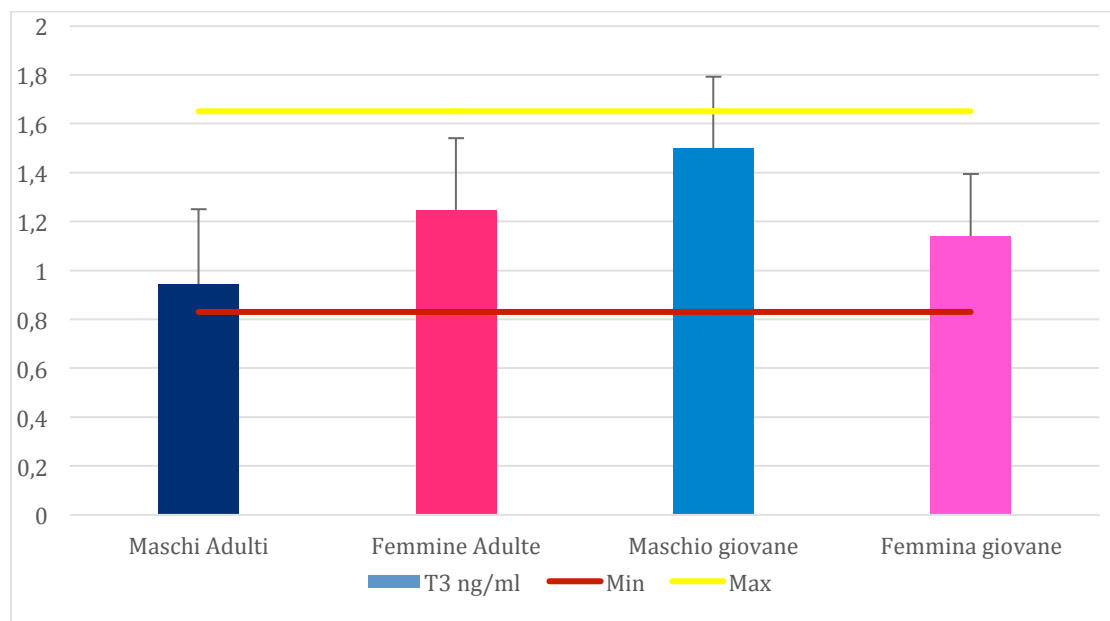


Grafico 6: differenze per sesso ed età riscontrate per i valori di T3 ottenuti

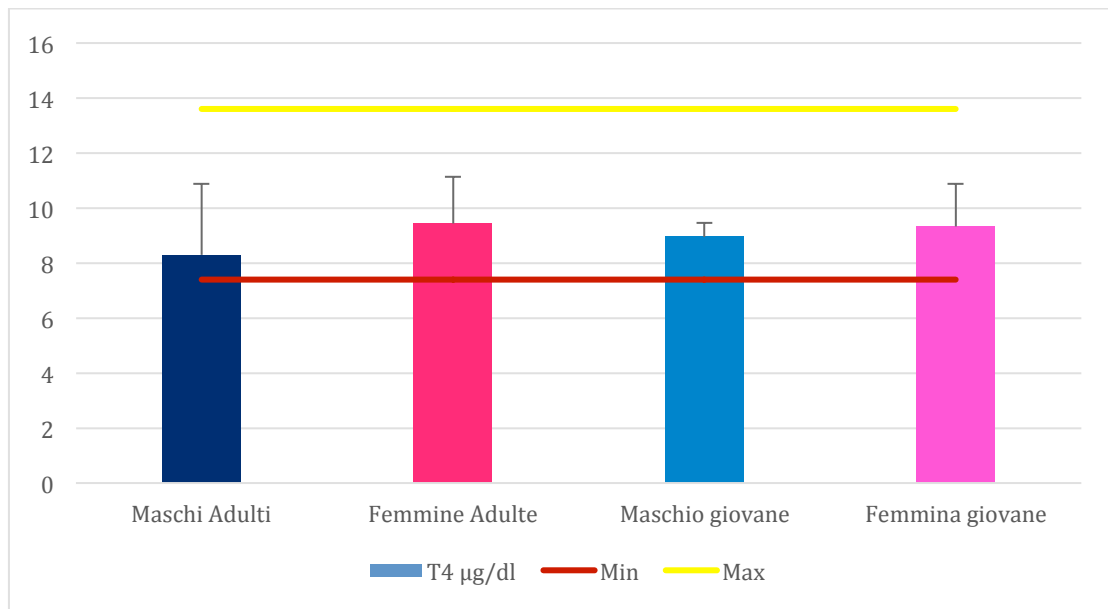


Grafico 7: differenze per sesso ed età riscontrate per i valori di T4 ottenuti. Per quanto riguarda i maschi adulti, il grafico è stato creato eliminando un outlier.

