

**EFECTOS DE LOS CONTAMINANTES  
SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE CETÁCEOS**

**EFFECTS OF POLLUTANTS  
ON THE IMMUNE SYSTEM OF CETACEANS**

**Trabajo de Fin de Grado**

**CARMELO ANTONIO STARRANTINO**

**Tutorizado por Natacha Aguilar de Soto**

**Grado en Biología. Julio 2018**

## ÍNDICE

---

Resumen.....	1
Abstract .....	1
1. Introducción .....	2
1.1. Los cetáceos .....	2
1.2. El sistema inmune de los cetáceos.....	4
2. Objetivo .....	6
3. Metodología .....	7
4. Discusión .....	8
4.1. El sistema inmune de los cetáceos.....	8
4.1.1. El sistema inmune innato .....	8
4.1.2. El sistema inmune adquirido/adaptativo .....	9
4.2. Contaminantes químicos.....	12
4.2.1. Compuestos orgánicos persistentes.....	12
4.2.2. Metales pesados .....	16
4.3. El ruido.....	19
4.4. Factores biológicos .....	24
4.5. El estrés .....	26
5. Conclusiones.....	28
5. Conclusions.....	29
Bibliografía .....	30

## *Resumen*

Debido a su ecología marina y su historia de vida, los mamíferos marinos, sobre todo los cetáceos, están sujetos a algunos de los niveles más altos de contaminantes ambientales de toda la fauna silvestre. El creciente aumento y gravedad de las enfermedades que estos padecen hace imprescindible comprender si y cómo los contaminantes afectan a su sistema inmune y, en consecuencia, cómo alteran la susceptibilidad a las enfermedades. En los últimos años nuevas técnicas analíticas han facilitado la investigación del sistema inmune de los cetáceos, y las publicaciones sobre este tema están en continuo aumento, permitiendo entender cada día más los mecanismos de defensa y las causas de algunas enfermedades. Los estudios realizados han asociado la exposición a distintos contaminantes ambientales con alteraciones de la inmunidad de tipo innato y adaptativo. En este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica del estado del arte de la investigación de los efectos de los contaminantes ambientales sobre el sistema inmune de cetáceos, con el propósito de recopilar las informaciones existentes en la literatura científica. Además, el trabajo realizado será el punto de partida para la realización de una Tesis Doctoral que el alumno desarrollará en este campo del conocimiento.

**Palabras clave:** cetáceos, contaminantes, estrés, sistema inmune.

## *Abstract*

Due to their marine ecology and life history, marine mammals, especially cetaceans, are subject to some of the highest levels of environmental pollutants of all wildlife. The increasing raise and severity of the diseases suffered by cetaceans makes it essential to understand if and how contaminants affect their immune system and, consequently, how they enhance their susceptibility to disease. In recent years new analytical techniques have facilitated the research on the immune system of cetaceans, and publications on this subject are continuously increasing. This favours a better understanding about the defence mechanisms of cetaceans and the causes of some diseases. Studies have associated exposure to different environmental pollutants, with alterations of innate and adaptive immunity. In this Degree Final Thesis, I carried out a review of the state of the art of research on the effects of environmental pollutants on the immune system of cetaceans, in order to collect existing information in the scientific literature. In addition, the work will be the starting point for the completion of a PhD Thesis that the student will develop in this field of knowledge.

**Keywords:** cetaceans, contamination, stress, immune system.



# **Introducción**

# 1. Introducción

## 1.1. Los cetáceos

Ningún grupo de animales como los cetáceos ha fascinado tanto y en tantas formas a tan numerosas culturas a través de la historia de la humanidad. Muy pocos organismos han inspirado, en nuestra especie, tanta curiosidad, confusión y conocimiento, tanta admiración y creación artística, tanto terror, antagonismo, fraternidad y derramamientos de sangre. En la actualidad, los cetáceos representan mucho de la preocupación global por la conservación de la biosfera, por ello su estudio va más allá del simple interés científico (Medrano, 2009).

Los cetáceos (*Cetacea*) son un orden de mamíferos placentarios que viven exclusivamente en un ambiente acuático. Las 81 especies conocidas se dividen en dos subórdenes: *Mysticeti* y *Odontoceti*. Los Odontocetos (belugas, cachalotes, delfines, zifios y marsopas) representan la gran mayoría (70 especies), son cazadores con dientes, que utilizan para cazar peces, calamares, etc... Generalmente no mastican sus presas, las tragan directamente. Los Mysticetos están representados por 11 especies, todas ballenas con barbas de queratina, que se alimentan filtrando el alimento del agua.

Son mamíferos fusiformes, perfectamente adaptados al medio acuático, sin extremidades posteriores, y las anteriores transformadas en aletas. Poseen un largo cráneo que puede llegar a ocupar hasta 1/3 de la longitud total. El cuerpo termina en una sola aleta caudal de disposición horizontal, al contrario que la vertical de los peces, lo que quizá se relacione con facilitar el descanso en superficie de los cetáceos. Presentan un característico alargamiento, telescopización del cráneo y una migración de la cavidad respiratoria hacia la parte superior de la cabeza, donde se abren los espiráculos u orificios nasales. La piel está desprovista de pelo, excepto unas vellosidades en el hocico de algunos delfínidos; debajo de la dermis tienen una gruesa capa de grasa de aislamiento térmico (en inglés denominada *blubber*) que almacena energía, regula su temperatura y ofrece protección. Su corazón es de cuatro cámaras. No poseen orejas, y los ojos son relativamente pequeños. Su cerebro es grande en relación a su tamaño, con numerosas circunvoluciones en la corteza. Los pulmones son grandes y las costillas son libres, lo que significa que no están unidas ventralmente al esternón, permitiendo una gran plasticidad del volumen pulmonar. El diafragma se encuentra en posición oblicua respecto al eje del cuerpo. Todo ello permite que puedan colapsar los pulmones bajo efecto de la presión al bucear, evitando con ello síntomas de descompresión. Los machos poseen los testículos en el interior del abdomen, al igual que las hembras las glándulas mamarias, para no interferir con la hidrodinámica.

