

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in  
BIOLOGIA MARINA

Stratificazione di metalli ed ormoni in blubber e  
melone di *Stenella coeruleoalba* e correlazione con  
lo stato di salute degli animali

Tesi di laurea in Ecotossicologia

Relatore  
Prof. Annalisa Zaccaroni

Presentata da  
Laura Pavirani

Correlatore  
Dottoressa Rebecca Andreini

Sessione Anno Accademico 2019/2020

# INDICE

<b>INDICE .....</b>	<b>a</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 I CETACEI DEL MAR MEDITERRANEO .....	1
1.2 LA STENELLA .....	4
1.3 I METALLI .....	8
1.4 IL SISTEMA ENDOCRINO.....	12
1.5 LA TOSSICITÀ DEI METALLI .....	18
1.6 BLUBBER E MELONE .....	20
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>23</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>24</b>
3.1 CAMPIONAMENTO .....	24
3.2 ANALISI DEI CAMPIONI IN LABORATORIO.....	25
3.3 ANALISI STATISTICA .....	28
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONI .....</b>	<b>29</b>
4.1 ORMONI.....	32
4.2 METALLI .....	37
4.3 ORMONI E METALLI.....	43
4.4 CORRELAZIONI TRA ORMONI, METALLI E PATOLOGIE .....	46
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>50</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>52</b>

# **1. INTRODUZIONE**

## **1.1 I CETACEI DEL MAR MEDITERRANEO**

Il Mar Mediterraneo è un bacino semichiuso che si estende su un'area di 2,51 milioni km<sup>2</sup> rappresentando così l'1% della superficie liquida del Pianeta. Per le particolari caratteristiche ecologiche, geologiche ed ambientali che lo contraddistinguono, risulta essere un *hot spot* di biodiversità. Si contano infatti oltre 8.500 specie di animali, pari a circa il 7,5% della biodiversità marina totale, una percentuale rilevante. In particolare, la regione ospita una variegata fauna di cetacei (Mannocci et al., 2018; Notarbartolo di Sciara, 2016; Pace et al., 2015). Si possono distinguere:

Specie RESIDENTI (Fig. 1.1):

- Balenottera comune (*Balaenoptera physalus*)
- Capodoglio (*Physeter macrocephalus*)
- Zifio (*Ziphius cavirostris*)
- Globicefalo (*Globicephala melas*)
- Grampo (*Grampus griseus*)
- Tursiope (*Tursiops truncatus*)
- Delfino comune (*Delphinus delphis*)
- Stenella striata (*Stenella coeruleoalba*)

Specie OCCASIONALI:

- Balenottera minore (*Balaenoptera acutorostrata*)
- Pseudorca (*Pseudorca crassidens*)
- Orca (*Orcinus orca*)
- Steno (*Steno bredanensis*)

Specie ACCIDENTALI:

- Balena Franca Boreale (*Eubalena glacialis*)
- Balenottera boreale (*Balenoptera borealis*)
- Megattera (*Megaptera novaeangliae*)
- Cogia di Owen (*Kogia simus*)
- Mesoplodonte di Blainville (*Mesoplodon densirostris*)

- Mesoplodonte di Sowerby (*Mesoplodon bidens*)
- Iperodonte boreale (*Hyperodon ampullatus*)
- Susa indo-pacifica (*Sousa chinensis*)
- Focena comune (*Phocoena phocoena*)

(Notarbartolo Di Sciara and Demma, 1997).

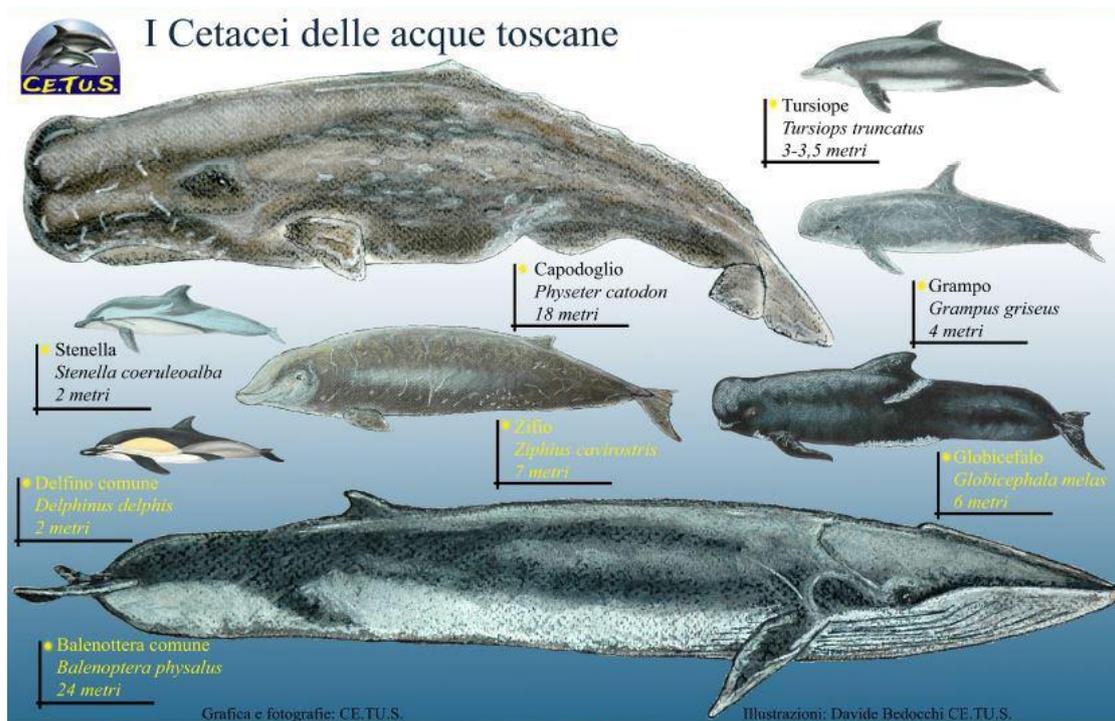


Fig. 1.1 - Cetacei residenti del Mar Mediterraneo.

Le otto specie di Cetacei residenti nel Mediterraneo, dal punto di vista delle loro preferenze di habitat, possono essere suddivise in tre gruppi:

- pelagiche (a profondità medie superiori ai 2000 m),
- di scarpata profonda (tra i 1000 e i 1500 m),
- costiere (a profondità inferiori a 500 m).

Alle specie pelagiche appartengono la Balenottera comune, lo Zifio, il Globicefalo e la Stenella striata. Capodoglio e Grampo preferiscono mantenersi nella zona esterna della scarpata continentale. Infine, al terzo gruppo appartengono il Delfino comune e il Tursiope (Pace et al., 2015).

Balene e delfini rappresentano una componente essenziale della biodiversità marina. Hanno un ruolo ecologico chiave come predatori all'apice della catena alimentare marina, contribuendo a mantenere la salute e l'integrità degli ecosistemi di cui fanno parte. Inoltre, alcuni cetacei sono

indicati come “organismi sentinella” secondo i criteri richiesti dalla Marine Strategy Framework Directive (MSFD 2008/56/EC) in quanto buoni indicatori per il monitoraggio dei contaminanti nell’ambiente marino (Azzellino et al., 2014; Bellante et al., 2012b; Bossart, 2011; Bowen, 1997).

Sfortunatamente, le conoscenze sulla presenza e la distribuzione dei cetacei e sui loro modelli di comportamento nel Mar Mediterraneo sono ancora frammentarie e quelle disponibili si riferiscono principalmente alle regioni occidentali (Carlucci et al., 2018; Notarbartolo di Sciara, 2016). Tuttavia, è ormai assodato che il Mar Ligure e il Mar di Corsica rappresentino in assoluto le regioni dove i Cetacei sono più abbondanti, questa condizione è resa possibile dai fenomeni di *upwelling* che sostengono una produzione primaria tra le più ricche del pianeta.

- MINACCE

I diversi tipi di inquinamento e le diverse alterazioni dell’ecosistema sono tra i più noti impatti dell’uomo sulla biodiversità marina. Ciò è ancora più evidente per il Mediterraneo in quanto, in una regione così ristretta, si concentrano forti pressioni demografiche, urbane e industriali (Bianchi and Morri, 2000). Non ci si può quindi aspettare che la coesistenza tra i principali predatori marini, come i mammiferi marini, e gli esseri umani sia facile in queste aree.

I cetacei sono particolarmente vulnerabili alle pressioni antropiche a causa dei loro tratti ecologici e della loro *life history*, infatti molte specie hanno un’elevata longevità, basso potenziale riproduttivo, maturità tardiva e piccole dimensioni della popolazione (Bossart, 2011; Monteiro et al., 2020; Notarbartolo di Sciara, 2016). Questi *top predators* accumulano grandi quantità di contaminanti come organoclorurati (OC) e metalli, per esempio i livelli di OC nel delfino striato del Mediterraneo sono di 1-2 ordini di grandezza superiori rispetto ai delfini dell’Atlantico e del Pacifico della stessa specie (Fossi et al., 2007).

Il Mar Mediterraneo è economicamente molto importante, essendo sfruttato per la pesca, l’estrazione di petrolio e gas e l’energia rinnovabile offshore; è inoltre utilizzato per la navigazione e il turismo (Coll et al., 2012). Le minacce più importanti per i cetacei sono dunque legate alla perdita e al degrado dell’habitat (comprese le alterazioni climatiche), alla pesca eccessiva, alla navigazione, alle catture accidentali e intenzionali, all’introduzione di specie marine invasive e all’inquinamento chimico (da metalli pesanti, plastiche, microplastiche, etc.) e acustico (Pace et al., 2015).

## 1.2 LA STENELLA

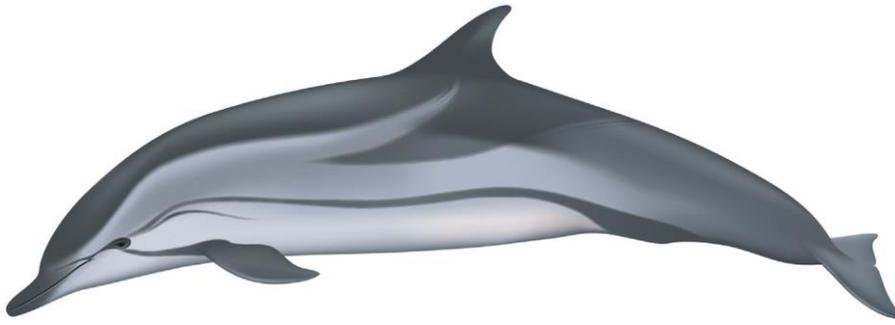


Fig. 1.2 - *Stenella coeruleoalba*.

- CARATTERISTICHE E TASSONOMIA

Phylum	<i>Chordata</i>
Classe	<i>Mammalia</i>
Ordine	<i>Cetacea</i>
Sottordine	<i>Odontoceti</i>
Famiglia	<i>Delphinidae</i>
Genere	<i>Stenella</i>
Specie	<i>S. coeruleoalba</i>

La stenella striata (*Stenella coeruleoalba*, Meyen 1833) (Fig. 1.2) è un piccolo delfinide pelagico con una livrea grigio scura sul dorso che tende al bianco o rosa verso il ventre. La caratteristica distintiva della specie è la presenza di striature lungo il corpo: dal rostro si diparte una striscia di colore nero bluastrò che circonda l'occhio per poi biforcarsi da un lato verso la pinna pettorale e dall'altro verso la regione anale; sopra queste strisce, lungo i fianchi, è presente una banda di colore bianco simile a una fiamma che va dalla zona posteriore del capo alla pinna dorsale.

Presenta un corpo in gran parte fusiforme con un lungo rostro ben delimitato dal melone, una pinna dorsale falcata e delle pinne pettorali lunghe e sottili. Come tutti gli Odontoceti, la stenella è omodonte e monofiodonte; possiede da 40 a 50 piccoli denti per arcata (Fig. 1.3).

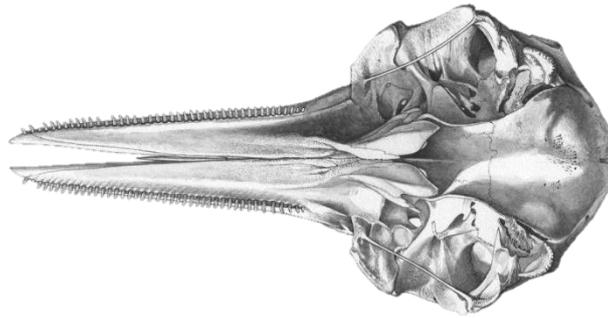


Fig. 1.3 - Cranio di *Stenella coeruleoalba*.

È un delfino relativamente robusto; gli adulti possono misurare fino a 2.5 m per un peso di circa 150 kg anche se le popolazioni del Mediterraneo sono di dimensioni più piccole (2 m di lunghezza per un centinaio di kg). La specie presenta un modesto dimorfismo sessuale con i maschi lievemente più grandi delle femmine.

L'accoppiamento avviene in inverno e in estate e la gestazione dura dai 12 ai 13 mesi. I piccoli appena nati misurano poco meno di un metro. I maschi raggiungono la maturità sessuale tra i 7 e 15 anni mentre le femmine tra i 5 e i 13 (Archer and Perrin, 1999).

- **DISTRIBUZIONE E ALIMENTAZIONE**

La stenella striata è un delfino cosmopolita, frequente nelle acque tropicali e temperate di tutto il mondo (Fig. 1.4). È il cetaceo più comune del Mar Mediterraneo, la specie è particolarmente abbondante nelle acque di Spagna, Francia Italia e Grecia (Notarbartolo di Sciara, 2016). Risulta invece meno documentata nel bacino meridionale e orientale, probabilmente a causa della riduzione degli sforzi di avvistamento (Archer, 2018; IUCN, 2008). È un animale tipicamente pelagico, si trova al di fuori della piattaforma continentale verso le acque più profonde spesso associate a zone di *upwelling*. È abbastanza raro osservarla vicino alla costa.

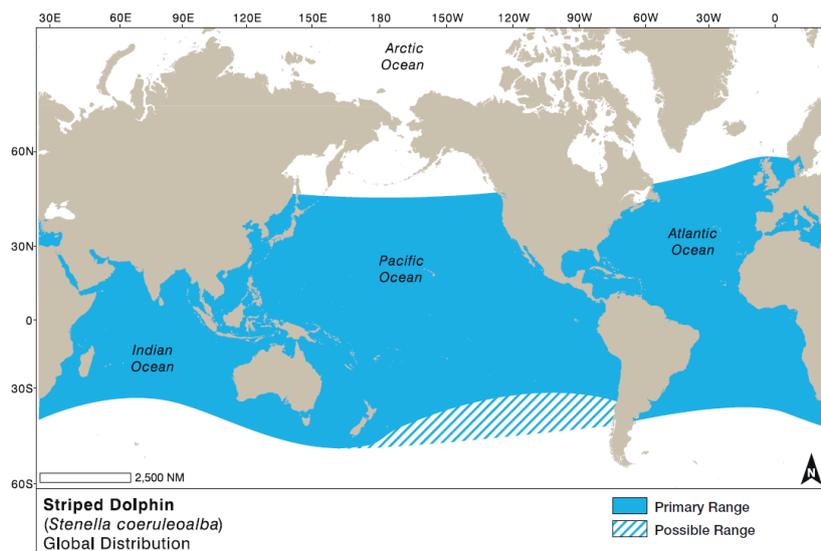


Fig. 1.4 - Distribuzione di *Stenella striata*.

Si nutre principalmente di piccoli pesci e calamari pelagici o bento-pelagici; talvolta anche di crostacei. Si immerge da 200 a 700 m per raggiungere le potenziali prede, tuttavia può nutrirsi anche di notte quando queste ultime migrano più vicino alla superficie (Archer and Perrin, 1999).

- **COMPORAMENTO**

In genere è un animale altamente gregario e vive in branchi chiamati “school” la cui dimensione varia da 10 a 30 fino a diverse centinaia di individui, raramente superiori a 500. Può occasionalmente essere osservata in gruppi misti con altre specie, perlopiù con il delfino comune (*Delphinus delphis*), che possono contare fino a migliaia di esemplari. Compie numerose acrobazie aeree e alcuni di questi movimenti sembrano avere una funzione nella comunicazione. Presenta un comportamento abbastanza confidente nei confronti dell’uomo e delle sue imbarcazioni, sulla cui prua viene spesso a giocare (Archer and Perrin, 1999).

- **STATUS E MINACCE**

La stenella striata è classificata in tutto il mondo dalla IUCN Red List come “*Least concern*” ovvero a rischio minimo (IUCN, 2008). Tuttavia, le popolazioni del Mar Mediterraneo sono state indicate come “*Vulnerable*” (Gaspari and Aguilar, 2012).

Può cadere preda dell’orca e degli squali oceanici ma il suo maggior nemico rimane l’uomo. È infatti oggetto di caccia in Giappone e, in misura più modesta, in Sri Lanka. Viene inoltre

catturata accidentalmente nelle reti pelagiche derivanti, soprattutto nel Mediterraneo (Archer, 2018; Notarbartolo Di Sciara and Demma, 1997).

Sempre in Mediterraneo, la stenella striata ha subito, tra il 1990 e il 1992, una pesante moria dovuta ad un'epizoozia di morbillivirus e una più recente nel 2007 (Domingo et al., 1995; Raga et al., 2008).

Viene trovata spiaggiata frequentemente, ma sempre come singoli individui. Gli spiaggiamenti in massa sono molto rari, probabilmente a causa della loro distribuzione offshore (Archer and Perrin, 1999). In Italia è di gran lunga la specie che si spiaggia più di frequente per via della sua predominanza numerica su tutti gli altri cetacei pelagici in questa regione (Notarbartolo Di Sciara and Demma, 1997).

La stenella striata è un animale difficile da studiare nel proprio habitat naturale e in più non si riesce a mantenere in cattività perché si stressa facilmente (Archer and Perrin, 1999). Per cui le conoscenze disponibili sui diversi fattori di stress che possono subire questi animali sono estremamente limitate. Diventano dunque fondamentali le ricerche condotte sugli individui spiaggiati, in quanto possono fornire molteplici informazioni sul loro stato di salute ed evidenziare eventuali problemi di conservazione e gestione (Martínez-López et al., 2019; Monteiro et al., 2020). È quindi necessario un approccio di analisi integrale per poter ricavare tutte le conoscenze utili su questa specie.

### 1.3 I METALLI

Negli ultimi decenni, le attività antropogeniche hanno aumentato il flusso di contaminanti chimici negli ecosistemi marini fino a concentrazioni potenzialmente pericolose. Di conseguenza, la crescente preoccupazione per l'inquinamento ambientale ha portato a compiere molte indagini su sostanze tossiche come i metalli pesanti (Das et al., 2002; Monteiro et al., 2020). Per esaminare le concentrazioni di questi *trace elements* in mare, molti studiosi utilizzano i tessuti dei mammiferi marini, specialmente dei cetacei. Infatti, per la notevole longevità, la loro residenza lungo le coste, per la posizione come *top predators* nella rete trofica e la presenza di grandi depositi di grasso, i cetacei accumulano elevati livelli di questi contaminanti e, di conseguenza, ne sono buoni bioindicatori (Aubail et al., 2013; Bossart, 2011; Das et al., 2002; Martínez-López et al., 2019).