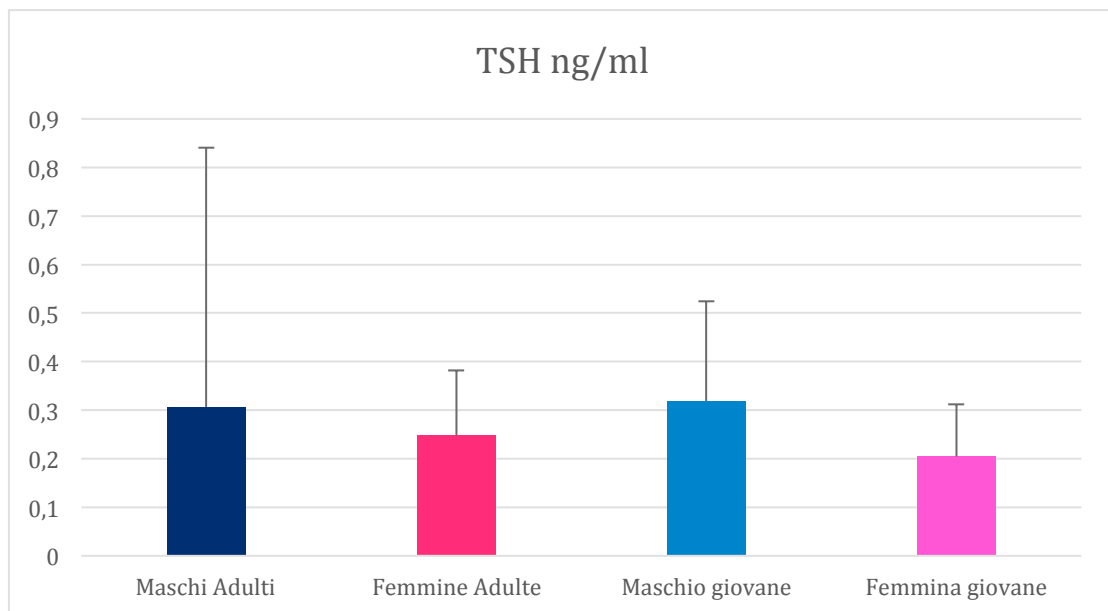


Grafico 8: differenze per sesso ed età riscontrate per i valori di TSH ottenuti. L'elevata deviazione standard osservata nei maschi adulti è legata agli outliers presenti.

Capitolo 5 – CONCLUSIONI

Ai fini della corretta valutazione delle funzionalità tiroidea risulta fondamentale la quantificazione non solo di tiroxina e triiodotironina, ma anche del TSH, che regola l'attività sintetica della ghiandola tiroidea. La natura proteica e specie-specifica dell'ormone ne rende difficile, se non impossibile, la quantificazione in specie "non convenzionali", per le quali non esistono sistemi specifici. L'individuazione di sistemi che ne permettano quindi l'analisi in campioni di siero di queste specie è quindi estremamente importante ai fini della ricerca, non solo relativamente alla fisiologia, ma anche all'impatto di sostanze inquinanti, gli interferenti endocrini, che possono modificare in maniera importante la funzionalità tiroidea.

Il presente studio, volto a verificare l'efficacia dell'uso di un sistema ELISA per TSH canino per la quantificazione dell'ormone di tursiope, ne ha dimostrato l'applicabilità nella specie, permettendo quindi la creazione di un primo database relativo alle concentrazioni di TSH in *T. truncatus*. La validazione del metodo effettuata nel corso delle analisi permette poi di ritenere affidabili anche in termini di concentrazioni i risultati ottenuti.

Lo studio risulta non solo il primo ad effettuare la valutazione di TSH in *T. truncatus*, ma utilizza anche un numero di campioni elevato, con campionamenti ripetuti nel tempo sugli stessi animali, consentendo anche di rilevare eventuali oscillazioni dell'ormone nel tempo.

Per quanto riguarda la quantificazione di T3 e T4, i risultati analitici evidenziano una buona omeostasi e costanza di entrambi gli ormoni, risultato per altro atteso in considerazione delle condizioni di vita degli animali: in ambiente controllato i parametri ambientali e l'apporto energetico vengono infatti mantenuti il più possibile costanti, e quindi solo raramente si osservano variazioni ormonali importanti, che invece avvengono a seguito di risposta a stress ambientali quali i cambiamenti di temperatura o un ridotto apporto di cibo. Va inoltre sottolineato come il fatto che nel gruppo studiato non fossero presenti esemplari gravidi o in lattazione, stati fisiologici in grado di modificare profondamente i livelli ormonali, ha contribuito all'omogeneità dei risultati.

In conclusione il presente lavoro ha innanzitutto fornito uno strumento affidabile per una più completa valutazione della funzionalità tiroidea in una specie “non convenzionale” quale il tursiope. Ha poi fornito una prima serie di dati utili alla definizione di una baseline e di un range di normalità per il TSH nel tursiope, ed ha contribuito all’ampliamento del database relativo agli ormoni tiroidei, che al momento fanno riferimento a pochi lavori svolti sia su animali mantenuti in ambiente controllato che selvatici.