Los cetáceos pueden permanecer sumergidos durante un periodo variable de tiempo, que va desde pocos minutos en marsopas (familia *Phocoenidae*) hasta dos horas en el caso extremo del zifio de Cuvier (*Ziphius cavirostris*). Cuando emergen a la superficie exhalan el aire de sus pulmones a través del espiráculo. Como características comunes, se puede mencionar el sentido del olfato muy poco desarrollado y una buena visión tanto fuera como dentro del agua. La luz no alcanza grandes rangos en el mar, de modo que el sentido visual se restringe a distancias cortas. Sin embargo, el sonido se transfiere a grandes rangos en el medio acuático, y los cetáceos poseen un oído muy sensible. Esto les permite utilizar el sonido para mediar funciones vitales tales como la comunicación social, incluyendo el cortejo, la caza por ecolocalización (odontocetos) y la navegación.

El tamaño varía entre los 1,3 metros de longitud del cetáceo más pequeño, la vaquita marina (*Phocoena sinus*), y los 30 metros de la ballena o rorcual azul (*Balaenoptera musculus*), el animal más grande del mundo. Muy complejos son los rituales de cortejo. Según la especie, la gestación puede llegar a durar hasta 16 meses, y normalmente las hembras dan a luz una única cría que puede medir hasta más de un tercio del tamaño de la madre, y que alimentan con una leche especialmente nutritiva.

Todos son descendientes de animales terrestres que volvieron al agua después de haber vivido millones de años en la tierra. Parece que los ancestros de los cetáceos, los arqueocetos, aparecieron hace unos 50-55 millones de años, durante el Eoceno. Sucesivamente se diferenciaron los Subórdenes Odontocetos y Mysticetos, y las distintas familias. El análisis de ADN indica que los cetáceos deben incluirse en el grupo *Hippopotamidae*, orden *Artiodactyla*, el mismo que incluye a vacas, antílopes, ciervos, cerdos e hipopótamos. Todos ellos se aúnan actualmente en el orden *Cetartiodactyla*.

Muchas de las especies son cosmopolitas, y demuestran una estructura social muy avanzada. Sin embargo, la extremada sociabilidad de algunas especies de delfines, que se acercan sin miedo al ser humano, contrasta con el misterio que envuelve a muchas especies de zifios, algunos prácticamente desconocidos a los científicos.

Algunas especies, como las de la familia *Balaenidae*, hacen grandes migraciones estacionales: en la época veraniega se desplazan a los polos para alimentarse y en el invierno descienden a aguas tropicales para reproducirse. La alimentación es muy distinta según se trate de Mysticetos u Odontocetos. La dieta de los Mysticetos consiste en pequeños crustáceos, principalmente copépodos, aunque algunas especies también comen importantes cantidades de *krill* (pequeños crustáceos de la clase *Malacostraca*, orden *Euphausiacea*) que filtran a través

de las barbas. Las presas de los Odontocetos son de mayor tamaño. A pesar de que poseen dientes, estos sólo son funcionales para atrapar a la presa antes de que sea tragada; algunas especies a veces se alimentan en grupos, esto les facilita la búsqueda y la captura de las posibles presas (Fundación Keto, 2013).

La característica probablemente más fascinante es el sistema de comunicación sonora que estos seres poseen. Las ballenas se comunican entre ellas por medio de sonidos melódicos, mayormente de baja frecuencia, producidos por pliegues de su laringe parecidos a cuerdas vocales, y que se conocen popularmente como “canto de ballenas”. Estos también incluyen pulsaciones, zumbidos y chirridos. La especie más famosa por su canto es la yubarta o ballena jorobada; en ella, la explicación tradicional atribuye el canto a las ballenas macho, como una manera de seducir a las ballenas hembras mientras intentan reproducirse. Estas canciones cambian de estación en estación, y todos los machos en la manada cantan la misma. En realidad, los sonidos emitidos por los cetáceos no sólo sirven para la reproducción, sino también como forma de comunicación (Casado et al., 1997). Incluso hay sugerencias de que algunas especies, como el delfín mular (*Tursiops truncatus*) usan señales aprendidas para etiquetar individuos de la misma especie en su propio sistema de comunicación (King y Janik, 2013).

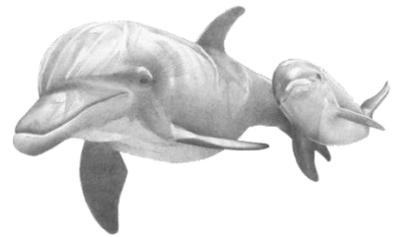
## ***1.2. El sistema inmune de los cetáceos***

La función última del sistema inmune es proteger contra enfermedades infecciosas, que pueden ser causadas por invasión de parásitos, virus, bacterias u otros microorganismos, y también para responder a condiciones aberrantes, como las células cancerosas. El sistema inmune se compone de una red compleja (*network*) de tejidos, células y moléculas que trabajan en conjunto para resistir a estos ataques. La respuesta inmune a los patógenos invasores consiste en dos sistemas funcionales separados, pero interconectados: inmunidad innata/no específica, e inmunidad adaptativa/específica; la diferencia más importante entre las dos funciones es que, a diferencia de la inespecificidad de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa actúa mediante una respuesta específica y mantiene “memoria” de los contactos con los antígenos. Juntas, las funciones innata y adaptativa proporcionan protección inmediata y de largo plazo contra patógenos infecciosos (Desforges et al., 2016).

Si bien muchos aspectos de la composición y función del sistema inmune de los mamíferos terrestres están bien conocidos, hay muy poca información disponible sobre el de los cetáceos. El sistema inmune de estos seres es interesante desde el punto de vista evolutivo y ambiental. Se cree que los mamíferos como grupo han desarrollado los sistemas inmunológicos más evolucionados y complejos, y su trasfondo evolutivo plantea la cuestión de

qué modificaciones se han producido en el sistema inmune de los cetáceos durante la adaptación a la vida en el mar. Además, las adaptaciones del sistema inmune al medio ambiente tienen implicaciones y aplicaciones multifacéticas para los cetáceos. Está generalmente aceptado que varios estímulos, como el estrés, podrían afectar la inmunocompetencia y la capacidad de un organismo para combatir las toxinas invasoras, los virus, y las bacterias, y en última instancia resultar en enfermedad o mortalidad (Romano et al., 2002).