La contaminazione da metalli pesanti nei cetacei è influenzata da numerosi fattori fisiologici ed ecologici: area geografica, dieta, età, sesso, tessuto considerato e tassi metabolici. In particolare, nel presente elaborato vengono presi in esame il blubber e il melone di *Stenella coeruleoalba*, sebbene siano tessuti ancora poco studiati per questo monitoraggio.

I metalli pesanti sono solitamente divisi in essenziali (zinco, rame, ferro, manganese, selenio) e non essenziali (mercurio, cadmio, piombo, arsenico), questi ultimi sono potenzialmente tossici a basse concentrazioni e non si dovrebbero ritrovare all'interno dell'organismo mentre gli essenziali sono all'interno delle cellule e sono necessari per la sopravvivenza delle cellule stesse ma in caso di concentrazioni lontane da quelle fisiologiche possono avere effetti tossici.

- RAME (Cu)

Il rame è un metallo essenziale per la vita dei mammiferi e la sua assunzione avviene principalmente tramite la dieta. Le sue funzioni biologiche lo vedono coinvolto nell'emopoiesi, nel metabolismo del tessuto connettivo, nella formazione della mielina nei neonati, nell'osteogenesi e nei processi respiratori. Le concentrazioni più elevate del rame si trovano nel fegato, nei reni e nel cervello (Zaccaroni et al., 2010). La maggior parte degli animali è in grado di controllare la quantità in eccesso di Cu nel corpo diminuendo l'assorbimento o aumentando l'escrezione grazie a importanti meccanismi di regolazione come le metallotioneine, le quali legano il rame ionico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) aiutando così a prevenirne la citotossicità (Eisler, 1998). Dosi elevate di questo metallo possono causare principalmente gravi danni al fegato (con cirrosi epatica e crisi emolitiche), successivamente ai tubuli renali, al cervello e ad altri organi, danni ossidativi a lipidi di membrana, proteine e DNA che portano alla degenerazione cellulare

(Gaetke and Chow, 2003; Zaccaroni et al., 2010). Infine, il Cu è essenziale per una difesa antiossidante ottimale e la sua carenza diminuisce la capacità del corpo di affrontare lo stress ossidativo (Gaetke and Chow, 2003).

- **SELENIO (Se)**

Viene assunto principalmente tramite la dieta e la stenella striata del Mediterraneo presenta livelli di Se molto più alti rispetto a quelli del Pacifico e dell'Atlantico (Monaci et al., 1998). Alte concentrazioni di Se possono essere trovate nel fegato e nei reni degli animali marini (Zaccaroni et al., 2010).

Il selenio è un micronutriente essenziale: è necessario per la normale crescita e lo sviluppo, il mantenimento delle funzioni omeostatiche ed è un componente di molti enzimi e proteine. Ad esempio, fa parte dell'enzima glutatione perossidasi, un importante antiossidante che serve a prevenire i danni metabolici ai tessuti (Hamilton, 2004; Zaccaroni et al., 2010). Tuttavia, è stato dimostrato che l'esposizione ad alte concentrazioni di Se aumenta lo stress ossidativo (Selvaraj et al., 2013; Sun et al., 2014). Sembra inoltre svolgere un ruolo antagonista nei confronti dei metalli pesanti, come il mercurio, il cadmio e l'argento (Ikemoto et al., 2004; Monteiro et al., 2020).

Sebbene il selenio sia un oligoelemento essenziale, assunto in eccesso diventa tossico per l'organismo. Diversi studi hanno dimostrato che un basso livello di Se è un anticancerogeno efficace mentre un livello alto può indurre carcinogenesi. È genotossico e citotossico. Infine, è associato allo sviluppo di malattie croniche degenerative e malattie cardiovascolari (Sun et al., 2014).

- **MERCURIO (Hg)**

I cetacei sono gli animali maggiormente esposti al mercurio, soprattutto nel Mar Mediterraneo dove si registrano le concentrazioni più elevate rispetto ad Atlantico e Pacifico (Andre et al., 1991; Das et al., 2002; Monaci et al., 1998).

Il mercurio esiste in diverse forme ma l'accumulo avviene principalmente nella sua forma organica, il metilmercurio (MeHg), mentre il mercurio inorganico viene escreto abbastanza rapidamente dopo l'ingestione (Das et al., 2002; Kershaw and Hall, 2019; Zaccaroni et al., 2010). Il MeHg è in grado di entrare nella catena alimentare dal suo livello più basso, dal plancton agli invertebrati più grandi, fino alle posizioni più alte, che sono occupate dai pesci e infine dai mammiferi marini; questo processo prende il nome di biomagnificazione (Bellante et

al., 2012b; López-Berenguer et al., 2020). Di fatti, è per la loro posizione al vertice della rete trofica e per la loro longevità che gli odontoceti accumulano altissime concentrazioni di Hg (Das et al., 2002; McCormack et al., 2020; Monaci et al., 1998).

Una volta assorbito viene distribuito al fegato, ai reni, alla milza e successivamente ai muscoli e al cervello. I cetacei hanno una capacità limitata di metabolizzare o di eliminare il mercurio e quindi viene bioaccumulato negli organi da concentrazioni più alte a più basse come segue: fegato > rene > muscolo > cervello > blubber (Kershaw and Hall, 2019; López-Berenguer et al., 2020).

La tossicità del metilmercurio si manifesta principalmente nel sistema nervoso centrale portando a deficit motorio e sensoriale, gli animali così esposti diventano anoressici e letargici. Questo metallo inoltre è in grado di passare la placenta e concentrarsi nel cervello del feto portando a conseguenza gravi o letali (Das et al., 2002). Nel fegato provoca danni da stress ossidativo e nei reni porta alla necrosi dei tubuli renali.

- CADMIO (Cd)

È considerato uno dei metalli più tossici nell'ambiente (Bellante et al., 2012a). L'esposizione al cadmio avviene principalmente per inalazione e ingestione: l'avvelenamento acuto tramite inalazione provoca stress respiratorio, danneggia le vie aeree e i polmoni provocando edema polmonare; l'ingestione colpisce intestino, fegato e reni, in particolare questi ultimi due accumulano cadmio in grandi quantità subendo di conseguenza gravi lesioni. L'esposizione prolungata al Cd produce nefrotossicità, osteotossicità e immunotossicità (Das et al., 2002; Klaassen et al., 2009; Martelli et al., 2006; Zaccaroni et al., 2010).

Nonostante sia debolmente mutageno, è genotossico e cancerogeno. Di fatti, tramite la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), crea danni al DNA, provoca cambiamenti epigenetici e inibisce i meccanismi di riparazione del DNA (Bernhoft, 2013; Martelli et al., 2006). Può inoltre interagire con i metalli essenziali, come zinco, rame e ferro, andando a interferire con la loro omeostasi.

Una volta assorbito, il cadmio ha un'emivita molto lunga nell'organismo, stimata di oltre 10 anni (Zaccaroni et al., 2010). Il principale meccanismo di difesa contro questo oligoelemento sono le metallotioneine, esse svolgono un ruolo importante nella ritenzione del Cd nei tessuti e sono quindi responsabili della sua lunga emivita (Klaassen et al., 2009).

- PIOMBO (Pb)

Il piombo entra nell'ambiente marino per mezzo di fonti sia antropiche che naturali. L'esposizione avviene tramite acqua, aria, alimentazione e sedimenti (Caurant et al., 2006).

L'intossicazione da piombo può colpire qualsiasi organo all'interno dell'organismo, le concentrazioni più elevate sono state viste nel rene e nel fegato, seguite da pelle, cervello e muscoli (Caurant et al., 2006). Tuttavia, gli effetti peggiori si hanno a livello del sistema nervoso centrale dove vengono distrutte le cellule neuronali. A livello dei reni, invece, si può avere nefrotossicità acuta, danni ai tubuli renali con glicosuria e aminoaciduria. Inoltre viene assorbito facilmente dal feto durante la gravidanza con conseguenze gravi o letali (Zaccaroni et al., 2010). Infine, nella sua forma ossidata a  $Pb^{2+}$  sostituisce i metalli simili che hanno una propria funzione biologica, per esempio il  $Fe^{2+}$  nell'emoglobina e il  $Ca^{2+}$  nelle ossa (Zaccaroni et al., 2010).

- ARSENICO (As)

L'arsenico, come il cadmio, è considerato uno degli elementi più tossici per gli organismi viventi (Bellante et al., 2012a). La tossicità e la biodisponibilità dell'arsenico dipendono dalla sua forma chimica, negli ecosistemi marini sono state identificate varie forme di composti di As. Nell'acqua e nei sedimenti è presente principalmente nelle sue forme inorganiche invece negli animali marini predomina la forma organica, l'arsenobetaina, mentre le inorganiche sono presenti in quantità minori (Kubota et al., 2003). La tossicità acuta dei composti organici dell'arsenico è generalmente inferiore a quella dell'As inorganico, la forma più tossica è infatti quella trivalente (Zaccaroni et al., 2010).

Una volta assorbito, si lega alle proteine plasmatiche o agli eritrociti e viene trasportato a fegato, reni, polmoni, mucosa intestinale, milza, muscoli e in parte al sistema nervoso. L'arsenico inorganico viene convertito nel fegato in vari stati di ossidazione e successivamente viene metilato in varie forme. Le specie metilate vengono escrete nelle urine, ma possono essere depositate nei polmoni, nel fegato e nei reni. Tuttavia, i dati disponibili per le concentrazioni di As nei tessuti dei mammiferi marini sono scarsi o addirittura assenti (Bellante et al., 2012a; Kubota et al., 2003). È ben noto che esercita effetti tossici come cancerogenicità, teratogenicità, citotossicità e genotossicità. È stato inoltre dimostrato che l'arsenico inorganico agisce come interferente endocrino (Kubota et al., 2003). L'esposizione cronica può produrre effetti dannosi al sistema nervoso centrale e periferico. Infine, può portare a lesioni epatiche (Kubota et al., 2003; Zaccaroni et al., 2010).

## 1.4 IL SISTEMA ENDOCRINO

Il sistema endocrino è costituito da ghiandole e cellule deputate alla secrezione di importanti sostanze chimiche chiamate ormoni. Essi svolgono funzioni relative all'omeostasi dell'organismo, ovvero provvedono al mantenimento dell'equilibrio delle funzioni fisiologiche e delle caratteristiche chimico-fisiche interne dell'organismo. Il controllo del corpo dei mammiferi marini si fonda, difatti, su una serie di meccanismi basati sul monitoraggio continuo dell'ambiente interno e su un feedback costante (Cozzi et al., 2016).

L'esposizione a contaminanti ambientali come i metalli pesanti può interferire con il corretto funzionamento del sistema endocrino andando così a compromettere il benessere dell'animale.

Le principali ghiandole dell'apparato endocrino sono:

- Ipotalamo
- Ipofisi
- Epifisi
- Tiroide
- Paratiroidi
- Isole pancreatiche
- Ghiandole surrenali
- Gonadi
- Tessuto endocrino diffuso

- IPOTALAMO

L'ipotalamo è una struttura del sistema nervoso centrale situato nella parte inferiore del diencefalo, fa parte tanto del SNC quanto del sistema endocrino. Controlla molte funzioni corporee grazie alla produzione di ormoni che agiscono sull'ipofisi, portandola così a sintetizzare e immettere nel sangue ulteriori ormoni che a loro volta vanno ad agire sulle diverse ghiandole endocrine. Lo stretto rapporto tra i due organi costituisce l'asse ipotalamo-ipofisario. Ormoni ipotalamici: ormone di rilascio della tireotropina (TRH), ormone di rilascio della corticotropina (CRH), vasopressina (AVP), ossitocina, ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), ormone di rilascio dell'ormone della crescita (GHRH), somatostatina, dopamina.

- IPOFISI

Situata alla base dell'encefalo, l'ipofisi dei cetacei, o ghiandola pituitaria, è costituita da due porzioni completamente separate: la neuroipofisi e l'adenipofisi, quest'ultima è generalmente più grande della prima. Controlla la funzionalità di numerosi organi, tra cui tiroide, corticale dei surreni e gonadi.

Secerne nove ormoni, due dalla neuroipofisi e sette dall'adenipofisi.

Neuroipofisi:

- Vasopressina (ADH): interviene nell'osmoregolazione. Agisce a livello renale promuovendo il riassorbimento di acqua. È prodotta dall'ipotalamo e rilasciata dall'ipofisi.
- Ossitocina: regola il comportamento sociale e materno, interviene nel parto e durante l'allattamento. È prodotta dall'ipotalamo e rilasciata dall'ipofisi.

Adenipofisi:

- Ormone tireostimolante (TSH): agisce sulla tiroide portandola a secernere gli ormoni tiroidei (T3 e T4).
- Ormone adrenocorticotropo (ACTH): agisce sulla ghiandola surrenale stimolandone la produzione di corticosteroidi (tra cui il cortisolo).
- Ormone della crescita (GH): stimola la crescita corporea.
- Prolattina (PRL): regola la produzione di latte.
- Ormone luteinizzante (LH) e Ormone follicolostimolante (FSH): queste due gonadotropine agiscono sulle ovaie e sui testicoli per stimolare, rispettivamente, lo sviluppo del follicolo e la spermatogenesi.
- Ormone melanotropo (MSH): regola la pigmentazione e ha un ruolo anche nella regolazione dell'omeostasi energetica e dell'assunzione di cibo.

- TIROIDE

La ghiandola tiroidea è costituita da due lobi collegati da un ponte di tessuto tiroideo ed è generalmente molto ben sviluppata nei cetacei (Cozzi et al., 2016). Presenta la classica organizzazione follicolare in cui i follicoli sono riempiti da materiale denso detto colloide e rivestiti da cellule epiteliali cuboidali (tireociti o cellule principali). I follicoli costituiscono l'unità funzionale della tiroide in quanto al loro interno avviene la sintesi degli ormoni tiroidei.

Tra i follicoli ci sono le cellule C (o cellule parafollicolari), che secernono invece l'ormone calcitonina.

La tiroide svolge un ruolo centrale nella regolazione dello sviluppo e del metabolismo basale.

### Ormoni tiroidei

La produzione e il rilascio degli ormoni tiroidei nel flusso sanguigno sono regolati da circuiti di feedback negativi dell'asse ipotalamo – ipofisi – tiroide (HPT). Lo stimolo iniziale proviene dall'ipotalamo sotto forma di ormone di rilascio tireotropico. Il TRH agisce sull'ipofisi per farle produrre e secernere l'ormone stimolante la tiroide. Il TSH viene trasportato attraverso il sistema circolatorio alla ghiandola tiroidea dove stimola la secrezione degli ormoni tiroidei (TH) come schematizzato nella figura (Fig. 1.5) (Atkinson et al., 2018; Fair et al., 2011).

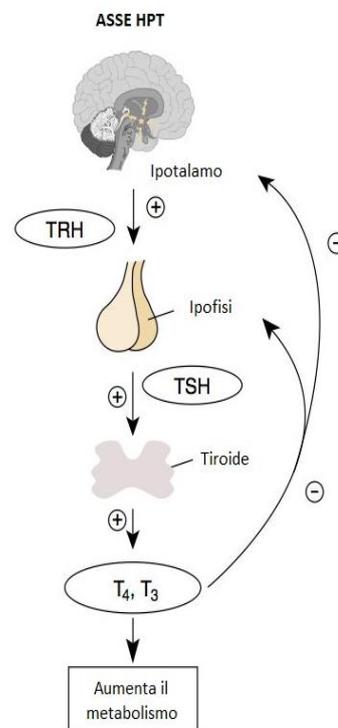


Fig. 1.5 - Asse HPT  
Simboli: (+) stimolazione, (-) inibizione.

Gli ormoni tiroidei sono due, la triiodotironina (T3) e la tiroxina (T4), entrambi derivano dall'amminoacido tirosina. La forma biologicamente attiva è il T3, tuttavia la tiroide produce principalmente T4, ne deriva che il T4 viene poi trasformato nelle cellule bersaglio in T3.

Per la loro sintesi è necessaria una proteina detta tireoglobulina, essa funge da impalcatura per i residui di tirosina su cui vengono legati atomi di iodio. Inizialmente la tirosina fa parte della tireoglobulina poi una volta iodinata viene staccata e si ha la formazione degli ormoni tiroidei.

I principali effetti dei TH sono l'aumento del tasso metabolico, il mantenimento della temperatura corporea e la regolazione della crescita corporea. Inoltre, sono coinvolti nella maturazione sessuale e risultano essenziali per il normale sviluppo del cervello nel feto (Fair et al., 2011).

Le concentrazioni circolanti di questi ormoni forniscono utili indicatori diagnostici in veterinaria, ma sono influenzate da variabili biologiche come età, sesso, stato riproduttivo e stagione. Tuttavia, sebbene l'asse HPT sia il più conosciuto rispetto ad altri sistemi endocrini, nei mammiferi marini la quantità di dati rimane limitata e ciò non consente lo sviluppo di intervalli di riferimento per questi ormoni (Fair et al., 2011).

- **GHIANDOLE SURRENALI**

Negli odontoceti adulti, le ghiandole surrenali sono situate vicino ai reni e sono costituite da due porzioni di tessuto ben distinte: corticale e midollare.

La corticale del surrene si divide a sua volta in zona glomerulare (secernente mineralcorticoidi), zona fascicolata (che produce glucocorticoidi) e zona reticolare (per gli androgeni). La midollare, invece, è il sito principale della sintesi e del rilascio delle catecolamine.

#### Ormoni surrenali

La ghiandola surrenale è regolata dall'input ipotalamo-ipofisario, attraverso un sistema che viene chiamato asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

Questo asse è il coordinatore centrale dei sistemi di risposta neuroendocrina allo stress poiché gli ormoni della ghiandola surrenale (glucocorticoidi, mineralcorticoidi e catecolamine) sono necessari per un'adeguata risposta a condizioni stressanti (Clark et al., 2006). Difatti, dopo l'esposizione allo stress, l'ipotalamo secreta l'ormone di rilascio (CRH) che agisce sull'ipofisi. Di conseguenza, la ghiandola pituitaria rilascia ACTH che a va ad attivare le ghiandole surrenali stimolando il rilascio degli ormoni surrenali come mostrato in figura (Fig. 1.6).

Lo studio della risposta allo stress nei cetacei è una questione assai controversa, poiché un intervallo di valori di riferimento può essere difficile da valutare (Cozzi et al., 2016).