Si ritiene quindi opportuno per il futuro un ampliamento del pool di animali testati e del numero di campioni prelevati da ciascun individuo, anche allargando il numero di parchi coinvolti, in modo da poter prendere in considerazione più parametri che possono influenzare i livelli di ormoni, come ad esempio quelli ambientali, quali temperatura e localizzazione del parco stesso.

Bibliografia

- Amir O, Jiddawi NS, "Stranding event of the common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the northern part of Zanzibar, April 2006 5t", 2007
- Brian et al., "Sonographic evaluation of Thyroid morphology during the normal estrous cycle in the Indo-pacific Bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*)" In *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43(2): 256–264, 2012
- Constantine R, Brunton DH, Dennis T, "Dolphin-watching tour boats change bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) behaviour" In *Biol Conserv* 117: 299-307, 2004
- Fair et al., "Influences of biological variables and geographic location on circulating concentrations of thyroid hormones in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)" In *General and Comparative Endocrinology* 174: 184–194, 2011
- Frodello JP, Romeo M, Viale D, "Distribution of mercury in the organs and tissues of five-toothed-whale species of the Mediterranean" In *Env Poll* 108: 447-452, 2000
- Gannon DP, Waples DM, "Diets of coastal bottlenose dolphins from the U.S. Mid-Atlantic coast differ by habitat", *Mar Mamm Sci.* 20: pp. 527-545, 2004
- Hammond PS, Bearzi G, Bjørge A, Forney K, Karczmarski L, Kasuya T, Perrin WF, Scott MD, Wang JY, Wells RS, Wilson B, "*Tursiops truncatus*", In: IUCN 2009, 2008
- <http://www.cms.int> - Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals
- Jefferson TA, S. Leatherwood, M.A Webber. "*Marine mammals of the world*". Rome: FAO, 1993 (pag. 12 - 202)
- Mooney TA, Nachtigall PE, Au WWL, "Target strength of a nylon monofilament and an acoustically enhanced gillnet: predictions of biosonar detection ranges", In *Aquat Mamm* 30: 220-226, 2004
- Nowacek SM, Wells RS, Solow AR, "Short-term effects of boat traffic on bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Sarasota Bay, Florida" In *Mar Mamm Sci* 17: 673-688, 2001
- Peddemors VM, "Delphinids of southern Africa: A review of their distribution, status and life history", In *J Cetacean Res Manag* 1: 157-165, 1999
- Poli, "*Fisiologia degli animali*", 2008, pag. 111-148
- Reyes JC, "The conservation of small cetaceans: a review", Report prepared for the Secretariat of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals, 1991
- Reynolds, J. E., Wells, R. S. and Eide, "The bottlenose dolphin: biology and conservation", University Press of Florida, 2000
- Rice DW, "Marine mammals of the world: systematics and distribution", Society for Marine Mammalogy, Spec Pub 4, 1998
- Rogers, C. A., Brunnick, B. J., Herzog, D. L., and Baldwin, J. D.,

- "The social structure of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in the Bahamas" in *Mar. Mamm. Sci.* 20, 688 – 708, 2004
- St. Aubin et al., "Dolphin Thyroid and adrenal hormones: Circulating levels in wild and semidomesticated *Tursiops truncatus* and influence of sex, age, and season" In *Marine Mammal Science* 12(1): 1-13, 1996
 - Viaud-Martinez KA, Brownell RL, Komnenou A, Bohonak AJ, "Genetic isolation and morphological divergence of Black Sea bottlenose dolphins". *Biol Conserv* 141: 1600-1611, 2008
 - Villanger et al., "Disruptive effects of persistent organohalogen contaminants on thyroid function in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard", 2011
 - Wells, R. S, "Dolphin social complexity: Lessons from long-term study and life history", in "Animal Social Complexity: Intelligence, Culture, and Individualized Societies" (F. B. M. de Waal, and P. L. Tyack, eds), pp. 32 – 56. Harvard University Press, Cambridge, 2003
 - Wells RS, Scott MD, "Bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)" In: *Handbook of marine mammals* (Ridgway SH, Harrison SR, eds.) Vol. 6: The second book of dolphins and porpoises, pp. 137-182, 1999.
 - Wells RS, Scott MD, "Bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus*" In: "Handbook of marine mammals" Vol. 6: The second book of dolphins and porpoises. pp. 137-182, 1999
 - Wells RS, Scott MD, "Common bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus*" In: "Encyclopedia of marine mammals 2nd Edition", Academic Press, Amsterdam, pp. 249-255, 2009
 - West et al., "Thyroid hormone concentrations in relation to age, sex, pregnancy, and perinatal loss in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)", In *General and Comparative Endocrinology* 197: 73–81, 2014