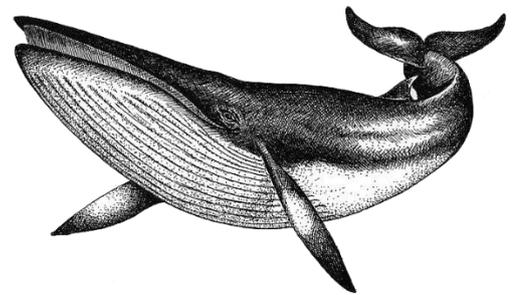
Existe un creciente número de impactos sinérgicos que experimentan los cetáceos en su medio natural, que pueden actuar como factores estresantes, y por tanto incidir en su sistema inmune. Estos impactos son, por ejemplo, la contaminación química, acústica y residuos sólidos y, en general, la degradación del hábitat y reducción de recursos tróficos. Por ello, el presente trabajo realiza una revisión de las características del sistema inmune de los cetáceos y los datos existentes sobre cómo puede verse afectado directa o indirectamente por factores de impacto antrópico.



# **Objetivo**

## *2. Objetivo*

En base a todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general del presente trabajo es la realización de una revisión bibliográfica para tratar los efectos de los contaminantes sobre el sistema inmune de cetáceos, que servirá de estudio previo para la redacción de una tesis doctoral que el alumno desarrollará en el Instituto de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, comenzando el en curso 2018-2019.



# **Metodología**

### *3. Metodología*

Para la consecución del objetivo fijado, se realizó una revisión de artículos que han representado un hito en la investigación sobre los efectos de la contaminación ambiental sobre el sistema inmune de cetáceos, y artículos publicados en revistas de elevado factor de impacto, encontrados gracias a motores de búsqueda de libre acceso como PubMed y GoogleAcademic, y descargados gracias a los catálogos digitales de la ULL y de la ULPGC.



# **Discusión**

## 4. Discusión

### 4.1. El sistema inmune de los cetáceos

#### 4.1.1. El sistema inmune innato

Este sistema consiste en tipos celulares y mecanismos bioquímicos para proteger al individuo en tiempos muy breves (minutos u horas) de la exposición a estímulos antigénicos. La primera defensa está representada por el sistema tegumentario, que no solo sirve como órgano de "barrera", sino también secreta una serie de "armas químicas", entre ellas las inmunoglobulinas de clase A (IgA), destinadas a reducir la probabilidad de que la integridad del individuo se vea afectada.

La caracterización de las células inmunes en mamíferos marinos se ha llevado a cabo utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales contra antígenos de superficie celular; entre ellos varios marcadores de agrupación de diferenciación, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y otras proteínas de superficie (Ross y De Guise, 2007).

Las células fagocíticas, implicadas en la destrucción rápida de patógenos invasores, tales como neutrófilos, macrófagos y células dendríticas, se caracterizaron primero en varias especies de cetáceos, y también se desarrollaron ensayos cuantitativos para medir la función de esas células. La función de las células Natural Killers (NK), linfocitos especializados implicados en la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales, se ha descrito en beluga (*Delphinapterus leucas*). También se han caracterizado proteínas de fase aguda, como la Proteína C Reactiva y la Haptoglobina, así como muchas citoquinas.

Las citoquinas son producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por leucocitos polimorfonucleares (PMN), células endoteliales, epiteliales, adipocitos, del tejido muscular (miocitos) y del tejido conjuntivo. Permiten una respuesta coordinada, a pesar de la gran complejidad del sistema inmune. Estas moléculas incluyen interferones (IFN), interleucinas (IL) y diversos factores de crecimiento y estimulación, por ejemplo Factor Estimulador de Colonias (CSF), Factor de Necrosis Tumoral (TNF), haptoglobinas, Proteína C reactiva. A través de sus interacciones con los receptores de superficie de varias células, las citoquinas funcionan para modular la proliferación y diferenciación de linfocitos, el desarrollo linfoide, el tráfico de células y la inflamación. Además, las citoquinas se pueden dividir en proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y TNF) y antiinflamatorias (IL-4, IL-10 e IL-13) y su patrón de secreción puede asociarse con respuestas predominantemente celulares y humorales.

Otra función del sistema inmune innato consiste en la activación del sistema del complemento, que potencia la respuesta inflamatoria, facilita la fagocitosis y dirige la lisis de patógenos, incluyendo la apoptosis.

#### ***4.1.2. El sistema inmune adquirido/adaptativo***

Este sistema evolucionó para combatir patógenos más allá del control de la inmunidad innata. Las principales células involucradas en la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos B y T, y las moléculas que secretan. Estos subconjuntos de células, morfológicamente indistinguibles, se han identificado a través de la expresión de antígenos de superficie. Las células T fueron reconocidas por la expresión de CD2, y otros subconjuntos por CD4 y CD8, mientras que las células B fueron reconocidas por las moléculas CD19 y CD21. Las subclases de inmunoglobulina se han purificado y cuantificado en plasma y/o se han secuenciado parcialmente en muchas especies de mamíferos marinos (Desforges et al., 2016). Se han identificado tres clases de inmunoglobulinas homólogas a IgG, IgM e IgA humanas en cetáceos (Romano et al., 2002). Los recién nacidos sólo poseen anticuerpos de la madre recibidos por transferencia placentaria (variable entre especies y tipo de placenta) y a través de la leche. Las inmunoglobulinas circulantes aumentan con la edad, a medida que los individuos se exponen progresivamente a nuevos microbios ambientales (Desforges et al., 2016). Juntas, las células B y sus anticuerpos secretados forman la respuesta inmune humoral que actúa contra patógenos extracelulares, mientras que diferentes subconjuntos de células T (células auxiliares, citotóxicas y reguladoras) median la inmunidad celular a través de interacciones con células presentadoras de antígeno (por ejemplo, macrófagos o células dendríticas). En última instancia, los linfocitos activados experimentan una expansión clonal masiva e interactúan con las células inmunes innatas, otros linfocitos y una ráfaga de citoquinas, para llevar a cabo una respuesta inmune impresionante y compleja con el objetivo de eliminar los patógenos (Desforges et al., 2016).

Los linfocitos son las células inmunes activas de la inmunidad adaptativa y se han desarrollado ensayos funcionales para evaluar su capacidad de proliferación y, por lo tanto, montar una respuesta inmune adecuada. Los mitógenos, proteínas que pueden inducir inespecíficamente la proliferación de linfocitos, pueden usarse para medir la actividad de las células B y T y algunos métodos han sido validados en mamíferos marinos; la concanavalina A (ConA) y la fitohemaglutinina (PHA) estimulan las células T, los lipopolisacáridos de *Salmonella typhimurium* (LPS) estimulan las células B, y el mitógeno extracto de la hierba carmín (*Phytolacca americana*) estimula las células B y T. De todas las respuestas inmunes medidas en estudios de inmunotoxicología en mamíferos marinos, la linfoproliferación es la más utilizada.