Tra le catecolamine, l'adrenalina è considerata l'unica che agisce come un ormone endocrino, mentre la noradrenalina e la dopamina agiscono come neurotrasmettitori. Sia l'adrenalina che la noradrenalina sono coinvolte nella risposta immediata di *fight or flight*, ossia lotta o fuggi, dopo un'esposizione acuta a stimoli stressanti. I loro livelli circolanti aumentano rapidamente, inducendo vasocostrizione periferica, aumentando la frequenza cardiaca e mobilitando le

riserve di energia sotto forma di glucosio e acidi grassi liberi. Inoltre, sono coinvolte nella produzione di calore e svolgono un ruolo importante nell'economia dell'ossigeno durante l'immersione. Sono stati pubblicati pochi lavori sulle normali variazioni di base delle catecolamine nei mammiferi marini, sebbene uno studio condotto sui tursiopi suggerisca che vi siano variazioni stagionali, con aumenti di questi ormoni in inverno (Suzuki et al., 2012).

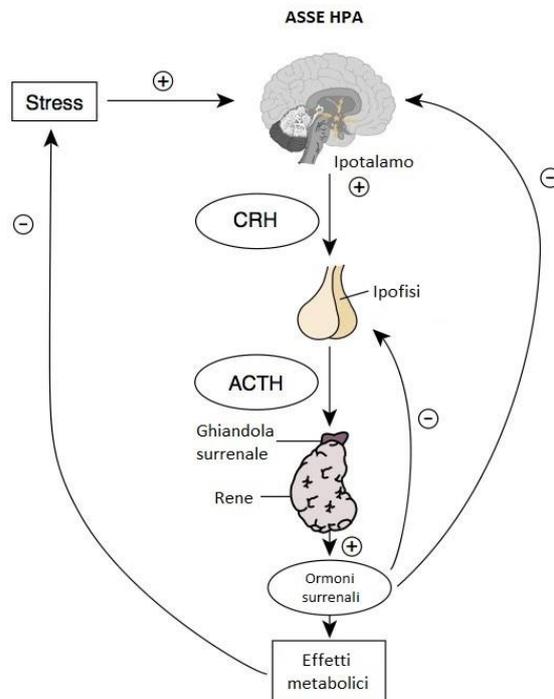


Fig. 1.6 - Asse HPA  
 Simboli: (+) stimolazione, (-) inibizione.

Per quanto riguarda i mineralcorticoidi, il principale risulta l'aldosterone, un ormone steroideo che agisce sui reni per mantenere l'equilibrio elettrolitico e trattenere l'acqua. Generalmente non è considerato un ormone dello stress, tuttavia diversi studi hanno mostrato il suo rilascio durante l'esposizione degli animali a condizioni sfavorevoli. Il ruolo dell'aldosterone nella risposta allo stress sembra essere la stabilizzazione della pressione sanguigna e il ripristino dell'omeostasi cardiovascolare (Burgess et al., 2017).

I glucocorticoidi sono responsabili della risposta a lungo termine allo stress. In genere hanno azioni permissive sulla sintesi delle catecolamine, sostenendone l'azione e potenziando i loro effetti catabolici su epatociti, adipociti e fibre muscolari, sovraregolando l'espressione dei geni gluconeogenici per aumentare la disponibilità di substrati energetici necessari a muscoli e cervello in caso di emergenza (Burgess et al., 2017). Tuttavia, un'esposizione prolungata a concentrazioni elevate di questi ormoni può mettere a rischio la sopravvivenza dell'individuo,

portando a effetti immunosoppressivi e azioni antinfiammatorie (Cozzi et al., 2016). Tra i glucocorticoidi, il cortisolo è sicuramente il più conosciuto ed è noto anche come “ormone dello stress”. Il cortisolo è altamente solubile nel tessuto adiposo e si ritiene che le concentrazioni di questo ormone nel blubber possano fornire una valida misura dello stress a cui è sottoposto l’animale nel tempo (Champagne et al., 2017).

## 1.5 LA TOSSICITÀ DEI METALLI

- INTERFERENTI ENDOCRINI

Nel 2002 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito le sostanze chimiche che alterano il sistema endocrino (EDC – Endocrine Disrupting Chemicals) come “una sostanza o una miscela esogena che altera le funzioni del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo integro, della sua progenie o delle (sotto) popolazioni”. Gli EDC influenzano i sistemi ormonali interferendo principalmente con gli ormoni steroidei e tiroidei. Le sostanze chimiche che rientrano in questa definizione sono numerose: gli inquinanti organici persistenti come il diclorodifeniltricloroetano (DDT); composti industriali come diossine e bifenili policlorurati (PCB); pesticidi come insetticidi clorurati; prodotti ampiamente utilizzati nei cosmetici, come ftalati, componenti dei filtri ultravioletti (UV); e anche diversi metalli pesanti (Iavicoli et al., 2009).

È ben noto che i metalli pesanti causano una gran varietà di problemi di salute e i loro meccanismi di tossicità sono studiati costantemente. Tuttavia, le implicazioni che hanno nel sistema endocrino devono ancora essere approfondite e finora sono pochi quelli studiati a tal proposito. Inoltre, le informazioni che si hanno derivano principalmente da studi di laboratorio condotti in vitro o su cavie e si tratta maggiormente l'effetto che hanno sull'apparato riproduttivo. Le conoscenze sui cetacei sono quindi rare. La contaminazione ambientale da metalli pesanti è in aumento, per questo motivo sarebbe opportuno incrementare lo studio dei loro effetti sull'omeostasi ormonale e riuscire a stabilire una relazione dose – effetto negli animali esposti a questa minaccia (Dyer, 2007; Georgescu et al., 2011; Iavicoli et al., 2009; Rana, 2014).

Ipofisi. Gli effetti dei *trace elements* sull'ipofisi sono poco conosciuti. Alcuni studi hanno visto che il cadmio ha effetti deleteri sulla funzione gonadica e altera la secrezione di prolattina, ACTH, GH e TSH interrompendo un meccanismo regolatore dell'asse ipotalamo – ipofisi (Iavicoli et al., 2009; Lafuente et al., 2003). Il piombo invece, ha ridotto significativamente la produzione di steroidi indotta da ACTH nelle cellule in coltura (Caride et al., 2010).

Tiroide. I metalli pesanti come Cd, Pb, Cr e Cu sono noti per indurre tireotossicità nell'uomo e negli animali. I meccanismi con cui agiscono recano disturbi dell'asse ipotalamo – ipofisi – tiroide, queste specie metalliche possono ridurre i livelli circolanti di T3 e T4 con conseguente inibizione del feedback negativo e aumento della secrezione di TSH da parte della ghiandola

pituitaria. Inoltre, l'ipersecrezione cronica di TSH predispone la ghiandola tiroidea a sviluppare neoplasie (Rana, 2014). Tuttavia, nei ratti trattati con il cadmio il TSH plasmatico non è aumentato in risposta a bassi livelli di T4 e T3 (Pavia et al., 1997).

Per quanto riguarda il mercurio, nell'uomo è stato visto che ad alte concentrazioni di questo metallo corrisponde un aumento dei livelli sierici di T4 libera e una diminuzione dei livelli sierici di T3 (Iavicoli et al., 2009).

Ghiandole surrenali. I metalli pesanti possono causare alterazioni lungo l'asse HPA di diversi organismi. Sono stati studiati gli effetti di Hg, Cd, Co e Cu: i risultati hanno indicato un'azione tossica diretta sulle cellule produttrici di steroidi nelle ghiandole surrenali (Rana, 2014). È stato dimostrato che il Pb accumulato ha effetti deleteri sull'omeostasi surrenale portando a livelli sierici ridotti di cortisolo ai soggetti esposti (Doumouchsis et al., 2009; Jagodić et al., 2021).

- IMMUNOTOSSICITÀ

Negli ultimi 25-30 anni, almeno nove epidemie di morbillivirus hanno colpito le popolazioni di cetacei residenti in diverse aree del pianeta. In particolare, le stenelle striate sono state il principale "bersaglio" dei quattro focolai verificatisi nel Mediterraneo occidentale tra il 1990 e il 2013. Gli animali colpiti dal virus possono sviluppare immunodeficienza che a sua volta provoca una serie di infezioni secondari virali, batteriche, fungine, protozoiche e parassitarie, come ad esempio toxoplasmosi (da *Toxoplasma gondii*) e brucellosi (da *Brucella* spp.) (Di Guardo and Mazzariol, 2016).

Le epidemie si sono verificate vicino a zone costiere fortemente urbanizzate e inquinate e ci sono diversi studi significativi che evidenziano l'influenza dell'inquinamento antropogenico, come i metalli pesanti, sulla salute degli animali e sulle dinamiche della malattia (Bennett et al., 2001; Cámara Pellissó et al., 2008; Desforges et al., 2016; Di Guardo and Mazzariol, 2016; Van Bresseem et al., 2009). Inoltre, le risposte immunitarie sono energeticamente costose e il sistema immunitario è intimamente legato al sistema riproduttivo ed endocrino così che gli effetti immunitari mediati dagli inquinanti possono estendersi ad altri sistemi fisiologici con potenziali costi per il fitness e la riproduzione e, in definitiva, la crescita della popolazione (Desforges et al., 2016).

I metalli possono infatti alterare o addirittura sopprimere il sistema immunitario, tra gli elementi più immunotossici si trovano il mercurio, il cadmio e il piombo (Cámara Pellissó et al., 2008; Desforges et al., 2016).

## 1.6 BLUBBER E MELONE

Blubber e melone sono due tessuti adiposi ottenibili mediante una comune necropsia e analizzandoli si riescono a ricavare numerose informazioni utili sulle condizioni di salute dell'animale.

- BLUBBER

Il blubber è uno strato di tessuto adiposo sottocutaneo specializzato che si trova solo nei mammiferi marini, esso riveste l'intera superficie corporea ad eccezione delle pinne ed è formato da cellule adipose dette adipociti (Fig. 1.7). Si distingue dagli altri tessuti adiposi per il fatto di essere notevolmente arricchito di collagene e fibre elastiche, inoltre è altamente vascolarizzato.

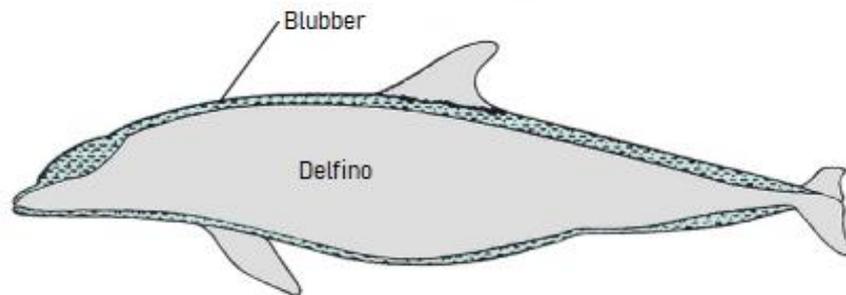


Fig.1.7 - Strato di blubber in un delfino.

Questo strato sottocutaneo è riconosciuto come il tessuto principale per l'accumulo di energia, sotto forma di lipidi, in questo gruppo di mammiferi. Inoltre, è anche la barriera termica primaria nell'ambiente acquatico, snellisce il corpo e facilita la locomozione idrodinamica, contribuisce all'equilibrio idrico e fornisce galleggiabilità (Gómez-Campos et al., 2015).

In alcuni cetacei, come nella stenella striata, il blubber è stratificato morfologicamente in strato "esterno", "intermedio" e "interno" in base alle dimensioni, alla forma e alle caratteristiche metaboliche degli adipociti, nonché al contenuto di lipidi e collagene (Fig. 1.8) (Iverson and Koopman, 2018). Questa stratificazione riflette molto probabilmente le differenze funzionali del tessuto. Lo strato esterno fornisce supporto strutturale e agisce come una barriera meccanica con un ruolo minore nell'accumulo di energia. Lo strato intermedio è responsabile della termoregolazione e lo strato interno è responsabile della mobilizzazione dell'energia, favorita dalla sua vicinanza al nucleo del corpo e da una maggiore vascolarizzazione (Gómez-Campos et al., 2015). In aggiunta, gli strati adiposi del blubber tendono ad accumularsi nel tempo, per

cui lo strato esterno sarà formato da materiale più vecchio mentre quello più interno conterrà materiale di neoformazione.

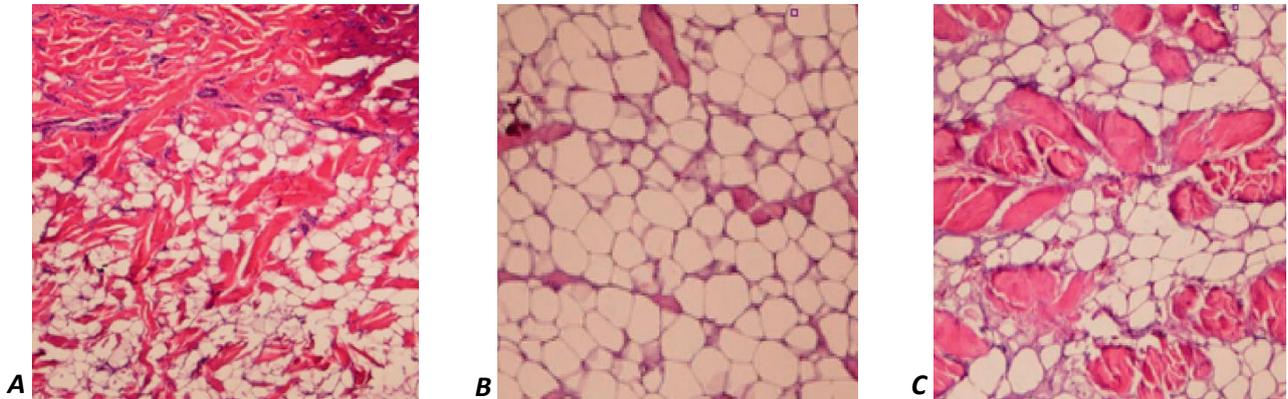


Fig. 1.8 - Composizione dei diversi strati di blubber in *Stenella coeruleoalba*.  
A: strato esterno. B: strato intermedio. C: strato interno.

I cetacei sono considerati buoni indicatori per il monitoraggio della contaminazione nell'ambiente marino grazie alla presenza di questo tessuto adiposo, infatti qui si accumulano diverse sostanze tossiche come appunto i metalli pesanti. In più, diverse caratteristiche suggeriscono che il blubber sia un tessuto appropriato per valutare i livelli di stress in questi animali (Champagne et al., 2017; Pujade Busqueta et al., 2020).

- MELONE

Il melone è una struttura lipidica situata nella fronte degli odotoceti che funziona per propagare i suoni di ecolocalizzazione nell'ambiente acquatico circostante. Gli odotoceti hanno un sistema di ecolocalizzazione altamente sviluppato e importante per la localizzazione delle prede. Questo sistema si basa sulla generazione di suoni unici grazie a un insieme di organi chiamato complesso MLDB (*monkey lips/dorsal bursae*) (Fig. 1.9).

La capacità del melone di trasmettere il suono è stata attribuita in gran parte alla sua composizione unica di acidi grassi, i cosiddetti “grassi acustici” (Harper et al., 2008). La componente lipidica è simile a quella di un tessuto adiposo, con cellule voluminose arrotondate strettamente correlate; sono due le classi lipidiche principali: triacilgliceroli ed esteri della cera. Inoltre, vi è una chiara componente muscolare (Scano et al., 2005).

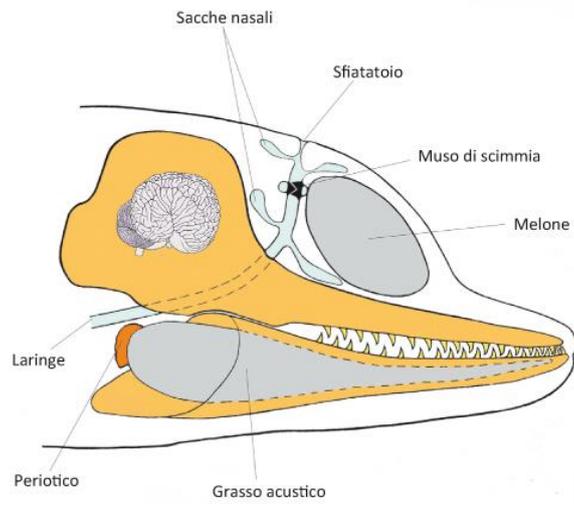


Fig. 1.9 - Strutture deputate all'emissione degli ultrasuoni nel delfino.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Il presente lavoro di tesi ha lo scopo di studiare la relazione tra gli inquinanti ambientali, come i metalli pesanti, e gli ormoni T3, T4 e cortisolo prodotti dal sistema endocrino della stenella striata (*Stenella coeruleoalba*) tramite l'analisi dei tessuti adiposi quali blubber e melone, nonché di valutare se si possano identificare stratificazioni nello spessore del blubber per questi stessi analiti.

La contaminazione ambientale è ormai diventata un problema globale e non accenna a diminuire. Sono state sviluppate diverse strategie scientifiche per valutare l'impatto degli inquinanti sugli ecosistemi marini e i relativi organismi che li popolano. Sono stati pubblicati diversi *papers* sull'accumulo dei metalli pesanti nei mammiferi marini, tuttavia la valutazione di questa relazione metalli – ormoni non è mai stata studiata in maniera approfondita e i dati con cui poter fare dei confronti sono scarsi.

Ecco perché, questo lavoro, potrebbe rivestire un ruolo di fondamentale importanza nello sviluppo di una migliore tutela e gestione dell'ambiente marino in cui vivono queste specie sensibili e nello sviluppo di un maggior controllo degli inquinanti riversati in mare.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 CAMPIONAMENTO**

Per il presente studio sono stati utilizzate 34 stenelle striate (*Stenella coeruleoalba*) spiaggiate lungo le coste della Calabria, della Campania e della Liguria, dal 2014 al 2019.

I campioni di blubber sono stati raccolti durante le necroscopie eseguite presso gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) di Vibo Valentia, Portici ed Imperia e inviati al Corso di Laurea in Acquacoltura ed Igiene delle Produzioni Ittiche dell'Università di Bologna, sede di Cesenatico. Nel dettaglio una sezione di blubber e melone è stata prelevata a partire dalla cute fino al centro del melone stesso (Fig. 3.1), e conservata a -20° C fino al momento delle analisi.

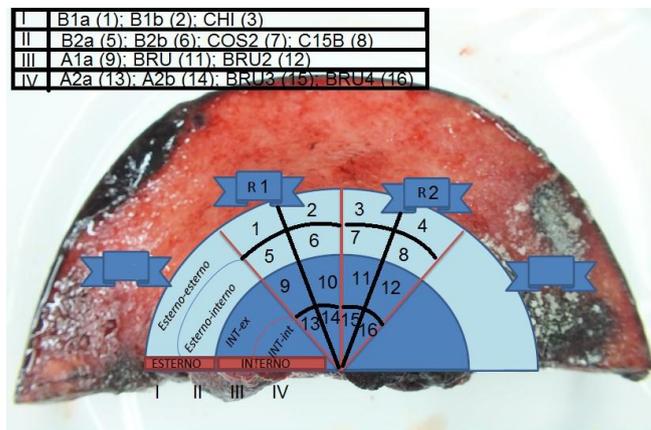


Fig. 3.1 - Sezione di blubber e melone.