Los neutrófilos son los glóbulos blancos más abundantes en los mamíferos marinos y juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias, y como primera línea de defensa contra los microorganismos invasores, especialmente las bacterias. Los neutrófilos fagocitan y destruyen a los patógenos, y digieren el material fagocitado mediante procesos bioquímicos del estallido respiratorio. La fagocitosis puede medirse mediante la incorporación de perlas de látex fluorescentes por parte de los leucocitos, y cuantificarse usando citometría de flujo y fluorescencia. La actividad de estallido respiratorio también puede analizarse mediante citometría de flujo de fluorescencia, utilizando sondas específicas para medir la producción de especies reactivas de oxígeno, incluido  $H_2O_2$ .

Los nódulos linfáticos de la marsopa común (*Phocoena phocoena*) y del delfín común (*Delphinus delphis*) muestran una arquitectura inversa con ubicación central de folículos linfoides, como en los cerdos. A diferencia de los mamíferos domésticos, los ganglios linfáticos viscerales del delfín mular (*Tursiops truncatus*) se pueden distinguir de los ganglios linfáticos somáticos por la presencia de fibras de músculo liso dentro de la cápsula. En analogía, las fibras del músculo liso también se pueden encontrar en los ganglios linfáticos de beluga, y se supone que permiten el movimiento activo y la filtración del líquido linfático mediante la contracción capsular.

Además, fibras contráctiles capsulares y trabeculares están presentes en el bazo de las marsopas. Sin embargo, aunque se asemeja morfológicamente al bazo de mamíferos terrestres y focas, el pequeño tamaño del órgano en la mayoría de los cetáceos (aproximadamente solo 0.2% del peso corporal) limita la capacidad de almacenamiento de sangre esplénica. El bazo de los cetáceos es un órgano único, pero, a diferencia de otras especies, es común encontrar bazos accesorios múltiples en las ballenas y los delfines.

Las amígdalas orofaríngeas de las ballenas son órganos linfoepiteliales con múltiples criptas ramificadas y glándulas secretoras. Esta estructura anatómica, única en los cetáceos, representa un equivalente al anillo de Waldeyer de los mamíferos terrestres. Además, se ha descrito una glándula linfoepitelial compleja en la laringe de varias especies de cetáceos, incluidos los delfines mulares. Esta localización inusual permite la presentación del antígeno durante la inhalación.

A diferencia de los mamíferos terrestres, en algunas especies de cetáceos se encuentra un órgano linfoepitelial especial en el canal anal, denominado “amígdala anal”, que estaría involucrada en la protección constante contra los patógenos de la mucosa presentes en el agua durante el buceo.

Los órganos linfoides primarios y secundarios de las ballenas y los delfines muestran grandes similitudes con los de otras especies de mamíferos. Sin embargo, algunas estructuras linfoides, como las agregaciones linfoepiteliales en la laringe y el canal anal son únicas entre los cetáceos y no tienen equivalente en la *Nomina Anatomica Veterinaria*.

El sistema inmune representa así un conjunto delicado, complejo y coordinado, y está influenciado por su interacción con el medio en el que el organismo vive. La posición apical en la cadena trófica de los principales cetáceos predadores (grandes Odontocetos) los predispone a la bioacumulación de compuestos químicos persistentes. Cada vez hay más evidencia de un posible impacto negativo de los contaminantes ambientales en el sistema inmune y, posteriormente, en el estado de salud de los mamíferos marinos. El efecto de los xenobióticos sobre el sistema inmune, se ha establecido en roedores de laboratorio. Sin embargo, solo unos pocos estudios se centran en la influencia de estas sustancias en el sistema inmune de ballenas y delfines (Beineke et al., 2010). Así mismo, a pesar de la importancia de las células NK en la respuesta inmune contra las infecciones virales, existen muy pocos estudios sobre los efectos de los contaminantes en la actividad de estas células en mamíferos marinos.

También son escasos los estudios de la influencia de la exposición a contaminantes sobre la inmunidad humoral.

Las adaptaciones del sistema inmune al medio ambiente tienen implicaciones y aplicaciones multifacéticas para los cetáceos. Ahora se acepta generalmente que los estímulos estresantes, podrían afectar a la inmunocompetencia y a la capacidad de un organismo para combatir las toxinas invasoras, los virus y las bacterias que pueden comprometer el sistema inmune, y en última instancia resultar en enfermedad o mortalidad. La evidencia de una variedad de disciplinas apoya la presencia de una comunicación bidireccional entre el sistema nervioso y el sistema inmunológico.

Las investigaciones desarrolladas hasta la fecha han revelado pocas diferencias entre el sistema inmune de los mamíferos terrestres y de los marinos más estudiados, de modo que gran parte de nuestra comprensión de su funcionamiento en los mamíferos marinos proviene de la inmunología humana y de los roedores.

Mientras que los efectos de diversos factores estresantes, como el estrés térmico y las condiciones de vida en roedores, se miden con relativa facilidad, la investigación del estrés en el sistema inmune de los cetáceos es muy difícil. Esta dificultad se debe a la falta de viabilidad de realizar experimentos en cetáceos (mismas limitaciones que para humanos), disponibilidad limitada de tejidos, dificultades logísticas asociadas con la recolección de estos, y tiempos

*postmortem* prolongados, que comprometen la integridad de los tejidos a examinar (Romano et al., 2002).

Los estudios de laboratorio sobre cetáceos presentan a veces obstáculos insalvables para los investigadores, pues muchos de los reactivos disponibles para investigaciones sobre el sistema inmune de mamíferos terrestres, son inutilizables para los marinos, porque es necesario que posean probadas garantías de calidad, seguridad y eficacia, como establecido por el R. D. 1246/2008, de 18 de julio, antes de que se autorice su uso. Sin embargo, la disponibilidad de nuevos métodos aumenta constantemente (Mystic Aquarium Research, 2015).

En mamíferos marinos se ha propuesto que la incidencia de contaminantes podría estar relacionada con mortandades masivas, como por ejemplo en el caso de la epidemia de morbillivirus del delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) en el Mediterráneo en 1990 y 1991, o de la incidencia de tumores en belugas (*Delphinapterus leucas*) del golfo de San Lorenzo.

Sin embargo, aún es necesario mucho trabajo para identificar todos los elementos del sistema inmune de los cetáceos, explicar su funcionamiento, y estudiar las alteraciones que se producen en el sistema inmune como consecuencia de la exposición a diferentes agentes contaminantes.