Agli IZS è stato poi chiesto anche l'invio di tutti i dati relativi agli animali (luogo di ritrovamento, sesso, dimensione, stato di conservazione) e alle analisi (tossicologiche, batteriologiche, parassitologiche e virologiche) da loro effettuate sugli stessi animali. Tali dati sono poi stati utilizzati nell'analisi statistica per la valutazione di eventuali correlazioni con i risultati ottenuti nella presente ricerca.

Al momento delle analisi, da ogni sezione sono stati presi, in maniera speculare, 4 campioni a profondità diverse nello strato lipidico, su cui analizzare i metalli pesanti e gli ormoni (fig. 3.1). Questi quattro campioni sono stati nominati da A, B, C e D, dove A sta per la parte prossimale vicino alla pelle mentre D è la parte più distale dalla pelle situata nel melone, ottenendo così tre parti di blubber e una di melone.

## 3.2 ANALISI DEI CAMPIONI IN LABORATORIO

Per i campioni dei metalli pesanti si sono utilizzate porzioni di tessuto del peso di 0.4 g circa mentre per gli ormoni di 0.8 g circa.

- **METALLI**

### DIGESTIONE ACIDA IN MICROONDE

I campioni di tessuto sono stati messi in appositi contenitori chiamati *teflon bombs* insieme a 6 ml di acido nitrico ( $\text{HNO}_3$ ) e 3 ml di perossido di idrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Successivamente sono stati mineralizzati a caldo in un sistema chiuso a microonde per 45 minuti.

La procedura prevede la digestione e la mineralizzazione completa del materiale organico grazie alla miscela dei due acidi forti. L'uso del forno a microonde, tramite la combinazione di alte temperature e alte pressioni, permette di diminuire i tempi di trattamento, mantenendo una resa molto buona. Inoltre, le "bombe" sono costituite da materiale inerte e quindi privo di problemi di contaminazione e di adsorbimento.

Una volta terminata la mineralizzazione in microonde, i campioni digeriti sono stati trasferiti nelle provette Falcon e diluiti con acqua distillata ultrapura fino al volume finale di 45 ml.

### ANALISI ICP – OES

La spettroscopia di emissione al plasma (ICP-OES) è una tecnica di analisi qualitativa e quantitativa utilizzata per determinare i metalli presenti in un campione allo stato liquido.

Il campione precedentemente mineralizzato viene inserito all'interno di uno strumento apposito dove viene convertito in un aerosol di goccioline tramite un processo di nebulizzazione. L'aerosol viene quindi trasportato al plasma dove gli atomi e gli ioni subiscono un processo di eccitazione seguito dall'emissione di radiazioni caratteristiche. La radiazione viene rilevata e convertita in un segnale elettrico che viene utilizzato per risalire al tipo di analita che ha emesso tale onda e dopo la costruzione di un'opportuna curva di taratura si ottiene anche la sua concentrazione.

Tramite queste analisi sono stati rilevati i seguenti elementi traccia: As, Cu, Cd, Pb, Se e Hg; i risultati sono stati espressi come mg/kg peso fresco (p.f.).

- **ORMONI**

Ai fini dell'analisi degli ormoni si è proceduto innanzitutto all'estrazione delle aliquote da 0.8 g, che sono state omogenizzate con 2 ml di etanolo, poi mantenute in agitazione per 4 ore a 100 rpm per consentire l'estrazione degli ormoni dal blubber. I campioni sono poi stati centrifugati a 4 °C per 30 minuti a 4000 g e il surnatante ottenuto è stato portato a secco. Gli estratti sono stati conservati a -20 °C fino al momento delle analisi, effettuate con metodica ELISA. Al momento delle analisi, i campioni sono stati portati a temperatura ambiente e ripresi con 0.2 ml di etanolo al 5%.

#### T4: PRINCIPIO DEL TEST

Il test T4 Total ELISA (kit DRG) è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato, basato sul principio del legame competitivo. I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo monoclonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola T4.

Il T4 endogeno di un campione compete con il T4 coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzetto. Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta della soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (OD) del prodotto giallo risultante (Fig. 10).

L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita nel campione. Viene costruita una curva standard tracciando i valori di OD rispetto alle concentrazioni di standard, le concentrazioni dei campioni sconosciuti vengono determinate usando appunto questa curva.

#### T3: PRINCIPIO DEL TEST

Il Total T3 ELISA (kit DGR) è un test di immunoassorbimento enzimatico in fase solida, basato sul principio del legame competitivo. I pozzetti della microtitolazione sono rivestiti con un anticorpo policlonale capra-anti-topo. Gli standard, i controlli e il campione da analizzare vengono incubati insieme al reagente di analisi contenente anticorpi monoclonali anti-T3. Nella successiva incubazione con il coniugato, la T3 endogena di un campione compete con il coniugato T3-perossidasi di rafano per un numero limitato di siti di legame insolubilizzati. Dopo l'incubazione il coniugato non legato viene lavato via. La quantità di coniugato di perossidasi legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di T3 nel campione. Dopo

l'aggiunta della soluzione substrato, l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di T3 nel campione.

### CORTISOLO: PRINCIPIO DEL TEST

Il cortisolo (antigene) presente nel campione compete con il cortisolo antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-cortisolo adsorbito su micropiastra (fase solida). Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata catalizza la reazione tra il substrato ( $H_2O_2$ ) e il TMB-substrato, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution ( $H_2SO_4$ ) (Figg. 3.2 e 3.3).

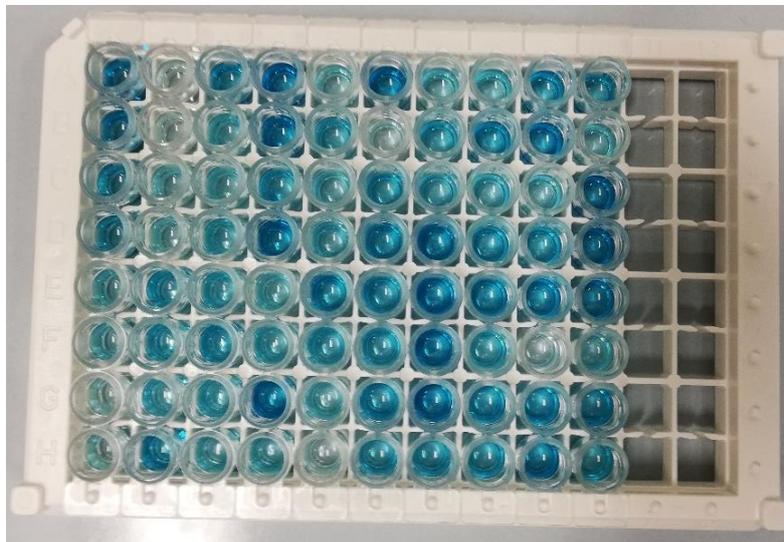


Fig. 3.2 - Micropiastra con aggiunta del substrato.

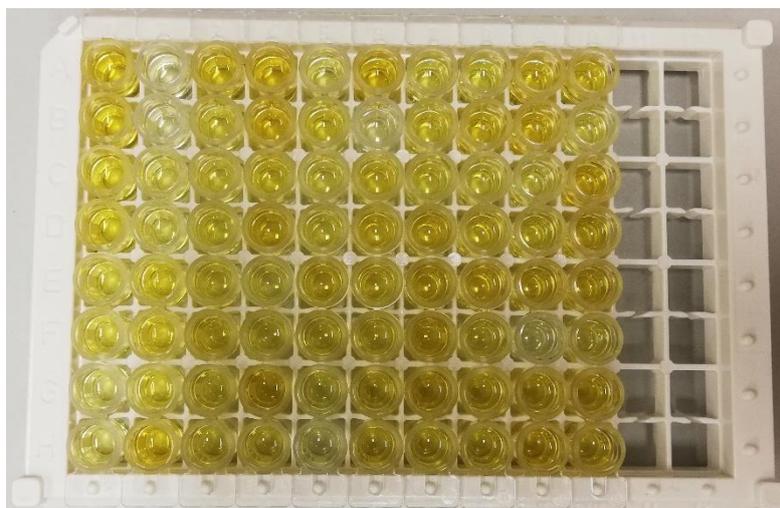


Fig. 3.3 - Micropiastra dopo l'arresto della reazione colorimetrica.

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del cortisolo presente nel campione. La concentrazione di cortisolo nel campione viene calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

### 3.3 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software R.

I dati sono stati testati per la normalità utilizzando Shapiro-Wilk e poiché nessuno si distribuiva normalmente, si è applicata la trasformazione per ranghi e una statistica non parametrica.

L'analisi statistica è stata effettuata per: 1) valutare differenze tra aree di provenienza dei campioni; 2) identificare ogni eventuale correlazione tra i parametri analitici considerati; 3) evidenziare differenze e correlazioni tra le patologie rilevate negli esemplari spiaggiati e parametri analitici considerati (es. positività al Morbillivirus e livelli di metalli e/o ormoni).

Nel dettaglio le analisi effettuate sono state:

1) Analisi delle componenti principali (PCA) includendo tutte le variabili analitiche, rimuovendo dal database i dati mancanti. Le variabili sono state ridimensionate per avere una varianza unitaria prima dell'analisi e sono state spostate per essere centrate sullo zero.

2) Analisi della correlazione con test di Spearman e creazione di un correlogramma riportante tutte le correlazioni (negative o positive) tra le variabili considerate. Graficamente, le correlazioni positive vengono riportate con cerchi di colore azzurro e quelle negative con cerchi rossi, la cui intensità di colore è tanto più alta quanto maggiore è il grado di correlazione. L'uso di un test non parametrico ha permesso di identificare anche correlazioni non lineari, altamente probabili vista la distribuzione dei dati e in considerazione del fatto che si stanno valutando parametri fisiologici che possono anche non rispondere in modo lineare.

3) Analisi di associazione tra le patologie osservate e i livelli di metalli ed ormoni con test di Mann e Whitney non parametrico a campioni non appaiati e a due code, considerando come variabile di raggruppamento la negatività o positività ad una specifica patologia. I risultati di questi confronti sono riportati, solo se significativi, in forma grafica, con la produzione di boxplots riportanti il numero di campioni per raggruppamento, la mediana, il valore del primo e terzo quartile e l'intervallo di confidenza al 95%. Nel titolo del grafico, infine, è riportato il valore del p.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONI

La tabella 1 riassume le caratteristiche della subpopolazione campionaria utilizzata, in termini di provenienza, sesso, dimensione e stato di conservazione della carcassa. Per un esemplare calabrese non erano noti sesso e dimensione, ma le condizioni della carcassa (4) rendevano impossibile raccogliere il dato.

Si ricorda che secondo la classificazione internazionale, le carcasse vengono classificate in categorie in base allo stato di conservazione. La qualità dei campioni raccolti diminuisce con la progressione del codice della condizione, creando maggiore incertezza sui risultati.

- Categoria 1 – animale vivo.
- Categoria 2 – carcassa fresca. Meno di 24 ore dalla morte.
- Categoria 3 – carcassa in moderata decomposizione.
- Categoria 4 – carcassa in avanzato stato di decomposizione.
- Categoria 5 – carcassa mummificata o resti dello scheletro.

**Tabella 1** – Caratterizzazione della coorte campionaria.

Provenienza	N. individui	Sesso		Dimensioni (cm)	Stato di conservazione			
		M	F		1	2	3	4
Calabria	16	9	6	146.47 ± 44.50	1	10	4	1
Campania	3	3	/	153.67 ± 53.05			2	1
Liguria	15	7	8	180.37 ± 26.63		9	4	2
Totale	34	19	14	162.53 ± 40.37	1	19	10	4

Come già accennato, l'analisi della distribuzione delle risultanze analitiche (metalli ed ormoni) ha evidenziato come non vi sia una distribuzione normale dei dati, rilievo per altro anche testimoniato dai valori elevati della deviazione standard di moltissimi parametri.

L'analisi della PCA (Fig. 4.1) non ha evidenziato differenze significative o degne di nota tra le tre aree di campionamento considerate (Liguria, Campania e Calabria), per cui la coorte campionaria può essere considerata come un unico gruppo. Le componenti considerate (2), spiegano circa il 50% della variabilità e quindi, pur presentando i dati una notevole variabilità, si può ritenere che la decisione di raggruppare tutti gli animali in un'unica popolazione (dal punto di vista tossicologico ed endocrinologico) sia corretta. Questo rilievo non è così

sorprendente se si considerano anche le caratteristiche e del Mar Mediterraneo e, soprattutto, della specie presa in considerazione. Il bacino considerato è infatti un mare semi-chiuso, il che comporta una contaminazione diffusa e piuttosto uniforme dell'intera area, pur con aree di hot-spot per specifici contaminanti (Fig. 4.2).

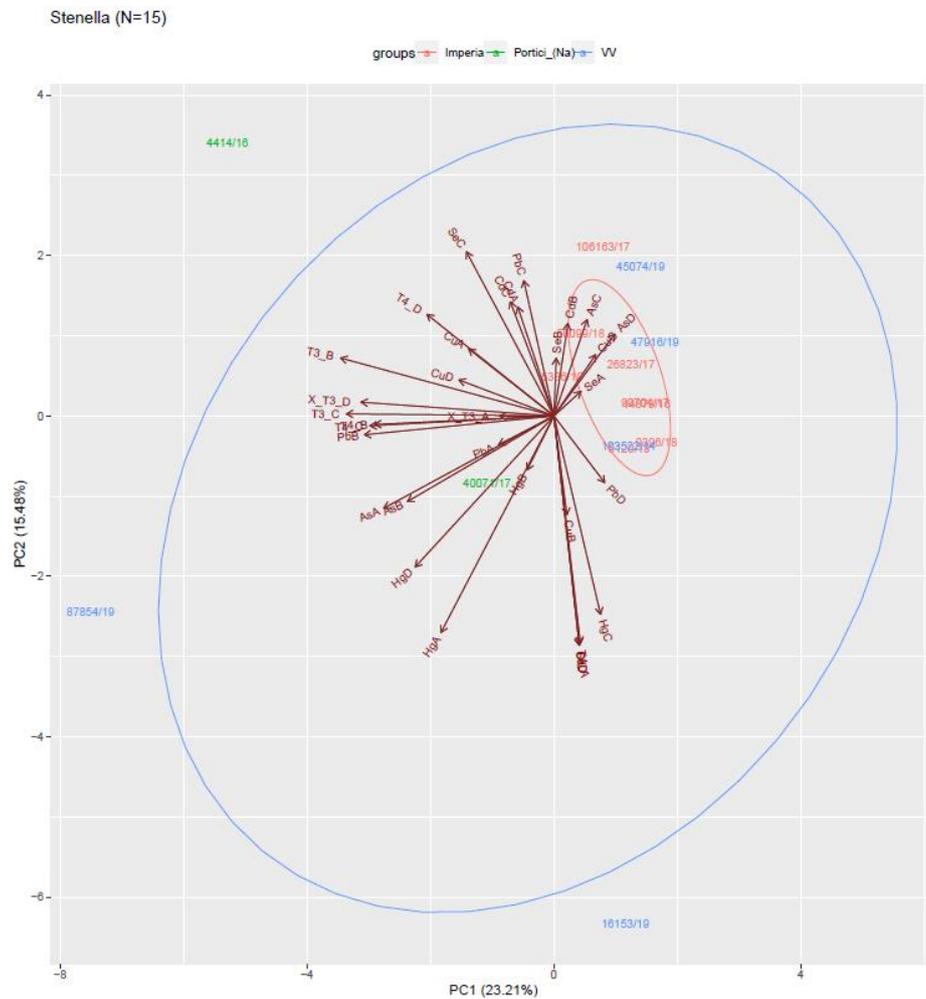


Fig. 4.1 - PCA

I colori rappresentano le tre aree di provenienza degli animali studiati: in rosso gli animali della Liguria, in verde la Campania e in blu la Calabria.

Inoltre, la stenella è meno legata ad ambienti costieri rispetto al tursiope, ed è quindi molto più mobile nel bacino considerato. Questo può portare gli animali ad entrare in contatto con varie fonti di esposizione a metalli in aree diverse, e quindi può aver portato ad una certa uniformità nei livelli di contaminanti tessutali. Per quanto riguarda gli ormoni invece, il loro ruolo fisiologico ed il fatto che tutti gli esemplari studiati siano stati ritrovati in buone condizioni di conservazione possono essere la spiegazione più plausibile per questa mancanza di differenze tra subpopolazioni.

Infine, non sono state evidenziate differenze in funzione del sesso per nessuno dei parametri considerati, quindi anche per questa variabile la coorte campionaria è stata considerata omogenea.

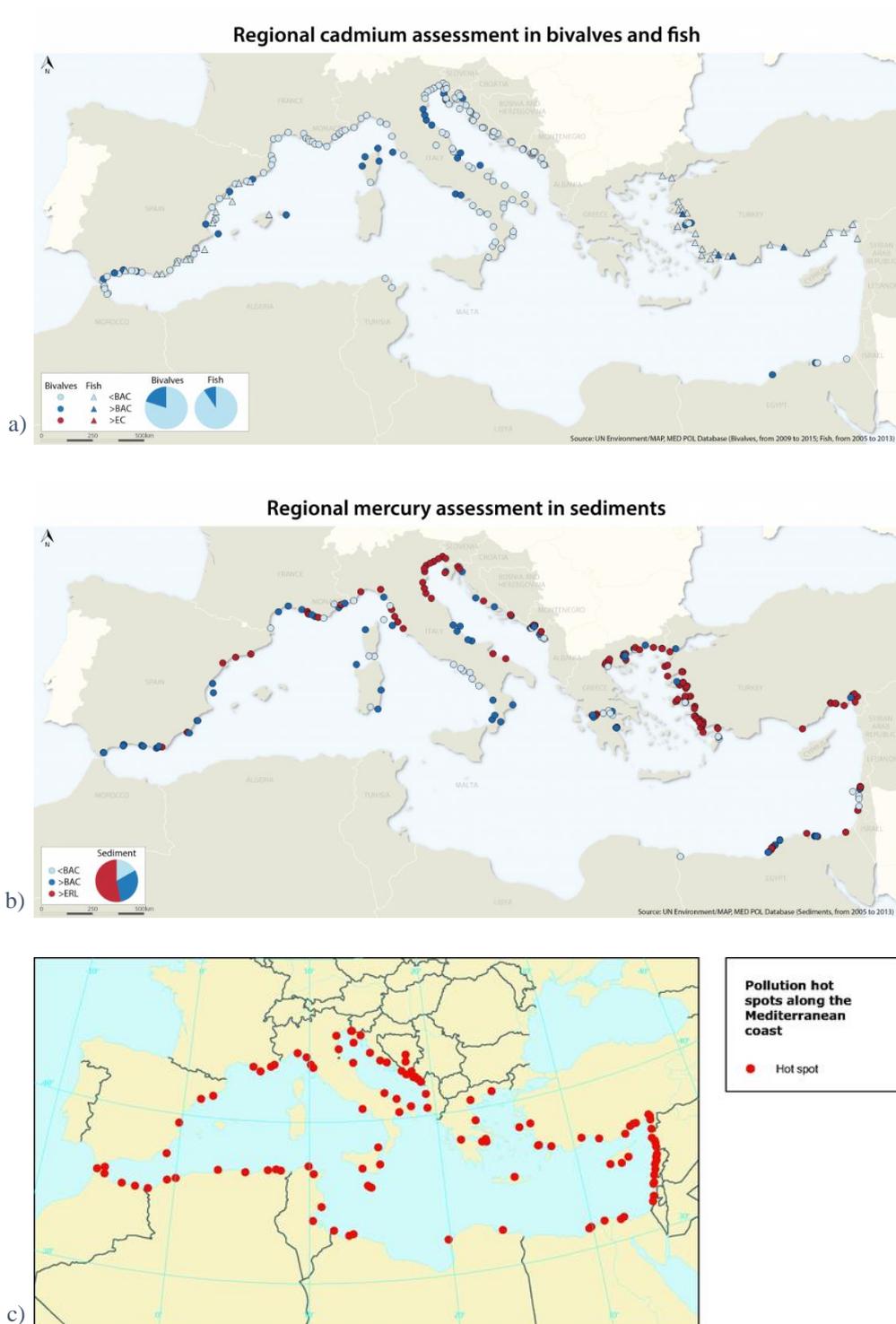


Fig. 4.2 - Distribuzione e intensità della contaminazione da Cd e Hg (a, b) e identificazione di hot spot di contaminazione in Mar mediterraneo (c).

## 4.1 ORMONI

La tabella 2 riporta le statistiche descrittive (numero di individui, media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo) delle concentrazioni di cortisolo, T3, T4 (sempre in ng/g p.f.) nei diversi strati di blubber e nel melone.

**Tabella 2** – Concentrazioni degli ormoni (ng/g) negli organi considerati. Vengono riportati il numero di campioni analizzati, media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo.

		CORTISOLO (ng/g)	T4 (ng/g)	T3 (ng/g)
A	n. campioni	33	32	32
	media $\pm$ d.s.	8.52 $\pm$ 16.48	5.28 $\pm$ 18.52	0.06 $\pm$ 0.05
	mediana	0.932	0.950	0.048
	minimo-massimo	0-73.69	0-105.35	0-0.24
B	n. campioni	34	34	34
	media $\pm$ d.s.	7.64 $\pm$ 19.61	1.38 $\pm$ 1.50	0.07 $\pm$ 0.06
	mediana	1.045	0.842	0.056
	minimo-massimo	0-99.34	0.194-6.77	0-0.28
C	n. campioni	34	34	34
	media $\pm$ d.s.	7.44 $\pm$ 14.64	1.71 $\pm$ 2.09	0.06 $\pm$ 0.05
	mediana	2.479	0.776	0.047
	minimo-massimo	0-72.97	0-8.8	0-0.20
D	n. campioni	34	33	34
	media $\pm$ d.s.	7.25 $\pm$ 16.69	2.62 $\pm$ 3.15	0.10 $\pm$ 0.09
	mediana	2.323	1.548	0.068
	minimo-massimo	0-97.23	0.073-14.11	0-0.37

- **ORMONI TIROIDEI**

Da quanto reperibile nella bibliografia esistente, sono davvero pochissimi i lavori che riportano le concentrazioni degli ormoni tiroidei nei tessuti, e nessuno nel blubber. L'unico confronto che si può fare è con il lavoro di Zaccaroni et al. (2008), che riporta le concentrazioni di triiodotironina in rene, muscolo, fegato e blubber di varie specie di cetaceo. Nello stesso lavoro, viene riportato come solo in una minima percentuale di campioni presentava concentrazioni superiori al limite di rilevabilità del metodo utilizzato. In ogni caso, se ci focalizza sulle concentrazioni riportate dagli autori, i livelli medi di T3 nel blubber sono simili a quanto rilevato in questo studio.

È interessante notare come, nonostante a livello tissutale l'ormone attivo sia il T3, le concentrazioni più elevate si riscontrano per il T4. Si può ipotizzare che data la ridotta attività metabolica del blubber, che viene a costituire una barriera isolante nei confronti dell'ambiente esterno e ad essere mobilizzato solo in situazioni di defedamento o quando è necessario produrre calore, a livello di questo tessuto il T4 circolante venga assorbito ed accumulato, e trasformato in T3, metabolicamente attivo, solo in caso di necessità. Gli ormoni tiroidei sono infatti coinvolti nella generazione di calore (Fig. 4.3) in condizioni di freddo improvviso (termogenesi adattativa) e nel mantenimento della fisiologica temperatura corporea (termogenesi attivata).

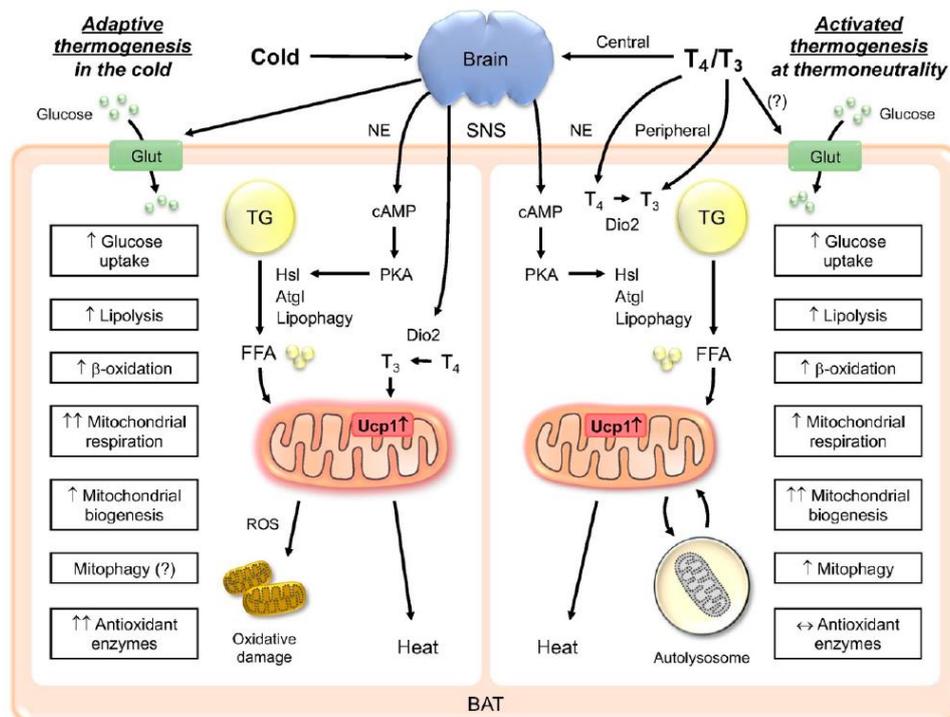


Fig. 4.3 - Meccanismi attivati dagli ormoni tiroidei nella termogenesi adattativa e attivata.

In particolare, i tiroidei vanno ad agire sul grasso bruno, che non ha alcun ruolo di riserva energetica e viene utilizzato esclusivamente per la generazione di calore (Yau and Yen, 2020). Hashimoto et al. (2015) hanno dimostrato la presenza di uno strato di questa tipologia di grasso (Fig. 4.4) nel tursiope; tale strato è stato identificato nella porzione più interna del blubber, e viene ad avvolgere tutto il corpo dell'animale.

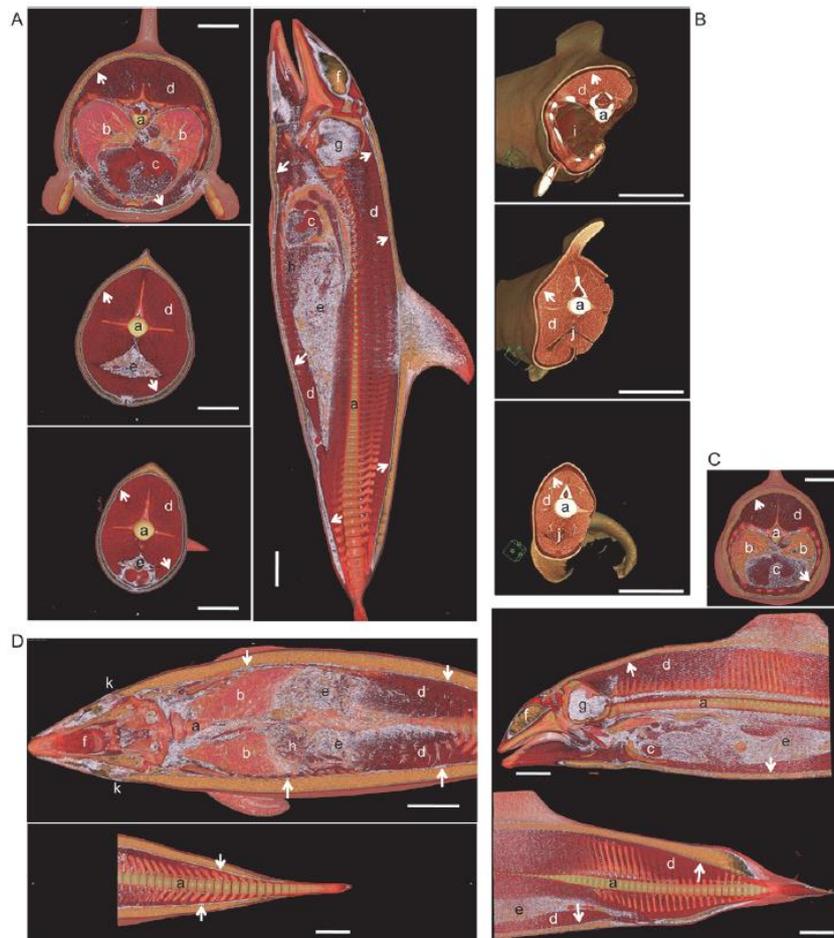


Fig. 4.4 - Distribuzione del grasso bruno nel blubber di cetacei (A: lagenorinco; B: tursiope; C: focena di Dall; D: focena comune). Le frecce indicano lo strato di grasso bruno.

Nel presente studio, i livelli più elevati di questi ormoni si osservano nello strato più esterno (vicino alla pelle) e nella porzione più interna del blubber per il T4, mentre il T3 è distribuito in maniera omogenea in tutto lo spesso del tessuto. È invece interessante notare come il melone presenti i livelli più elevati in assoluto di entrambi gli ormoni. Il dato, pur non avendo, come già detto, riscontri bibliografici di riferimento, potrebbe essere interpretato con i differenti ruoli e composizione di questo organo rispetto al blubber e con le modalità con cui questo ultimo viene modificato durante l'ecolocalizzazione: la presenza di livelli maggiori di ormoni

termogenici potrebbe facilitare la modificazione della densità dell'organo modificando, con leggeri incrementi di temperatura, la fluidità dei lipidi.

- CORTISOLO

I livelli di cortisolo evidenziati nei tre strati del blubber e nel melone sono comparabili tra loro; da sottolineare anche come la deviazione standard sia estremamente elevata, sempre pari a più del doppio rispetto alla media. Questa variabilità può essere spiegata con le condizioni che hanno portato l'animale a morte (malattia, ferite, etc.), che potrebbero in alcuni casi aver determinato una situazione stressante cronica o subcronica, responsabile di un incremento nei livelli di cortisolo.

Gli studi svolti sul cortisolo nel blubber sono relativamente numerosi, ma pochi riguardano *S. coeruleoalba*. La stenella è un cetaceo di acque profonde, difficile da catturare e impossibile da tenere in cattività perché si stressa facilmente e non sopravvive. Non ci sono quindi studi disponibili relativi a livelli para-basali (presi in condizioni controllate o da biopsie) di cortisolo nel blubber, ma solo dati derivanti da esemplari spiaggiati, analogamente a quanto fatto nel presente studio. Più numerosi sono invece gli studi effettuati nel tursiope, che può essere quindi preso come specie di riferimento.

Uno studio condotto su tursiopi mantenuti in ambiente controllato mostra livelli di cortisolo assai più bassi ( $1.40 \pm 0.56$  ng/g) rispetto a quanto rilevato nel presente studio. Bisogna però considerare che gli animali studiati erano innanzitutto vivi, e poi addestrati per il prelievo volontario di campioni, incluse le biopsie (Champagne et al., 2017; Champagne et al., 2018). È quindi presumibile che questi esemplari avessero un livello di stress estremamente ridotto, che giustifica i livelli nettamente più bassi di ormone.

Questa considerazione è avvalorata anche dallo studio di Kellar et al. (2015) sul delfino comune (*Delphinus delphis*), che riporta livelli leggermente più bassi ( $4.0 \pm 2.2$  ng/g) di cortisolo rispetto a quanto ottenuto in questo studio, ma osserva differenze significative nelle concentrazioni tra animali trovati spiaggiati e soggetti recuperati morti a seguito di by-catch. Anche in questo caso, il tipo di stress cui sono andati incontro i due gruppi di animali è profondamente diverso e comporta un livello di accumulo nel blubber differenziato: gli esemplari recuperati a seguito di spiaggiamento vanno in genere incontro a stress cronico, che

comporta passaggio di livelli elevati nel tessuto, mentre quelli derivanti da by-catch vanno incontro a stress iperacuto, con morte molto rapida, che non permette questo accumulo.

Infine, questo effetto dello spiaggiamento è stato osservato anche in megattere (*Megaptera novaeangliae*) campionate in Australia: gli esemplari spiaggiati mostravano livelli molto simili ( $7.01 \pm 10.50$  ng/g) a quelli osservati in questa ricerca, mentre i livelli osservati in biopsie da animali vivi erano nettamente più bassi ( $0.51 \pm 0.15$  ng/g) (Mingramm et al., 2020).

Sulla base di quanto riportato quindi, nonostante i pochi studi disponibili con cui fare una comparazione, le concentrazioni osservate nel blubber di stenella sono da ritenere realistici e coerenti con uno stato di stress cronico. Le differenze osservate con i lavori che trovano valori più bassi sono spiegabili con il fatto che gli animali di questa ricerca sono delfini spiaggiati e spesso malati e quindi sottoposti a forti stress prolungati, mentre la maggior parte degli studi in bibliografia usa animali vivi e liberi quindi meno stressati.

## 4.2 METALLI

La tabella 3 riporta le statistiche descrittive (numero di individui, media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo) delle concentrazioni di piombo, mercurio arsenico, cadmio, rame e selenio (mg/kg p.f.) nei campioni analizzati, ed include i dati ottenuti dagli IZS e del presente studio. Come evidente dalla tabella, il numero di campioni di blubber analizzati è inferiore a quello utilizzato nella parte di endocrinologia. Questo perché purtroppo vi è stata una rottura dello strumento utilizzato, che non ha consentito di completare l'analisi dell'intero set di campioni.

Quando possibile confrontare i livelli di metalli negli organi interni con il blubber e il melone, si può immediatamente notare come tutti gli elementi tranne il piombo presentino concentrazioni più elevate nei tessuti più magri (fegato, muscolo e rene). Questo è in accordo con le caratteristiche farmacocinetiche dei metalli considerati, che tendono ad essere poco liposolubili, se non in forma organica (es. metilmercurio), e ad andare incontro a meccanismi di bioaccumulo proteino-dipendenti; essendo melone e blubber poveri di fibre, risultano un organo di accumulo marginale per i metalli (Honda et al., 1982). In quest'ottica è invece non atteso il fatto che il piombo presenti in blubber e melone concentrazioni comparabili, se non superiori, a quelle osservate negli altri organi, e che il mercurio sia presente nei tessuti grassi a concentrazioni circa un decimo di quelle osservate nei tessuti più magri: considerando infatti che la maggior parte del mercurio presente negli organismi marini è in forma organica, e quindi più liposolubile, ci si poteva attendere di reperire livelli più elevati (Fig. 4.5).

**Tabella 3** – Concentrazioni dei metalli (mg/kg p.f.) negli organi considerati. Vengono riportati: n. di campioni, media, deviazione standard, mediana, minimo e massimo.

		Metalli (mg/kg p.f.)					
		Pb	Hg	As	Cd	Cu	Se
Fegato	n. campioni	29	16	14	30		
	media $\pm$ d.s.	0.10 $\pm$ 0.14	5.34 $\pm$ 3.92	1.12 $\pm$ 0.84	1.44 $\pm$ 1.39		
	mediana	0.045	4.730	1.275	1.16		
	minimo-massimo	0-0.57	0.93-15.32	0-2.62	0-5.82		
Muscoli	n. campioni	29	17	15	30		
	media $\pm$ d.s.	0.13 $\pm$ 0.26	1.79 $\pm$ 1.16	0.42 $\pm$ 0.34	0.29 $\pm$ 1.10		
	mediana	0.021	1.270	0.410	0.027		
	minimo-massimo	0-1.24	0.123-3.75	0-132	0-5.82		
Rene	n. campioni	24	16	14	22		
	media $\pm$ d.s.	0.25 $\pm$ 0.55	5.17 $\pm$ 10.19	0.82 $\pm$ 0.69	5.60 $\pm$ 9.11		
	mediana	0.091	2.485	0.754	3.185		
	minimo-massimo	0-2.73	0.2-42.70	0-2.34	0-40		
Blubber A	n. campioni	17	17	17	17	17	17
	media $\pm$ d.s.	0.71 $\pm$ 1.08	0.47 $\pm$ 0.54	0.29 $\pm$ 0.55	0.09 $\pm$ 0.37	0.04 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.76
	mediana	0.203	0.261	0.108	0.001	0.021	0.019
	minimo-massimo	0.022-4	0.02-1.63	0.02-2.26	0.0004-1.55	0.013-0.16	0.0126-2.87
Blubber B	n. campioni	17	17	17	17	17	17
	media $\pm$ d.s.	0.21 $\pm$ 0.21	0.27 $\pm$ 0.34	0.32 $\pm$ 0.71	0.01 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.03

	mediana	0.124	0.147	0.061	0.002	0.021	0.025
	minimo-massimo	0.017-0.82	0.03-1.41	0.005-2.84	0.0001-0.09	0.007-0.08	0.011-0.15
Blubber C	n. campioni	17	17	17	17	17	17
	media $\pm$ d.s.	0.85 $\pm$ 1.37	0.70 $\pm$ 1.23	0.98 $\pm$ 2.55	0.01 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.02
	mediana	0.197	0.139	0.066	0.002	0.019	0.017
	minimo-massimo	0.049-4.33	0.011-4.41	0.0004-9.69	0-0.04	0.015-0.07	0.013-0.11
Melone	n. campioni	17	17	17	17	17	17
	media $\pm$ d.s.	0.3 $\pm$ 0.32	0.61 $\pm$ 0.83	0.32 $\pm$ 0.54	0.39 $\pm$ 1.56	0.03 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 1.99
	mediana	0.229	0.257	0.060	0.001	0.026	0.020
	minimo-massimo	0.01-1.07	0.009-3.15	0.01-1.79	0.0003-6.46	0.0123-0.08	0.008-8.22

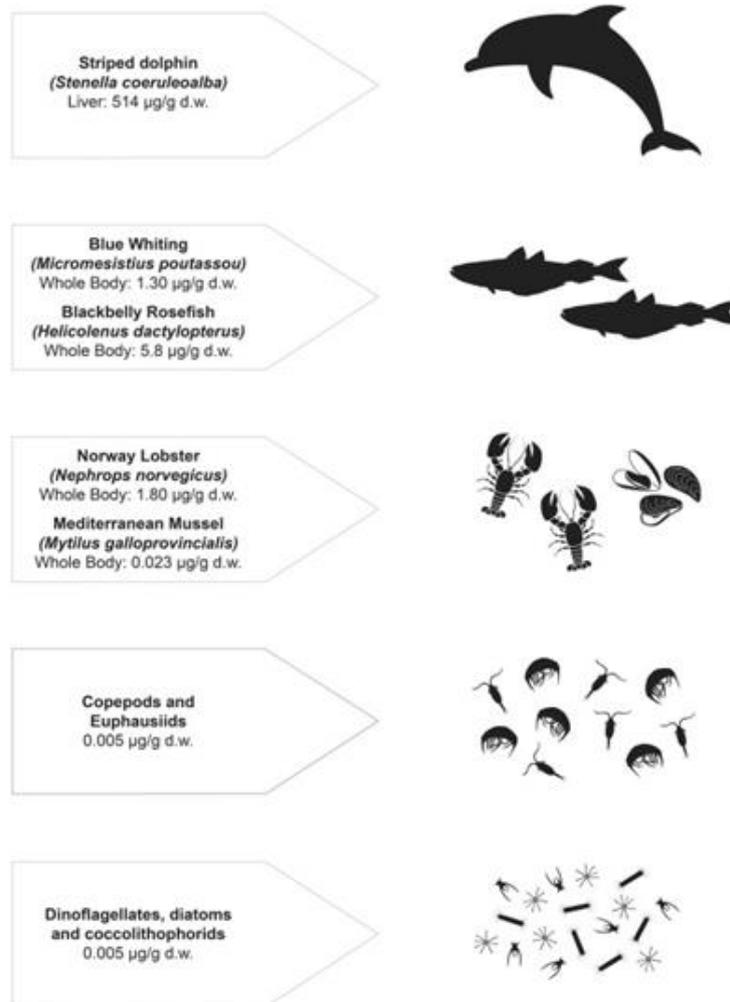


Fig. 4.5 - Biomagnificazione del mercurio lungo una catena trofica di stenella.