## **4.2. Contaminantes químicos**

### **4.2.1. Compuestos orgánicos persistentes**

Entre los contaminantes químicos, los bifenilos policlorurados (PCB) siguen amenazando la supervivencia de los depredadores marinos. Los PCB están, según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), entre los doce contaminantes más nocivos fabricados por el ser humano. La legislación actual limita el uso de estos compuestos, por ejemplo dentro de la UE su uso sólo se permite dentro de los “sistemas cerrados”. Su fabricación está prohibida desde 1977 en Estados Unidos y desde 1983 en Alemania. Actualmente su uso está prohibido en casi todo el mundo. Gracias a estas restricciones legislativas, las concentraciones en los tejidos de estas sustancias, incluidos los PCB y el dicloro difenil tricloroetano (DDT) y sus derivados, han disminuido, y muchas poblaciones de fauna se han recuperado. Las concentraciones de DDT y de dieldrín también han disminuido significativamente en los depredadores marinos en Europa. Sin embargo, los niveles de PCB, tras una reducción gradual, han dejado de disminuir y todavía persisten a concentraciones excesivamente altas en algunos cetáceos, incluidas las orcas y los delfines mulares en el Atlántico nororiental y muchas especies de cetáceos en el mar Mediterráneo (Jepson y Law, 2016).

Una gran variedad de sustancias presentan la capacidad de actuar como imitadores hormonales y alterar el funcionamiento del sistema endocrino, y pueden desencadenar efectos adversos a distintos niveles en los organismos expuestos. El estudio de los efectos de estos compuestos sobre el sistema inmune es extremadamente complejo, pues se trata de un sistema cuyo funcionamiento se basa en un frágil equilibrio entre elementos celulares y humorales; además, el sistema inmune está relacionado con otros sistemas del organismo, y los mecanismos que rigen estas relaciones no están conocidos en profundidad.

Entre los compuestos para los que se ha confirmado este tipo de actuación, se encuentran varios contaminantes que pertenecen al grupo de los compuestos orgánicos persistentes y/o sustancias persistentes tóxicas, que, además de la toxicidad y la persistencia, son lipofílicos; estas características les confieren la capacidad de acumularse en los organismos vivos y biomagnificarse en la cadena trófica. Dentro de las sustancias con actividad hormonal destacan los compuestos aromáticos clorados (pesticidas organoclorados y PCB), metales pesados y compuestos organometálicos.

Los mamíferos marinos se encuentran entre los grupos de animales silvestres que muestran síntomas de daños endocrinos y reproductivos, como se refleja en la disminución significativa de algunas poblaciones. Sin embargo, pocos estudios han podido demostrar de forma inequívoca, que los contaminantes ambientales pueden alterar el sistema endocrino de estas especies, por el desconocimiento que todavía existe sobre la fisiología de sus sistemas hormonales, y sobre todo por las adaptaciones específicas y las diferentes estrategias utilizadas por cada especie para adaptarse a su medio (Carballo et al., 2004).

Se ha descrito una mayor incidencia de enfermedades neoplásicas en ballenas beluga (*Delphinapterus leucas*) del golfo de San Lorenzo en Canadá, contaminadas con benzo[a]pireno y PCB, potencialmente atribuibles a efectos cancerígenos o respuestas inmunes antitumorales reducidas debidas a factores ambientales (Jepson y Law, 2016).

Además, se ha observado una reducción de la proliferación de linfocitos T inducida por mitógenos, asociada con niveles elevados de PCB y DDT en sangre de delfines mulares en la costa de Florida, lo que sugiere una inhibición de la respuesta inmune celular inducida por contaminantes. En estudios de campo de poblaciones de marsopa común, la atrofia tímica y el agotamiento del bazo se correlacionaron significativamente con cargas corporales elevadas de polibromo difenil éter (PBDE, un retardante de llama) y PCB.

Los retardantes de llama bromados están considerados como productos muy peligrosos, pues son lipofílicos, persistentes y tóxicos para la vida silvestre y los humanos. En los mamíferos,

se han relacionado con la alteración de las funciones tiroideas, el desarrollo neurobiológico y la toxicidad/teratogenicidad. Los odontocetos parecen acumular niveles más altos de PBDE que los misticetos, debido a su diferente nivel trófico.

Otros compuestos utilizados como retardantes de llama son los Decloranos, que tienen una alta estabilidad química y una fotodegradación reducida. Solo recientemente los decloranos se han considerado en estudios de ecotoxicología, y se ha demostrado que se bioacumulan y biomagnifican a lo largo de las cadenas alimentarias (Zaccaroni et al., 2018).

Los principales cetáceos depredadores acumulan grandes cantidades de contaminantes ambientales lipófilos asociados con un deterioro del estado de salud. Por lo tanto, especies como las marsopas (*Phocoena phocoena*) del Mar del Norte y del Báltico, contaminadas con xenobióticos, como PCB y metilmercurio, se ven afectadas con mayor frecuencia por infecciones bacterianas y parasitismo que las marsopas de aguas menos contaminadas de Noruega, Islandia y Groenlandia (Beineke et al., 2010).

El tejido objetivo más común para controlar las concentraciones de estos compuestos es la grasa de aislamiento (*blubber*), donde se acumulan debido a su lipofilia. Además, es probable la transferencia madre-cría durante la lactancia.

La lipólisis y la movilización de compuestos lipófilos almacenados durante la emaciación pueden conducir a niveles elevados de xenobióticos sanguíneos observados en marsopas enfermas. Además, el agotamiento linfóide se asocia principalmente con niveles elevados de PBDE. Finalmente, la ausencia de correlación entre el estado de salud y el estado nutricional de los animales capturados, respalda la hipótesis de una inmunodeficiencia inducida por contaminantes.

Se ha verificado el efecto inmunotóxico *in vitro* de varios xenobióticos en leucocitos de sangre de cetáceos en concentraciones equivalentes a las observadas en poblaciones de mamíferos marinos de vida silvestre. Cabe destacar que el DDT y los congéneres de PCB no coplanarios (*non-dioxin-like*) inhiben la proliferación espontánea y la de mitógenos inducidos por las células linfoides de beluga, mientras que los congéneres de PCB coplanarios (*dioxin-like*) y la tetraclorodibenzo-dioxina (TCDD) no modulan la función leucocitaria. Otros experimentos *in vitro* confirman su efecto inhibitorio sobre la fagocitosis de neutrófilos y monocitos de delfines mulares y belugas (Beineke et al., 2010).

En ratones expuestos a 10µg/Kg de Declorano 602, se evidenció una interferencia con el sistema inmune, con disminución de linfocitos y deterioro del equilibrio entre las citoquinas Th2 y Th1. Las células T CD3<sup>+</sup> se redujeron significativamente. Se produjeron cambios similares en

la población de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y en los linfocitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, lo que indica una posible alteración de la función de los linfocitos T citotóxicos.

En el bazo, el RNAm que codifica las citoquinas Th2 típicas, que incluyen IL-10, IL-13 e IL-4, aumentó de manera significativa. Con respecto a las citoquinas Th1, los niveles de RNAm de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 mostraron una disminución significativa.

Las células Th1 inducen la producción de anticuerpos IgG<sub>2a</sub>, y las células Th2 promueven IgE e IgG<sub>1</sub>. IgG<sub>2b</sub> pueden producirse en respuesta a Th1 o Th2 en diferentes condiciones. Los niveles séricos de IgG<sub>1</sub> aumentaron de casi el 50% con respecto al grupo control. IgG<sub>2a</sub> mostró una disminución significativa de casi el 50%. No hubo diferencias significativas en la producción de IgE o IgG<sub>2b</sub> en comparación con los controles (Feng et al., 2016). Es muy probable que los cetáceos, al igual que los ratones, puedan estar afectados de la misma manera por estos contaminantes químicos (Desforges et al., 2016).

Ratas adultas alimentadas con arenques del Mar Báltico contaminados con compuestos organoclorados, mostraron una hipocelularidad con reducción de linfocitos T helper CD4<sup>+</sup> en el timo. Además, las ratas expuestas exhibieron una resistencia reducida contra infecciones experimentales por citomegalovirus. En ratas recién nacidas, la exposición produjo una disminución de la timopoyesis y una reducción de la proliferación de células T inducida por mitógenos. Además, en roedores neonatales intoxicados, se observó una actividad reducida de NK asociada a virus y producción de anticuerpos (Beineke et al., 2010).

El estudio del efecto de las citoquinas en mamíferos marinos es un campo relativamente nuevo y los estudios solo han aparecido en los últimos años. Las pocas investigaciones existentes en mamíferos marinos respaldan un modelo de modulación mediada por contaminantes de la función de los linfocitos mediante la supresión de IL-2 y la expresión estimulada de IL-4. IL-2 es una citoquina importante para la proliferación de células T, la activación de células NK y la producción de anticuerpos en células B. IL-4 es antiinflamatoria y promueve la diferenciación de células T en células Th2. Se ha demostrado una reducción de la expresión de IL-2 a pesar del aumento de la expresión de los genes de tirosina quinasa *Fyn* y *Lck*, que estimulan la señalización del receptor de células T, lo que sugiere que el efecto contaminante se produce durante la transducción de señales. El estudio de los efectos de los contaminantes sobre las citoquinas se complica aún más, por la gran variabilidad interindividual y temporal en la expresión de citoquinas durante las exposiciones. No obstante, el perfil de citoquinas es un campo nuevo y emocionante en inmunología y toxicología de mamíferos marinos y otros estudios arrojarán luz sobre los mecanismos de disrupción de citoquinas por contaminantes en mamíferos marinos.

#### 4.2.2. Metales pesados

Entre los metales pesados que pueden acumularse en el cuerpo de Odontocetos, la contaminación con mercurio es prominente. El mercurio se acumula en los órganos internos, especialmente en el hígado. La máxima concentración de este metal medida en un hígado de delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) hasta la fecha es de 1500 µg/g en peso húmedo, y 13156 µg/g en peso seco en un delfín mular (*Tursiops truncatus*). El metal entra en el organismo de los mamíferos marinos principalmente como metilmercurio, ya que casi todo el mercurio presente en pescado y calamares, de los que los cetáceos se alimentan, está metilado. Sin embargo, la mayor parte del mercurio acumulado en los órganos internos de los mamíferos marinos se encuentra en forma inorgánica. Se supone que la desmetilación del metilmercurio, seguida de la formación de un complejo menos tóxico de mercurio-selenio, se produce principalmente en el hígado. También está reconocido que otro metal pesado, el cadmio, se acumula en los órganos internos de Odontocetos, donde se une a las metalotioneínas, proteínas que poseen la función de detoxificación. Estas forman complejos con metales pesados tanto fisiológicos (zinc y cobre) como xenobióticos (como cadmio, mercurio y plata), a través de los grupos tiol (-SH) de sus residuos de cisteína, que representan casi el 30% de los aminoácidos constituyentes (Endo et al., 2004).

El mayor o menor carácter lipofílico del metal favorecerá decisivamente su concentración y acumulación en los tejidos grasos de las especies, y de esta manera algunos metales pueden aumentar su concentración a lo largo de la cadena trófica (biomagnificación). Hay que considerar la alimentación como la ruta de exposición más importante para muchos animales acuáticos, como es el caso de los cetáceos, y en particular los Odontocetos, animales superpredadores que se sitúan en la cúspide de la cadena alimenticia, frente a otro tipo de exposición debido a las bajas concentraciones que suelen detectarse en agua por el potente efecto de dilución del océano. También hay que tener en cuenta el largo período de vida de los cetáceos (entre 20 y 80 años generalmente, aunque algunas especies como la ballena de Groenlandia pueden superar los 100 años), por lo que hay que considerar de forma muy especial el daño provocado por exposiciones crónicas. La diana de estos compuestos es la espesa capa de tejido graso poseída por estos mamíferos, donde las moléculas lipofílicas tienden a acumularse (Cámara et al., 2003).

Mientras que en los machos la concentración de contaminantes bioacumulativos se incrementa de forma continua con la edad, en las hembras se estabiliza tras el primer parto, dado que muchos elementos son liposolubles y son transferidos a la cría a través de la leche materna. Esto abre la incógnita de cómo afectan los contaminantes a las crías en su desarrollo.

Dosis de metales inferiores a aquellas consideradas como tóxicas pueden afectar a los diferentes constituyentes del sistema inmunitario. Existen suficientes datos sobre la capacidad inmunosupresora de los derivados orgánicos o sales inorgánicas de Cd y Hg en animales expuestos a estos tóxicos y que posteriormente sufren infecciones. La forma de presentación de un metal es decisiva en su actividad inmunitaria. Así, la hidrosolubilidad de sales de Cd y Hg permite reaccionar con las proteínas séricas formando antígenos, y como consecuencia se puede alterar la inmunidad humoral. En contraste, la liposolubilidad de los compuestos orgánicos permite su transporte a través de las membranas y su acumulación en timo y linfocitos, por lo que se ve afectada la inmunidad mediada por células. Aparte de esto, ciertos metales como el níquel, el cobalto o el plomo, son conocidos alergizantes.