- **PIOMBO**

Per quanto riguarda il piombo, i livelli riscontrati nei vari tessuti sono da ritenere bassi e non sollevano particolari preoccupazioni per la salute degli animali, poiché molto al di sotto delle soglie definite per gli effetti subclinici e di tossicità, e pari a 2.5 mg/kg e 3.6 mg/kg rispettivamente (Jakimska et al., 2011; Shlosberg et al., 1997). Questi bassi livelli sono dovuti principalmente al ridotto assorbimento del metallo da parte dell'organismo (Chen et al., 2017). Quando si osservano le concentrazioni a livello di blubber (da A a C) si può notare come i livelli più elevati si riscontrino nello strato più profondo e quindi più vicino alla circolazione ematica. Tale strato è quello che maggiormente viene rimodellato (tramite lipolisi) e che più risente delle variazioni sistemiche nei livelli di contaminanti. Il riscontro, quindi non è così sorprendente.

Degno di nota è invece il fatto che il melone presenti, almeno nel campione considerato in questo studio, concentrazioni comparabili con quelle degli organi interni.

In uno studio su stenelle della Puglia, (Cardellicchio et al., 2002b) riportano livelli epatici di piombo comparabili con quanto osservato nel presente studio, mentre i livelli riportati nello studio di Cardellicchio et al. (2000) nella stessa area sono decisamente più elevati nel fegato, ma di nuovo comparabili negli altri organi (Cardellicchio et al., 2000; Cardellicchio et al., 2002b).

- **MERCURIO**

Fegato e rene sono gli organi che presentano le concentrazioni maggiori di mercurio, mentre i vari strati del blubber e il melone mostrano concentrazioni comparabili. Nuovamente, melone e strato C del blubber presentano i livelli più elevati di Hg, e anche in questo caso si possono applicare le stesse considerazioni fatte per il piombo. Le alte concentrazioni riscontrate nel fegato sono in accordo con quanto riportato in bibliografia, e che identifica tale organo come il target di accumulo per il metallo (Capelli et al., 2008; Cardellicchio et al., 2002a; Esposito et al., 2020; Martínez-López et al., 2019; Roditi-Elasar et al., 2003). Bellante et al. (2012b) riportano, per stenelle spiaggiate lungo le coste italiane, concentrazioni epatiche variabili tra 2 e 438 mg/kg p.f., che risultavano molto maggiori a quanto riscontrato in rene e muscolo degli stessi animali. I livelli elevati riscontrati in alcuni studi possono essere spiegati con il fatto che i cetacei hanno ridotta capacità di metabolizzazione ed escrezione del mercurio, che viene inattivato sequestrandolo negli organi sotto forma di complessi con il selenio (Kershaw and Hall, 2019).

Tuttavia, le concentrazioni di Hg in questo studio sembrano essere più basse rispetto a lavori precedenti più datati (Cardellicchio et al., 2000) e in accordo con diversi recenti lavori (Esposito et al., 2020; Martínez-López et al., 2019). Questo fatto potrebbe confermare quanto già sottolineato da alcuni autori (Borrell et al., 2014), ovvero che il livello di contaminazione da Hg nel Mediterraneo sia diminuito. Da sottolineare che nel lavoro di Cardellicchio et al. (2000) tutti gli organi considerati presentano concentrazioni fino a 40 volte più elevate rispetto a quanto riportato in questo studio, e sembrano indicare una esposizione acuta al metallo dei 6 esemplari analizzati dagli autori.

- ARSENICO

L'arsenico presenta livelli maggiori nel fegato, seguito dallo strato più profondo (C) del blubber, dal rene, dal muscolo, dal melone e infine dagli strati A e B del blubber.

Le concentrazioni di As rilevate risultano più basse rispetto allo studio condotto da Bellante et al. (2012a) e sono simili a quelle riportate da Martínez-Lopez et al. (2019). Tuttavia, i dati disponibili sull'arsenico sono estremamente limitati per cui è difficile poter fare dei confronti, ecco perché questo studio potrebbe essere utile per costruire un nuovo data set su questo metallo tossico ancora poco studiato nei cetacei.

- CADMIO

Il cadmio è il metallo maggiormente presente negli organi interni, dopo il mercurio. Come atteso in base alla cinetica del metallo, i livelli più elevati vengono riscontrati nel rene (Cardellicchio et al., 2000; Esposito et al., 2020; Martínez-López et al., 2019; Roditi-Elasar et al., 2003) a riconferma del fatto che l'organo è il sito principale di accumulo di Cd in quanto ricco di metallotioneine che sequestrano il metallo tossico (Das et al., 2002; Klaassen et al., 2009). Comunque, i risultati del Cd in questo studio risultano più elevati rispetto ai dati riportati per esemplari analizzati in Spagna (Martínez-López et al., 2019) mentre sono più bassi di quelli di Israele (Roditi-Elasar et al., 2003), di Taiwan (Liu et al., 2015) e del Portogallo (Monteiro et al., 2020).

Dall'analisi della bibliografia appare evidente che le quantità di cadmio variano a seconda dell'area geografica considerata; si ritiene che la dieta dei delfini nelle diverse regioni sia la principale ragione di queste differenze (Bustamante et al., 1998; Bustamante et al., 2008; Dorneles et al., 2007). I cefalopodi sono infatti forti accumulatori di cadmio per eccellenza; dove le concentrazioni di questo metallo sono minori, i delfini potrebbero quindi nutrirsi principalmente di pesci (Liu et al., 2015; Martínez-López et al., 2019).

- RAME E SELENIO

I due metalli essenziali rame e selenio sono stati analizzati solo nei tre strati del blubber e nel melone. Mentre il rame ha una distribuzione uniforme nello spessore del blubber e nel melone, il selenio presenta le concentrazioni più elevate nello strato più superficiale del blubber (A) e nel melone. Questi livelli sono minori rispetto a quanto riportato da Cardellicchio et al. (2002a, 2000), che per altro sono gli unici ad aver analizzato questi metalli in blubber e melone.

### 4.3 ORMONI E METALLI

I risultati relativi alla valutazione delle correlazioni tra parametri endocrinologici e metalli negli organi interni, negli strati del blubber e nel melone sono riportati nel correlogramma in figura (Fig. 4.6).

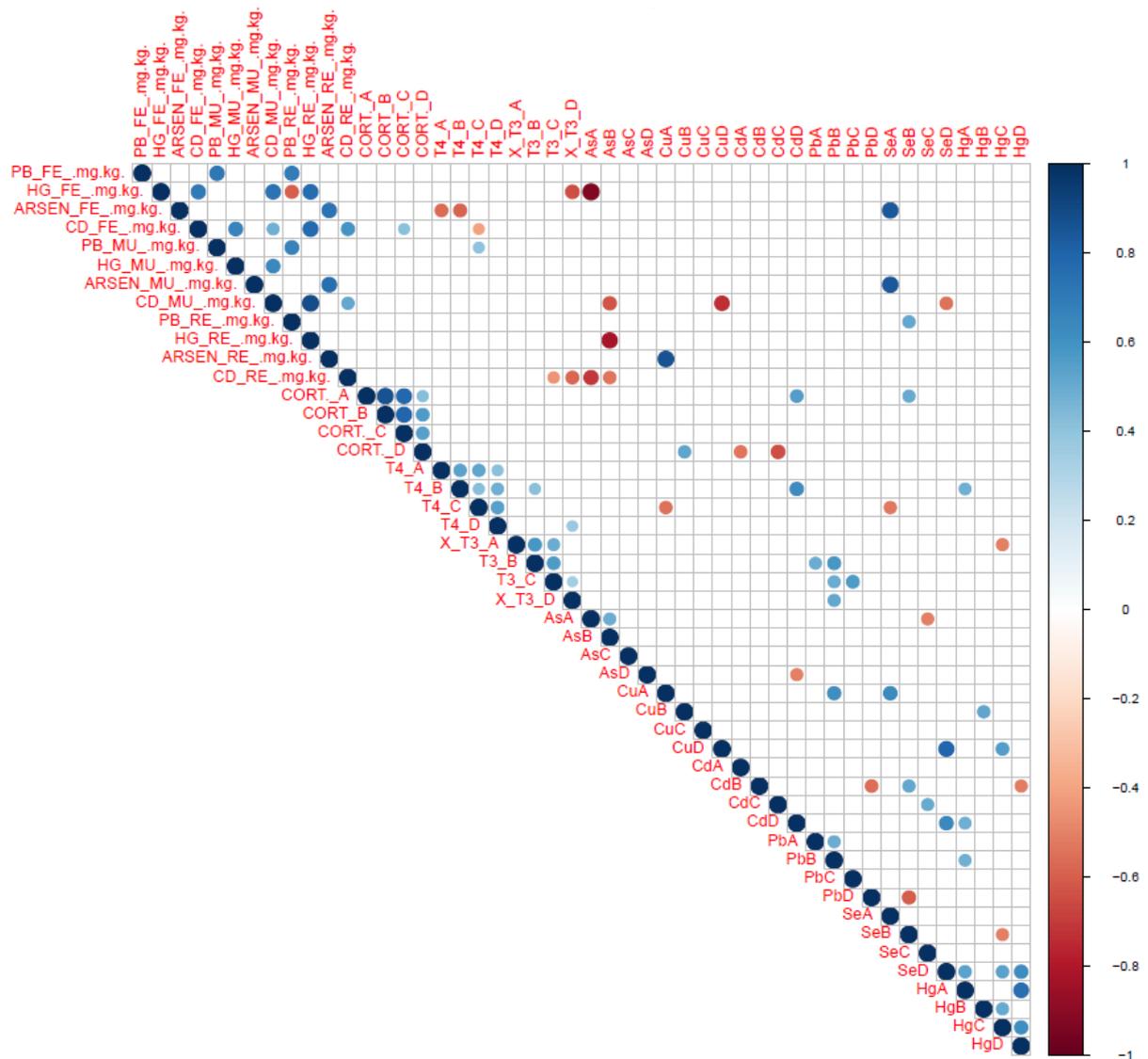


Fig. 4.6 - Correlogramma di Spearman

Il test non parametrico di Spearman mostra le correlazioni per ranghi tra le concentrazioni degli ormoni e quelle dei metalli. I pallini mostrano le correlazioni significative ( $p < 0.05$ ), il colore e le dimensioni dei pallini danno la direzione (blu: correlazione positiva; rosso: correlazione negativa) e l'intensità della correlazione. Abbreviazioni. FE: fegato; MU: muscolo; RE: rene; CORT: cortisolo.

Come prevedibile, vi è una correlazione positiva tra i livelli tissutali di ogni singolo metallo. Si possono sottolineare però anche alcune correlazioni positive tra metalli diversi, spiegabili con il fatto che gli stessi seguono le stesse vie di assorbimento. In particolare, si osserva come Hg e Cd siano in tutti gli organi correlati tra loro. In maniera analoga, correlazioni all'interno dei tre strati di blubber e il melone si osservano per ogni singolo ormone considerato.

Inoltre, si osservano correlazioni tra i singoli metalli, e tra metalli ed ormoni nel blubber. In particolare:

1. Arsenico e cadmio sono correlati negativamente nel melone. Questo fatto probabilmente è dovuto alla competizione tra i due metalli per gli stessi siti di legame all'interno dell'organo: il melone è infatti composto principalmente da acidi grassi e tessuto connettivo, ricco di fibre, cioè proteine (McKenna et al., 2012). Sia l'arsenico che il cadmio hanno elevata affinità per le proteine, e la competizione per gli stessi siti di legame con queste potrebbe spiegare la correlazione osservata.

2. Mercurio e selenio sono correlati positivamente. Questo dato è in accordo con quanto osservato in altri studi sui cetacei (Cardellicchio et al., 2002a; Das et al., 2002; Koeman et al., 1973; Leonzio et al., 1992) ed è spiegabile con il ruolo detossificante che il selenio esercita nei confronti del mercurio, formando con esso complessi insolubili che si accumulano nei tessuti dei cetacei, spiegando quindi anche in parte perché i mammiferi marini presentano concentrazioni elevate di mercurio senza presentare sintomi di intossicazione (Kershaw and Hall, 2019).

3. Sia il mercurio (a livello epatico e nel blubber) che il selenio (nel blubber) correlano negativamente con i livelli di ormoni tiroidei. Se la correlazione del mercurio non è di per sé inaspettata, in considerazione del ruolo riconosciuto di interferente endocrino svolto da questo elemento (Meyer et al., 2014; Shi et al., 2018), sorprende quella del selenio, che invece è conosciuto come fattore protettivo per la tiroide (Dolgova et al., 2019; Fedala et al., 2021; Zhang et al., 2018). Si può ipotizzare che tale correlazione negativa sia una sorta di artefatto statistico dovuto alla correlazione positiva osservata tra mercurio e selenio: se all'aumentare del mercurio aumenta anche il selenio e diminuiscono gli ormoni tiroidei, la stessa riduzione risulterà anche associata al selenio, senza che questi abbia un reale effetto nocivo sulla ghiandola, che invece è ascrivibile al solo mercurio.

4. Il cadmio epatico, renale e nel blubber correla negativamente con gli ormoni tiroidei. Anche in questo caso il risultato non è sorprendente, in quanto il cadmio è riconosciuto come interferente endocrino tireotossico (Rana, 2014). Studi in specie animali (ma non nei cetacei) hanno dimostrato come l'esposizione al metallo riduce i livelli di T4, probabilmente con un meccanismo diretto sulla deiodurazione (Hammouda et al., 2008; Mori et al., 2006).

5. Il cadmio è correlato negativamente anche con il cortisolo del melone. Questo dato è in accordo gli studi dove si è osservata una depressione dell'asse HPA e un'alterata secrezione di cortisolo dopo esposizione cronica al metallo (Rana, 2014; Raynal et al., 2005).

6. Infine, anche l'arsenico epatico correla negativamente con i livelli di T4 del blubber. Di nuovo, il metalloide è conosciuto come interferente endocrino (Davey et al., 2008; Sun et al., 2016), quindi il risultato non stupisce.

#### **4.4 CORRELAZIONI TRA ORMONI, METALLI E PATOLOGIE**

La maggior parte degli studi di tossicità controllata si concentra sugli effetti dei singoli composti e quindi non riflettono accuratamente le esposizioni nel mondo reale a una sovrabbondanza di sostanze antropiche e naturali. Dal punto di vista ambientale, il considerare un composto tossico per volta, è una situazione di esposizione semplicistica per cui i dati di questi studi sono difficili da comparare con quello che accade nella realtà (Desforges et al., 2017).

Nel presente studio si è voluto valutare tra le altre cose se l'esposizione ai metalli possa essere collegata alla presenza di patologie (o viceversa). A tale scopo, si sono valutati, tramite test non parametrico U di Mann-Whitney, le eventuali differenze tra i livelli di contaminanti negli organi interni, nel blubber e nel melone, in funzione dei tre principali agenti patogeni osservati: toxoplasmosi, morbillivirus e brucella.

Sono riportate di seguito solo le differenze statisticamente significative tra soggetti positivi e negativi ad uno specifico agente patogeno, che hanno interessato morbillivirus e toxoplasma.

- **MORBILLIVIRUS**

Le differenze statisticamente significative riscontrate in funzione del Cetacean Morbillivirus (CeMV) sono riportate in figura (Fig. 4.7).

Il cadmio epatico è significativamente più alto negli animali positivi al Morbillivirus. I livelli di Cd osservati nella presente ricerca sono più bassi dei valori soglia riportati da Cámara Pellissó et al., (2008) per la comparsa di fenomeni di tossicità cellulare e inibizione delle cellule deputate alla difesa immunitaria. Tuttavia, lo studio non considera gli effetti sinergici tra i vari contaminanti per cui non si può escludere un danno al sistema immunitario da parte del Cd, di fatti Desforges et al. (2017) afferma che l'effetto di miscele di contaminanti è tipicamente maggiore di quello dei singoli composti.