En general, los metales pesados pueden producir una variedad de efectos inmunomoduladores que, en última instancia van a dar lugar a un aumento de la susceptibilidad a infecciones o al desarrollo de tumores. Por otro lado, se ha postulado que la toxicidad de los metales, al menos en parte, puede ser debida a reacciones de autoinmunidad, ya que los principales órganos diana presentan alteración autoinmune. Un ejemplo de esto es la glomerulonefritis inducida por Cd o Hg. Además de producir efectos a nivel sistémico, estos metales pueden inducir alteraciones de diferentes componentes del sistema inmune, como una disminución de anticuerpos o alteración de la funcionalidad de linfocitos T y B, macrófagos y NK (Cámara et al., 2003).

Experimentos *in vitro* confirman la influencia negativa de los metales pesados sobre los leucocitos de delfines mulares. Particularmente, el mercurio y el cadmio disminuyen la viabilidad celular, la fagocitosis y la proliferación de leucocitos. Además, desencadenan la apoptosis de linfocitos en concentraciones equivalentes a las encontradas en cetáceos libres. De manera similar, la exposición *in vitro* al cloruro de mercurio y al cloruro de cadmio disminuye la proliferación de esplenocitos y timocitos de ballena beluga. Además, los compuestos de mercurio inducen la muerte celular de timocitos de beluga estimulados por mitógenos (Beineke et al., 2010).

La principal forma de mercurio hallada en los tejidos estudiados de los cetáceos varados es la orgánica, debido, probablemente, a su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica. Entre las acciones sistémicas inmunosupresoras del mercurio, destaca el aumento de la mortalidad frente a agentes infecciosos de animales expuestos a mercurio tanto en su forma orgánica como en la inorgánica. Otro efecto sistémico descrito es la alteración morfológica y del peso de órganos linfoides, como el timo y el bazo. Además de estos efectos más inespecíficos sobre el sistema

inmune, parece ser que el mercurio afecta tanto a la respuesta inmune humoral como a la celular. Numerosos estudios han demostrado que la exposición a mercurio reduce la inmunidad humoral en distintas especies, disminuyendo los niveles de anticuerpos frente a agentes infecciosos (Cámara et al., 2003).

El cadmio es uno de los metales pesados más tóxicos, y su importancia radica en su capacidad tóxica, su alta biodisponibilidad en el medio y su larga vida media en los tejidos. Su entrada al medio marino se produce a través de la deposición atmosférica y de los aportes de los ríos. El cadmio se acumula rápidamente en todos los organismos vivos a través del agua y del alimento, pudiendo llegar a alcanzar concentraciones cientos o miles de veces superiores a las detectadas en las aguas.

Existen estudios que indican que el sistema inmune es muy vulnerable a los efectos tóxicos del cadmio, aunque este efecto ha sido muy discutido. El tipo de respuesta que este metal puede provocar en la función inmune se puede ver afectada por diferentes factores como la dosis y el tiempo de exposición, la vía de administración y las especies animales investigadas.

En algunos casos se ha observado que el cadmio produce un efecto inmunosupresor, mientras que en otros se ha descrito cierta estimulación de las defensas del organismo frente a agentes patógenos. A pesar de estos resultados tan contrastantes entre ellos, muchos estudios sobre la susceptibilidad frente a infecciones por virus, bacterias o protozoos han mostrado que ésta se ve incrementada respecto a los individuos no expuestos al metal, alterando la inmunidad humoral y la celular.

En el caso de la inmunidad humoral, se ha visto que el cadmio puede alterar los títulos de anticuerpos en caso de exposición crónica. La inmunidad celular puede ver afectados tanto los linfocitos T como los linfocitos B, inhibiéndose la actividad mitótica de los primeros y potenciándose la transformación de los segundos. Las funciones de los macrófagos, incluyendo la fagocitosis, la actividad citolítica frente a células tumorales y la actividad enzimática pueden reducirse significativamente. También se ha observado una reducción de la actividad de las células NK (Cámara et al., 2003).

Un estudio sobre delfines mulares (*Tursiops truncatus*) demuestra que el cadmio a una concentración de 90µmol/l también puede dar lugar a cambios inmunotóxicos en los leucocitos, inducir la apoptosis y afectar la función de los linfocitos y la fagocitosis (Cámara Pellissó et al., 2008).

### 4.3. *El ruido*

Los océanos están llenos de sonidos naturales, creando paisajes sonoros que proporcionan información esencial para la fauna marina. Los sonidos pueden tener origen biológico y no biológico, desde el canto de las ballenas al ruido generado por los erizos de mar en los arrecifes, hasta el sonido del viento y las olas. Sin embargo, cualquier sonido puede considerarse como "ruido" cuando enmascara, o introduce ambigüedad en la recepción e interpretación de señales de interés de los animales, o cuando induce respuestas fisiológicas o de comportamiento perjudiciales (Aguilar de Soto y Kight, 2016).

El ruido submarino de fuentes antropogénicas ha aumentado en los últimos 50 años. Esta contaminación acústica es el subproducto de una cantidad creciente de actividades marítimas humanas, incluida la exploración sísmica de las industrias del petróleo y el gas, la navegación recreativa y el tráfico marítimo. En muchas áreas oceánicas, la fuente predominante de ruido de baja frecuencia generado por el hombre (20-200 Hz) proviene de las hélices y los motores de buques de transporte comercial. Estas frecuencias de sonido se pueden propagar de manera eficiente a largas distancias en el entorno marino de aguas profundas (Rolland et al., 2018).

También hay que tener en cuenta el impacto de los barcos utilizados para el ecoturismo, como causa de la alteración del comportamiento, de la fisiología del estrés, del sistema inmune y de la reproducción de los cetáceos. Por ejemplo, la exposición a actividades y ruidos generados por las embarcaciones de *whale whatching* altera el comportamiento y, por lo tanto, el gasto de energía en los cetáceos (French et al., 2017).