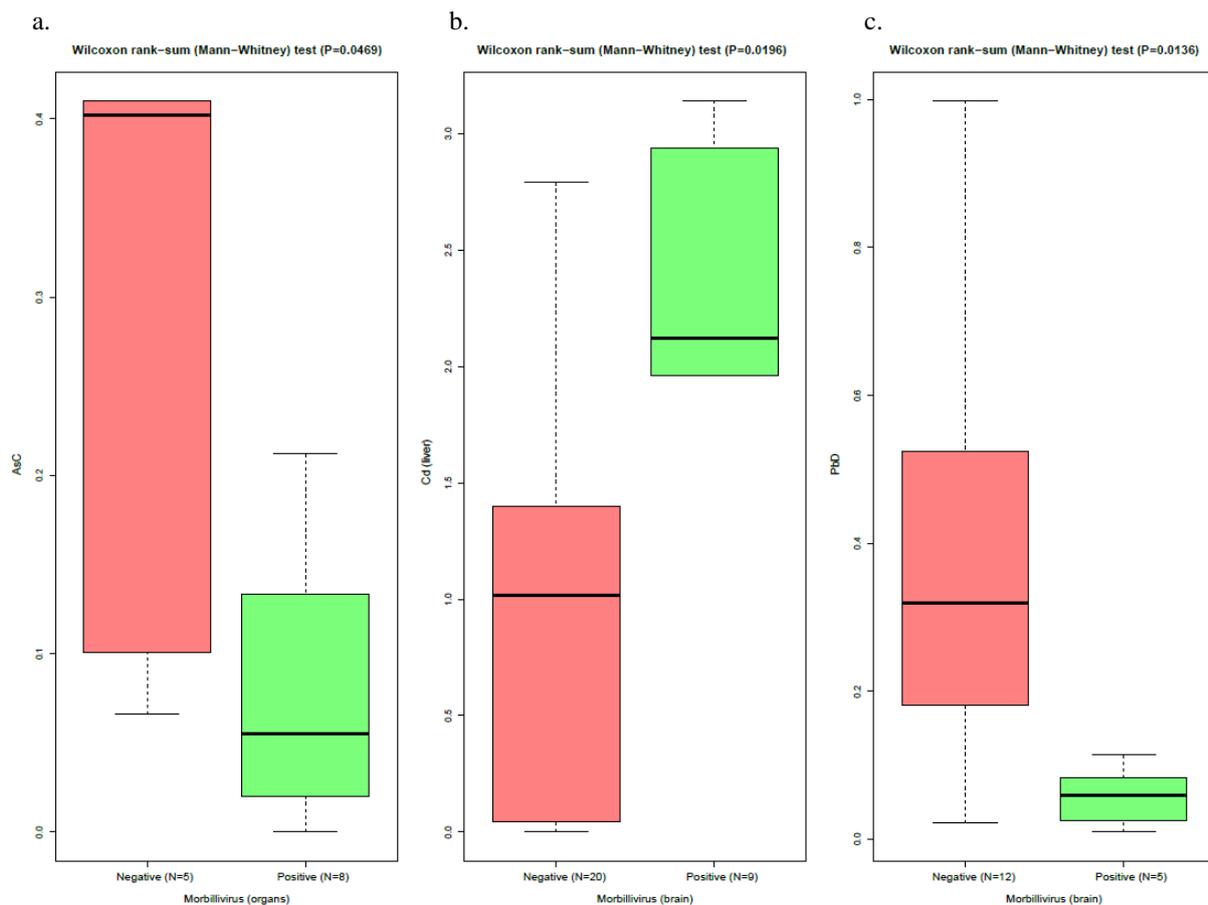


Fig. 4.7 – Boxplot Morbillivirus

Confronto tra animali positivi (in verde) e negativi (in rosso). Arsenico nel blubber C e Morbillivirus negli organi (a); Cadmio nel fegato e Morbillivirus nel cervello (b); Piombo nel melone e Morbillivirus nel cervello (d). La linea nera è la mediana, il riquadro è delimitato dal primo e dal terzo quartile. I baffi si estendono fino a un livello di confidenza di circa il 95%.

Di più difficile spiegazione sono invece i risultati ottenuti per quanto riguarda le differenze nei livelli di As nel blubber e di Pb nel melone. Infatti, contrariamente a quanto atteso in funzione dell'attività immunotossica riconosciuta per entrambi gli elementi, gli esemplari positivi al Morbillivirus presentano concentrazioni inferiori di metalli rispetto agli individui negativi. Una possibile spiegazione di questa osservazione può risiedere proprio nella natura dei tessuti considerati: Das et al. (2002) ritengono infatti che vi possa essere una ridistribuzione dei metalli, ed in particolare quelli tossici, tra cui l'arsenico, durante i periodi di dimagrimento (per patologie), che porta a concentrarli nel muscolo invece che in altri organi vitali quali fegato o rene. Questo fenomeno potrebbe anche portare ad una riduzione delle concentrazioni dei contaminanti non solo negli organi vitali, ma anche nel blubber, che ha per altro un'affinità ridotta per gli stessi.

- TOXOPLASMA

Le differenze statisticamente significative riscontrate in funzione del toxoplasma sono riportate in figura (Fig. 4.8).

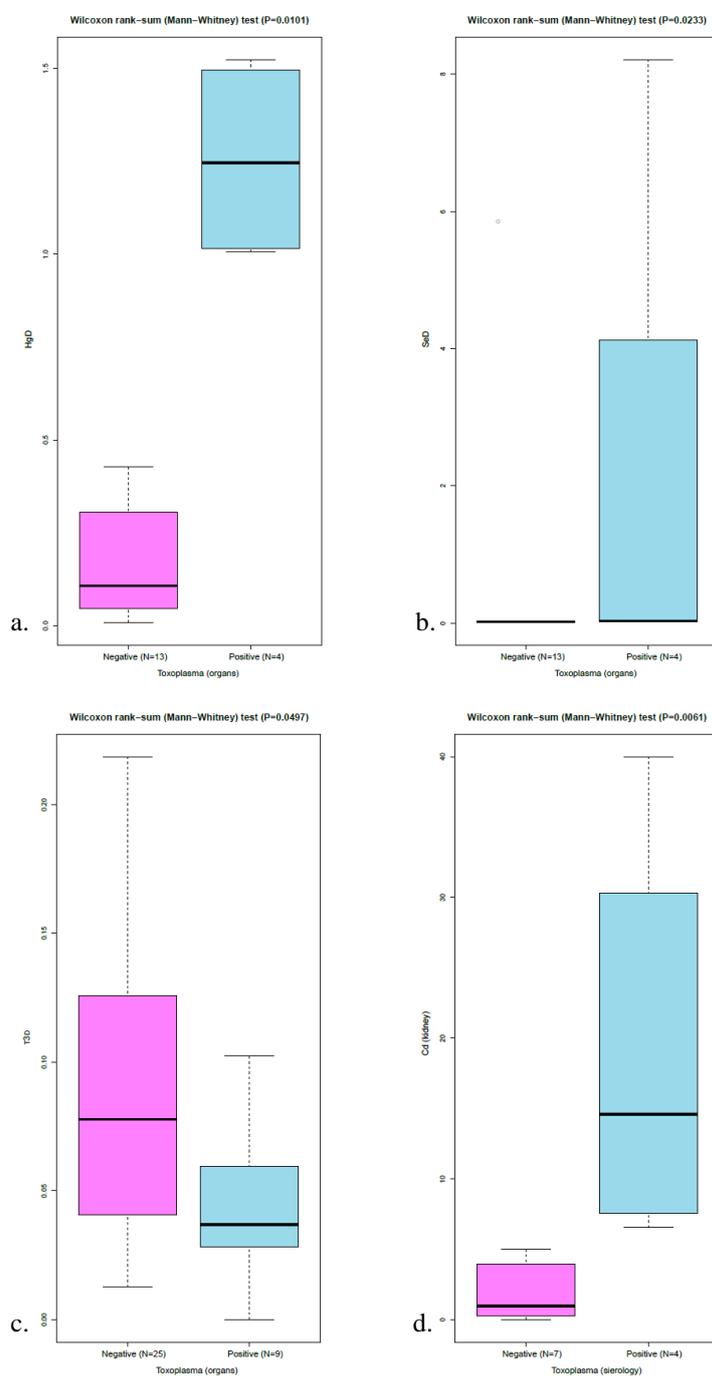


Fig. 4.8 - Boxplot toxoplasmosi

Confronti tra animali positivi (in azzurro) e negativi (in rosa) alla toxoplasmosi. Mercurio nel melone e Toxoplasma negli organi (a); Selenio nel melone e Toxoplasma negli organi (b); T3 nel melone e Toxoplasma negli organi (c); Cadmio nel rene e Toxoplasma nel sierologico (d). La linea nera è la mediana, i riquadri sono delimitati dal primo e dal terzo quartile. I baffi si estendono fino a un livello di confidenza di circa il 95%.

I risultati dei confronti effettuati sono più facilmente interpretabili rispetto a quanto osservato per il Morbillivirus.

Il selenio e il mercurio (Fig. 4.8a, b), entrambi nel melone, presentano concentrazioni molto più elevate negli esemplari positivi al *Toxoplasma* rispetto a quelli negativi. I livelli elevati di mercurio possono essere responsabili di un certo grado di immunodepressione che può aver reso più sensibili al parassita le stenelle positive. Per quanto riguarda il selenio, è presumibile, come già discusso per quanto riguarda le correlazioni negative osservate con gli ormoni tiroidei, che la correlazione positiva tra i due metalli sia responsabile della differenza qui osservata.

Il cadmio nei reni è significativamente più alto negli esemplari positivi (Fig. 4.8d) ma questo risultato era prevedibile essendo il Cd un metallo altamente tossico con effetti immunosoppressivi, come ripetuto precedentemente (Desforges et al., 2017).

Il T3 è significativamente più basso negli organi dei positivi al *Toxoplasma* (Fig. 4.8c). Uno studio ha riportato che il *toxoplasma* probabilmente non agisce direttamente sulla tiroide ma su un meccanismo nell'asse HPT non ancora ben identificato. Comunque, questa malattia interferisce con il feedback dell'asse HPT e in particolare diminuisce la secrezione di TSH che a cascata riduce i livelli di T4 (Stahl and Kaneda, 1998). Sebbene Stahl e Kaneda (1998) non abbiano valutato le variazioni nei livelli di T3, è presumibile che la riduzione della tiroxina si rifletta poi in una diminuzione anche di triiodotironina.

## **5. CONCLUSIONI**

Lo studio degli effetti dei contaminanti nelle specie selvatiche, ed in particolare nei mammiferi marini, vede nel reperimento di campioni tramite metodologie che non comportino l'uccisione degli animali o la loro cattura con metodologie altamente stressanti uno dei punti più problematici della ricerca. Per questo motivo sono sempre più numerose le ricerche volte all'identificazione e alla validazione di matrici non invasive, tra cui le biopsie cutanee, che permettano non solo la quantificazione di vari xenobiotici, ma anche la valutazione degli eventuali effetti avversi degli stessi.

Il presente studio ha voluto valutare se il blubber potesse essere un buon marker per la quantificazione non solo di contaminanti organici (Galligan et al., 2019; Gauthier et al., 1997; Muñoz-Arnanz et al., 2019), ma anche di elementi traccia. Inoltre, ha voluto verificare se le concentrazioni di metalli, ma anche di ormoni tiroidei e di cortisolo, variano in funzione della profondità del campionamento e se cambiano tra blubber e melone.

Infine, si è voluto verificare se queste concentrazioni, al pari delle concentrazioni di metalli negli organi interni, potessero essere modificate dalla concomitante presenza di agenti patogeni.

I risultati delle analisi effettuate hanno permesso di evidenziare come sia possibile quantificare nel blubber e nel melone gli elementi traccia studiati, sebbene vada sottolineato come cadmio, rame e selenio presentino concentrazioni molto basse nel blubber e più elevate nel melone.

Le stesse matrici si dimostrano molto valide anche per la ricerca degli ormoni tiroidei e del cortisolo, in quanto tutti e tre gli ormoni sono stati reperiti nelle sezioni analizzate. Va per altro sottolineato come i livelli di T3 siano sempre molto bassi.

Non si evidenziano poi significative differenze nei livelli di metalli e di ormoni in funzione della profondità di campionamento nel blubber, portando quindi ad escludere un eventuale effetto di bias determinato dalla profondità di prelievo quando si effettuano campagne di campionamento su animali selvatici.

Di estremo interesse è l'osservazione che la compresenza di patogeni è associata, con l'eccezione di due casi, a concentrazioni più elevate di metalli, a conferma del loro potenziale immunotossico. Analogamente, importante sottolineare come le analisi abbiano permesso di confermare, in qualche modo, l'azione tireotossica del *Toxoplasma*.

In conclusione, si può ritenere che la presente ricerca abbia dimostrato come il monitoraggio non invasivo di blubber da specie altamente protette può fornire valide informazioni relativamente al loro stato di salute e di esposizione a contaminanti. Si ritiene opportuno sottolineare come però per alcuni parametri considerati la numerosità dei risultati fosse relativamente ridotta, a causa anche di differenti protocolli analitici applicati dai tre IZS coinvolti (non tutte le analisi venivano effettuate in maniera consistente nelle tre sedi), e questo può aver in qualche modo ridotto o mascherato altre correlazioni eventualmente esistenti. È estremamente importante proseguire quindi con le ricerche di questo tipo, per aumentare il numero di campioni, portando ad un incremento della significatività delle osservazioni qui riportate e ad una maggior comprensione delle reali connessioni tra contaminanti, assi endocrini ed agenti patogeni.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Andre, J., Boudou, A., Ribeyre, F. and Bernhard, M.** (1991). Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts. *Science of The Total Environment* 104, 191–209.
- Archer, F. I.** (2018). Striped Dolphin. In *Encyclopedia of Marine Mammals*, pp. 954–956. Elsevier.
- Archer, F. I. and Perrin, W. F.** (1999). *Stenella coeruleoalba*. *Mamm Species* 1–9.
- Atkinson, S., Crocker, D. E. and Ortiz, R. M.** (2018). Endocrine Systems. In *Encyclopedia of Marine Mammals (Third Edition)* (ed. Würsig, B.), Thewissen, J. G. M.), and Kovacs, K. M.), pp. 318–328. Academic Press.
- Aubail, A., Méndez-Fernandez, P., Bustamante, P., Churlaud, C., Ferreira, M., Vingada, J. V. and Caurant, F.** (2013). Use of skin and blubber tissues of small cetaceans to assess the trace element content of internal organs. *Marine Pollution Bulletin* 76, 158–169.
- Azzellino, A., Fossi, M. C., Gaspari, S., Lanfredi, C., Lauriano, G., Marsili, L., Panigada, S. and Podestà, M.** (2014). An index based on the biodiversity of cetacean species to assess the environmental status of marine ecosystems. *Marine Environmental Research* 100, 94–111.
- Bellante, A., Sprovieri, M., Buscaino, G., Buffa, G., Stefano, V. D., Salvagio Manta, D., Barra, M., Filiciotto, F., Bonanno, A. and Mazzola, S.** (2012a). Distribution of Cd and As in organs and tissues of four marine mammal species stranded along the Italian coasts. *Journal of Environmental Monitoring* 14, 2382–2391.
- Bellante, A., Sprovieri, M., Buscaino, G., Buffa, G., Stefano, V. D., Manta, D. S., Barra, M., Filiciotto, F., Bonanno, A., Giacomina, C., et al.** (2012b). Stranded cetaceans as indicators of mercury pollution in the Mediterranean Sea. *Italian Journal of Zoology* 79, 151–160.
- Bennett, P. M., Jepson, P. D., Law, R. J., Jones, B. R., Kuiken, T., Baker, J. R., Rogan, E. and Kirkwood, J. K.** (2001). Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *Environmental Pollution* 112, 33–40.
- Bernhoft, R. A.** (2013). Cadmium Toxicity and Treatment. *The Scientific World Journal* 2013, e394652.
- Bianchi, C. N. and Morri, C.** (2000). Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research. *Marine Pollution Bulletin* 40, 367–376.
- Borrell, A., Aguilar, A., Tornero, V. and Drago, M.** (2014). Concentrations of mercury in tissues of striped dolphins suggest decline of pollution in Mediterranean open waters. *Chemosphere* 107, 319–323.

- Bossart, G. D.** (2011). Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Vet Pathol* 48, 676–690.
- Bowen, W.** (1997). Role of marine mammals in aquatic ecosystems. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 158, 267–274.
- Burgess, E. A., Hunt, K. E., Kraus, S. D. and Rolland, R. M.** (2017). Adrenal responses of large whales: Integrating fecal aldosterone as a complementary biomarker to glucocorticoids. *General and Comparative Endocrinology* 252, 103–110.
- Bustamante, P., Caurant, F., Fowler, S. W. and Miramand, P.** (1998). Cephalopods as a vector for the transfer of cadmium to top marine predators in the north-east Atlantic Ocean. *Science of The Total Environment* 220, 71–80.
- Bustamante, P., González, A. F., Rocha, F., Miramand, P. and Guerra, A.** (2008). Metal and metalloid concentrations in the giant squid *Architeuthis dux* from Iberian waters. *Marine Environmental Research* 66, 278–287.
- Cámara Pellissó, S., Muñoz, M. J., Carballo, M. and Sánchez-Vizcaíno, J. M.** (2008). Determination of the immunotoxic potential of heavy metals on the functional activity of bottlenose dolphin leukocytes in vitro. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121, 189–198.
- Capelli, R., Das, K., Pellegrini, R. D., Drava, G., Lepoint, G., Miglio, C., Minganti, V. and Poggi, R.** (2008). Distribution of trace elements in organs of six species of cetaceans from the Ligurian Sea (Mediterranean), and the relationship with stable carbon and nitrogen ratios. *Science of The Total Environment* 390, 569–578.
- Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P. and Di Leo, A.** (2000). Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, Southern Italy. *Marine Environmental Research* 49, 55–66.
- Cardellicchio, N., Decataldo, A., Di Leo, A. and Misino, A.** (2002a). Accumulation and tissue distribution of mercury and selenium in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea (southern Italy). *Environmental Pollution* 116, 265–271.
- Cardellicchio, N., Decataldo, A., Di Leo, A. and Giandomenico, S.** (2002b). Trace elements in organs and tissues of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean sea (Southern Italy). *Chemosphere* 49, 85–90.
- Caride, A., Fernández-Pérez, B., Cabaleiro, T., Tarasco, M., Esquifino, A. I. and Lafuente, A.** (2010). Cadmium chronotoxicity at pituitary level: effects on plasma ACTH, GH, and TSH daily pattern. *J Physiol Biochem* 66, 213–220.
- Carlucci, R., Ricci, P., Cipriano, G. and Fanizza, C.** (2018). Abundance, activity and critical habitat of the striped dolphin *Stenella coeruleoalba* in the Gulf of Taranto (northern Ionian Sea, central Mediterranean Sea). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28, 324–336.

- Caurant, F., Aubail, A., Lahaye, V., Van Canneyt, O., Rogan, E., López, A., Addink, M., Churlaud, C., Robert, M. and Bustamante, P.** (2006). Lead contamination of small cetaceans in European waters – The use of stable isotopes for identifying the sources of lead exposure. *Marine Environmental Research* 62, 131–148.
- Champagne, C. D., Kellar, N. M., Crocker, D. E., Wasser, S. K., Booth, R. K., Trego, M. L. and Houser, D. S.** (2017). Blubber cortisol qualitatively reflects circulating cortisol concentrations in bottlenose dolphins. *Marine Mammal Science* 33, 134–153.
- Champagne, C. D., Kellar, N. M., Trego, M. L., Delehanty, B., Boonstra, R., Wasser, S. K., Booth, R. K., Crocker, D. E. and Houser, D. S.** (2018). Comprehensive endocrine response to acute stress in the bottlenose dolphin from serum, blubber, and feces. *General and Comparative Endocrinology* 266, 178–193.
- Chen, C. Y., Kawamura, G., Saeki, T. and Lim, L.-S.** (2017). Heavy metals distribution in cetaceans stranded at west and north coasts of Sabah, Malaysia. *Int. J. of Aquatic Science* 8, 16–25.
- Clark, L. S., Cowan, D. F. and Pfeiffer, D. C.** (2006). Morphological Changes in the Atlantic Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Adrenal Gland Associated with Chronic Stress. *Journal of Comparative Pathology* 135, 208–216.
- Coll, M., Piroddi, C., Albouy, C., Ben Rais Lasram, F., Cheung, W. W. L., Christensen, V., Karpouzi, V. S., Guilhaumon, F., Mouillot, D., Paleczny, M., et al.** (2012). The Mediterranean Sea under siege: spatial overlap between marine biodiversity, cumulative threats and marine reserves: The Mediterranean Sea under siege. *Global Ecology and Biogeography* 21, 465–480.
- Cozzi, B., Huggenberger, S. and Oelschläger, H. A.** (2016). *Anatomy of Dolphins: Insights into Body Structure and Function*. Academic Press.
- Das, K., Debacker, V., Pillet, S. and Bouquegneau, J. M.** (2002). Heavy metals in marine mammals. In: Vos, Bossart, Fournier and O’Shea (eds) *Toxicology of Marine Mammals*, Taylor & Francis Group, London, United Kingdom: 135–167.
- Davey, J. C., Nomikos, A. P., Wungjiranirun, M., Sherman, J. R., Ingram, L., Batki, C., Lariviere, J. P. and Hamilton, J. W.** (2008). Arsenic as an Endocrine Disruptor: Arsenic Disrupts Retinoic Acid Receptor–and Thyroid Hormone Receptor–Mediated Gene Regulation and Thyroid Hormone–Mediated Amphibian Tail Metamorphosis. *Environmental Health Perspectives* 116, 165–172.
- Desforges, J.-P. W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S. and Dietz, R.** (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International* 86, 126–139.
- Desforges, J. P., Levin, M., Jasperse, L., De Guise, S., Eulaers, I., Letcher, R. J., Acquarone, M., Nordøy, E., Folkow, L. P., Hammer Jensen, T., et al.** (2017). Effects of Polar Bear and Killer Whale Derived Contaminant Cocktails on Marine Mammal Immunity. *Environ. Sci. Technol.* 51, 11431–11439.

- Di Guardo, G. and Mazzariol, S.** (2016). Cetacean Morbillivirus-Associated Pathology: Knowns and Unknowns. *Front. Microbiol.* 7,.
- Dolgoва, N. V., Nehzati, S., MacDonald, T. C., Summers, K. L., Crawford, A. M., Krone, P. H., George, G. N. and Pickering, I. J.** (2019). Disruption of selenium transport and function is a major contributor to mercury toxicity in zebrafish larvae†. *Metallomics* 11, 621–631.
- Domingo, M., Vilafranca, M., Visa, J., Prats, N., Trudgett, A. and Visser, I.** (1995). Evidence for chronic morbillivirus infection in the Mediterranean striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Microbiology* 44, 229–239.
- Dorneles, P. R., Lailson-Brito, J., dos Santos, R. A., Silva da Costa, P. A., Malm, O., Azevedo, A. F. and Machado Torres, J. P.** (2007). Cephalopods and cetaceans as indicators of offshore bioavailability of cadmium off Central South Brazil Bight. *Environmental Pollution* 148, 352–359.
- Doumouchtsis, K. K., Doumouchtsis, S. K., Doumouchtsis, E. K. and Perrea, D. N.** (2009). The effect of lead intoxication on endocrine functions. *J Endocrinol Invest* 32, 175–183.
- Dyer, C. A.** (2007). Heavy Metals as Endocrine-Disrupting Chemicals. In *Endocrine-Disrupting Chemicals* (ed. Gore, A. C.), pp. 111–133. Totowa, NJ: Humana Press.
- Eisler, R.** (1998). *Copper Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review*. U.S. Department of the Interior, U.S. Geological Survey.
- Esposito, M., Capozzo, D., Sansone, D., Lucifora, G., La Nucara, R., Picazio, G., Rivero, C. and Gallo, P.** (2020). Mercury and cadmium in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Southern Tyrrhenian and Western Ionian coasts. *Medit. Mar. Sci.*
- Fair, P. A., Montie, E., Balthis, L., Reif, J. S. and Bossart, G. D.** (2011). Influences of biological variables and geographic location on circulating concentrations of thyroid hormones in wild bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *General and Comparative Endocrinology* 174, 184–194.
- Fedala, A., Adjroud, O., Abid-Essefi, S. and Timoumi, R.** (2021). Protective effects of selenium and zinc against potassium dichromate–induced thyroid disruption, oxidative stress, and DNA damage in pregnant Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res.*
- Fossi, M. C., Casini, S. and Marsili, L.** (2007). Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. *Environmental Research* 104, 174–182.
- Gaetke, L. M. and Chow, C. K.** (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 189, 147–163.
- Galligan, T. M., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Bolton, J. L., Quigley, B. M., Rosel, P. E., Ylitalo, G. M. and Boggs, A. S. P.** (2019). Examining the relationships between blubber steroid hormones and persistent organic pollutants in common bottlenose dolphins. *Environmental Pollution* 249, 982–991.

- Gaspari, S. and Aguilar, A.** (2012). IUCN Red List of Threatened Species: *Stenella coeruleoalba* Mediterranean subpopulation. *IUCN Red List of Threatened Species*.
- Gauthier, J. M., Metcalfe, C. D. and Sears, R.** (1997). Chlorinated organic contaminants in blubber biopsies from northwestern Atlantic balaenopterid whales summering in the Gulf of St Lawrence. *Marine Environmental Research* 44, 201–223.
- Georgescu, B., Georgescu, C. and Pa, S.** (2011). Heavy Metals Acting as Endocrine Disrupters. *Scientific Papers* 5.
- Gómez-Campos, E., Borrell, A., Correas, J. and Aguilar, A.** (2015). Topographical variation in lipid content and morphological structure of the blubber in the striped dolphin. *Scientia Marina* 79, 189–197.
- Hamilton, S. J.** (2004). Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of The Total Environment* 326, 1–31.
- Hammouda, F., Messaoudi, I., El Hani, J., Baati, T., Saïd, K. and Kerkeni, A.** (2008). Reversal of Cadmium-Induced Thyroid Dysfunction by Selenium, Zinc, or Their Combination in Rat. *Biol Trace Elem Res* 126, 194.
- Harper, C. J., McLellan, W. A., Rommel, S. A., Gay, D. M., Dillaman, R. M. and Pabst, D. A.** (2008). Morphology of the melon and its tendinous connections to the facial muscles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Morphol.* 269, 820–839.
- Hashimoto, O., Ohtsuki, H., Kakizaki, T., Amou, K., Sato, R., Doi, S., Kobayashi, S., Matsuda, A., Sugiyama, M., Funaba, M., et al.** (2015). Brown Adipose Tissue in Cetacean Blubber. *PLOS ONE* 10, e0116734.
- Honda, K., Tatsukawa, R. and Fujiyama, T.** (1982). Distribution Characteristics of Heavy Metals in the Organs and Tissues of Striped Dolphin, *Stenella coeruleoalba*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 3011–3021.
- Iavicoli, I., Fontana, L. and Bergamaschi, A.** (2009). The Effects of Metals as Endocrine Disruptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 12, 206–223.
- Ikemoto, T., Kunito, T., Tanaka, H., Baba, N., Miyazaki, N. and Tanabe, S.** (2004). Detoxification Mechanism of Heavy Metals in Marine Mammals and Seabirds: Interaction of Selenium with Mercury, Silver, Copper, Zinc, and Cadmium in Liver. *Arch Environ Contam Toxicol* 47, 402–413.
- IUCN** (2008). *Stenella coeruleoalba*: Hammond, P.S., Bearzi, G., Bjørge, A., Forney, K., Karczmarski, L., Kasuya, T., Perrin, W.F., Scott, M.D., Wang, J.Y., Wells, R.S. & Wilson, B.: The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T20731A9223182.
- Iverson, S. J. and Koopman, H. N.** (2018). Blubber. In *Encyclopedia of Marine Mammals (Third Edition)* (ed. Würsig, B.), Thewissen, J. G. M.), and Kovacs, K. M.), pp. 107–110. Academic Press.

- Jagodić, J., Rovčanin, B., Paunović, I., Jovanović, M., Gavrović-Jankulović, M., Manojlović, D. and Stojsavljević, A.** (2021). The first insight into the trace element status of human adrenal gland accompanied by elemental alterations in adrenal adenomas. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 63, 126658.
- Jakimska, A., Konieczna, P., Skora, K. and Namiesnik, J.** (2011). Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: the Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Pol. J. Environ. Stud.* 20, 1117–1125.
- Kellar, N. M., Catelani, K. N., Robbins, M. N., Trego, M. L., Allen, C. D., Danil, K. and Chivers, S. J.** (2015). Blubber Cortisol: A Potential Tool for Assessing Stress Response in Free-Ranging Dolphins without Effects due to Sampling. *PLOS ONE* 10, e0115257.
- Kershaw, J. L. and Hall, A. J.** (2019). Mercury in cetaceans: Exposure, bioaccumulation and toxicity. *Science of The Total Environment* 694, 133683.
- Klaassen, C. D., Liu, J. and Diwan, B. A.** (2009). Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238, 215–220.
- Koeman, J. H., Peeters, W. H. M., Koudstaal-Hol, C. H. M., Tjioe, P. S. and De Goeij, J. J. M.** (1973). Mercury-Selenium Correlations in Marine Mammals. *Nature* 245, 385–386.
- Kubota, R., Kunito, T. and Tanabe, S.** (2003). Occurrence of several arsenic compounds in the liver of birds, cetaceans, pinnipeds, and sea turtles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1200–1207.
- Lafuente, A., Cano, P. and Esquifino, A. I.** (2003). Are cadmium effects on plasma gonadotropins, prolactin, ACTH, GH and TSH levels, dose-dependent? *Biometals* 16, 243–250.
- Leonzio, C., Focardi, S. and Fossi, C.** (1992). Heavy metals and selenium in stranded dolphins of the Northern Tyrrhenian (NW Mediterranean). *Science of The Total Environment* 119, 77–84.
- Liu, J.-Y., Chou, L.-S. and Chen, M.-H.** (2015). Investigation of trophic level and niche partitioning of 7 cetacean species by stable isotopes, and cadmium and arsenic tissue concentrations in the western Pacific Ocean. *Marine Pollution Bulletin* 93, 270–277.
- López-Berenguer, G., Peñalver, J. and Martínez-López, E.** (2020). A critical review about neurotoxic effects in marine mammals of mercury and other trace elements. *Chemosphere* 246, 125688.
- Mannocci, L., Roberts, J. J., Halpin, P. N., Authier, M., Boisseau, O., Bradai, M. N., Cañadas, A., Chicote, C., David, L., Di-Méglio, N., et al.** (2018). Assessing cetacean surveys throughout the Mediterranean Sea: a gap analysis in environmental space. *Sci Rep* 8, 3126.
- Martelli, A., Rousselet, E., Dycke, C., Bouron, A. and Moulis, J.-M.** (2006). Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochimie* 88, 1807–1814.

- Martínez-López, E., Peñalver, J., Escriña, A., Lara, L., Gens, M. J., María Dolores, E., Alcaraz, A. and García-Fernández, A. J.** (2019). Trace metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Murcia coastline, Mediterranean Sea, during the period 2009–2015. *Chemosphere* 229, 580–588.
- McCormack, M. A., Battaglia, F., McFee, W. E. and Dutton, J.** (2020). Mercury concentrations in blubber and skin from stranded bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) along the Florida and Louisiana coasts (Gulf of Mexico, USA) in relation to biological variables. *Environmental Research* 180, 108886.
- McKenna, M. F., Cranford, T. W., Berta, A. and Pyenson, N. D.** (2012). Morphology of the odontocete melon and its implications for acoustic function. *Marine Mammal Science* 28, 690–713.
- Meyer, E., Eagles-Smith, C. A., Sparling, D. and Blumenshine, S.** (2014). Mercury Exposure Associated with Altered Plasma Thyroid Hormones in the Declining Western Pond Turtle (*Emys marmorata*) from California Mountain Streams. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2989–2996.
- Mingramm, F. M. J., Keeley, T., Whitworth, D. J. and Dunlop, R. A.** (2020). Blubber cortisol levels in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*): A measure of physiological stress without effects from sampling. *General and Comparative Endocrinology* 291, 113436.
- Monaci, F., Borrel, A., Leonzio, C., Marsili, L. and Calzada, N.** (1998). Trace elements in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. *Environmental Pollution* 99, 61–68.
- Monteiro, S. S., Bozzetti, M., Torres, J., Tavares, A. S., Ferreira, M., Pereira, A. T., Sá, S., Araújo, H., Bastos-Santos, J., Oliveira, I., et al.** (2020). Striped dolphins as trace element biomonitoring tools in oceanic waters: Accounting for health-related variables. *Science of The Total Environment* 699, 134410.
- Mori, K., Yoshida, K., Hoshikawa, S., Ito, S., Yoshida, M., Satoh, M. and Watanabe, C.** (2006). Effects of perinatal exposure to low doses of cadmium or methylmercury on thyroid hormone metabolism in metallothionein-deficient mouse neonates. *Toxicology* 228, 77–84.
- Muñoz-Arnanz, J., Chirife, A. D., Galletti Vernazzani, B., Cabrera, E., Sironi, M., Millán, J., Attard, C. R. M. and Jiménez, B.** (2019). First assessment of persistent organic pollutant contamination in blubber of Chilean blue whales from Isla de Chiloé, southern Chile. *Science of The Total Environment* 650, 1521–1528.
- Notarbartolo di Sciara, G.** (2016). Chapter One - Marine Mammals in the Mediterranean Sea: An Overview. In *Advances in Marine Biology* (ed. Notarbartolo Di Sciara, G.), Podestà, M.), and Curry, B. E.), pp. 1–36. Academic Press.
- Notarbartolo Di Sciara, G. and Demma, M.** (1997). Guida dei mammiferi marini del Mediterraneo. Franco Muzzio Editore, Padova.

- Pace, D. S., Tizzi, R. and Mussi, B.** (2015). Cetaceans Value and Conservation in the Mediterranean Sea. *Journal of Biodiversity&Endangered Species*, 24.
- Pavia, M. A., Paier, B., Noli, M. I., Hagmüller, K. and Zaninovich, A. A.** (1997). Evidence suggesting that cadmium induces a non-thyroidal illness syndrome in the rat. *Journal of Endocrinology* 154, 113–117.
- Pujade Busqueta, L., Crocker, D. E., Champagne, C. D., McCormley, M. C., Deyarmin, J. S., Houser, D. S. and Khudyakov, J. I.** (2020). A blubber gene expression index for evaluating stress in marine mammals. *Conserv Physiol* 8.
- Raga, J.-A., Banyard, A., Domingo, M., Corteyn, M., Van Bresse, M.-F., Fernández, M., Aznar, F.-J. and Barrett, T.** (2008). Dolphin Morbillivirus Epizootic Resurgence, Mediterranean Sea. *Emerg Infect Dis* 14, 471–473.
- Rana, S. V. S.** (2014). Perspectives in Endocrine Toxicity of Heavy Metals—A Review. *Biol Trace Elem Res* 160, 1–14.
- Raynal, N. J., Hontela, A. and Jumarie, C.** (2005). Cadmium uptake in isolated adrenocortical cells of rainbow trout and yellow perch. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140, 374–382.
- Roditi-Elasar, M., Kerem, D., Kress, N., Shoham-Frider, E., Goffman, O. and Spanier, E.** (2003). *Heavy metal levels in bottlenose and striped dolphins off the Mediterranean coast of Israel.*
- Scano, P., Maxia, C., Maggiani, F., Crnjar, R., Lai, A. and Sirigu, P.** (2005). A histological and NMR study of the melon of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*). *Chemistry and Physics of Lipids* 134, 21–28.
- Selvaraj, V., Tomblin, J., Yeager Armistead, M. and Murray, E.** (2013). Selenium (sodium selenite) causes cytotoxicity and apoptotic mediated cell death in PLHC-1 fish cell line through DNA and mitochondrial membrane potential damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87, 80–88.
- Shi, Q., Sun, N., Kou, H., Wang, H. and Zhao, H.** (2018). Chronic effects of mercury on *Bufo gargarizans* larvae: Thyroid disruption, liver damage, oxidative stress and lipid metabolism disorder. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164, 500–509.
- Shlosberg, A., Bellaiche, M., Regev, S., Gal, R., Brizzi, M., Hanji, V., Zaidel, L. and Nyska, A.** (1997). Lead Toxicosis in a Captive Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*) Consequent to Ingestion of Air Gun Pellets. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 135–139.
- Stahl, W. and Kaneda, Y.** (1998). Impaired thyroid function in murine toxoplasmosis. *Parasitology* 117, 217–222.
- Sun, H.-J., Rathinasabapathi, B., Wu, B., Luo, J., Pu, L.-P. and Ma, L. Q.** (2014). Arsenic and selenium toxicity and their interactive effects in humans. *Environment International* 69, 148–158.

- Sun, H., Xiang, P., Luo, J., Hong, H., Lin, H., Li, H.-B. and Ma, L. Q.** (2016). Mechanisms of arsenic disruption on gonadal, adrenal and thyroid endocrine systems in humans: A review. *Environment International* 95, 61–68.
- Suzuki, M., Nozawa, A., Ueda, K., Bungo, T., Terao, H. and Asahina, K.** (2012). Secretory patterns of catecholamines in Indo-Pacific bottlenose dolphins. *General and Comparative Endocrinology* 177, 76–81.
- Van Bresseem, M.-F., Raga, J. A., Di Guardo, G., Jepson, P. D., Duignan, P., Siebert, U., Barrett, T., Santos, Mc., Moreno, I., Siciliano, S., et al.** (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Dis. Aquat. Org.* 86, 143–157.
- Yau, W. W. and Yen, P. M.** (2020). Thermogenesis in Adipose Tissue Activated by Thyroid Hormone. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 3020.
- Zaccaroni, A., Parmeggiani, A., Limor, S. and Scaravelli, D.** (2008). Preliminary Report on Thyroid Hormone Levels in Tissues of Stranded Cetaceans. 3.
- Zaccaroni, A., Silvi, M., Fonti, P., Pari, E. and Scaravelli, D.** (2010). Heavy metals in dolphins from northern Adriatic Sea and potential subtle toxic effects. In: *Dolphins: anatomy, behavior and threats*, 45–77.
- Zhang, P., Guan, X., Yang, M., Zeng, L. and Liu, C.** (2018). Roles and potential mechanisms of selenium in countering thyrotoxicity of DEHP. *Science of The Total Environment* 619–620, 732–739.