El ruido producido se superpone directamente a la banda de frecuencia de las señales de comunicación acústica utilizadas por los cetáceos con barbas, Mysticetos, que utilizan sonidos de baja y media frecuencia. Viviendo en un ambiente donde el sonido se propaga mucho mejor que la luz, muchos animales marinos, particularmente los cetáceos, evolucionaron para depender principalmente de la señalización acústica para comunicarse, localizar presas y navegar. El repertorio acústico de las ballenas con barba consiste en sonidos de baja frecuencia y longitud de onda larga, que se propagan de manera eficiente bajo el agua, lo que potencialmente permite la comunicación a grandes distancias en el océano abierto. Sin embargo, el ruido de los barcos también alcanza medias e incluso altas frecuencias ultrasónicas utilizadas por los odontocetos para comunicarse y ecolocalizar. Aunque las altas frecuencias no alcanzan distancias tan grandes, esto puede afectar a los cetáceos a rangos de centenares de metros (por ejemplo, Aguilar de Soto et al. 2006).

Niveles elevados de ruido subacuático de baja frecuencia cerca de rutas de transporte y puertos congestionados pueden interferir significativamente (enmascaramiento acústico) con las llamadas de ballenas utilizadas para mantener el contacto, agregarse para alimentar y localizar compañeros potenciales, lo que podría afectar eventos críticos del ciclo vital.

Los mamíferos marinos pueden mostrar respuestas primarias al estrés (por ejemplo, cortisol plasmático), secundarias (por ejemplo, glucosa en sangre y parámetros hematológicos) y terciarias (por ejemplo, crecimiento, comportamiento y mortalidad), relacionadas con la exposición al ruido. Los efectos, letales y subletales, pueden ocurrir como consecuencias directas de la exposición al ruido, o indirectamente debido a respuestas conductuales inducidas por estímulos de ruido. Esto puede ocasionar varamientos, desorientación, reducción de la eficiencia de búsqueda de alimento, alteración de otras funciones biológicas importantes para la homeostasis. El estrés puede tener efectos en el sistema inmunitario y reproductivo a través de vías hormonales que involucran la liberación de catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina) por parte de la médula suprarrenal, y la liberación de gluco y mineralcorticoides por parte del eje hipotálamo hipofisario.

El ruido es un factor de estrés importante en cetáceos. La exposición a ruido intenso puede causar pérdida de audición evidenciada por cambios de umbral temporal o permanente en la sensibilidad de un animal a la totalidad o parte de sus frecuencias sónicas. Además, el ruido puede causar necrosis celular (incluyendo hinchazón y ruptura de la membrana) y apoptosis celular (Aguilar de Soto y Kight, 2016).

Los trágicos acontecimientos del 11 de septiembre de 2001 (9/11 en adelante) permitieron evaluar los efectos del ruido subacuático en las ballenas francas occidentales del Atlántico norte (*Eubalaena glacialis*). Estas ballenas se reúnen a fines del verano en la Bahía de Fundy, Canadá, para alimentar y amamantar a sus crías. En comparación con otros hábitats, la bahía tenía los niveles más altos de ruido de baja frecuencia de fondo asociado con el tráfico de buques pesados, y se observó que las frecuencias de las llamadas ascendentes de ballenas francas eran significativamente más altas en este hábitat. Inmediatamente después del 11 de septiembre, hubo una marcada disminución en el tráfico marítimo en la bahía, y las grabaciones acústicas revelaron una disminución notable en los niveles de ruido de fondo de baja frecuencia, acompañado de una reducción significativa de los niveles de hormonas relacionadas con el estrés, como el cortisol (Rolland et al., 2012).

En este estudio, se determinaron los metabolitos de las hormonas fecales relacionadas con el estrés durante la temporada de campo de 2001 y durante los cuatro años siguientes. Se

analizaron las grabaciones acústicas tomadas mediante hidrófonos y los datos de tráfico de buques junto con las medidas de estrés fisiológico de los glucocorticoides fecales (fGC) antes y después del 11 de septiembre. La disminución del ruido submarino de fondo posterior al 11/09, debido a la reducción del tráfico de grandes buques, correspondió a una disminución en los niveles de la hormona fGC relacionada con el estrés en las ballenas francas.

Los análisis acústicos mostraron una disminución de 6 dB en el ruido de fondo general (50 Hz-20 kHz) en las grabaciones realizadas después del 11 de septiembre. Más importante aún, el espectro de ruido cambió drásticamente, con una reducción significativa del ruido por debajo de 150 Hz. Los registros del programa de monitoreo del tráfico de buques en la Bahía de Fundy confirmaron una disminución en el tráfico de grandes buques después del 11 de septiembre.

En el mismo periodo se recolectaron muestras fecales de ballenas francas y se midieron los metabolitos de las hormonas reproductivas (estrógenos, andrógenos y progestinas) y los glucocorticoides suprarrenales (GC). Las hormonas esteroides circulantes se metabolizan en el hígado y se excretan en la bilis (y la orina), y los metabolitos resultantes se pueden medir en las heces. El patrón de metabolitos fecales refleja el nivel promedio de hormona parental circulante con un tiempo de retraso de horas a días, dependiendo de las tasas de recambio hormonal y del tiempo de tránsito gastrointestinal para la especie. Las concentraciones de fGCs reflejan la activación suprarrenal y los niveles relativos de estrés fisiológico en una amplia variedad de animales, incluidas las ballenas francas del Atlántico Norte.

Se asistió a una disminución significativa de fGCs después del 11 de septiembre hasta todo el año 2001. Si bien los datos muestran una variabilidad anual en los niveles de fGC, la tendencia dominante fue el aumento de la concentración de fGC en los tres años siguientes (Roland et al., 2012).

Mamíferos terrestres y acuáticos comparten la estructura general del oído interno y las inervaciones del sistema auditivo. Por lo tanto, es posible utilizar estudios previos sobre mamíferos terrestres para predecir los mecanismos de impacto de la exposición al ruido en mamíferos acuáticos. En los mamíferos terrestres, la gran amplitud y el aumento rápido de blastos dan como resultado un aumento de la presión del líquido cefalorraquídeo que, a su vez, puede causar rupturas de las membranas de las ventanas timpánica, ovalada y redonda y provocar la rotura o desprendimiento de los huesecillos del oído (martillo, yunque y estribo) (Aguilar de Soto y Kight, 2016).

Otro caso emblemático ocurrió en 2002 en las Islas Canarias, donde numerosos cetáceos aparecieron varados en las playas del sur de Fuerteventura tras el desarrollo de maniobras navales de la OTAN durante las que se utilizaron aparatos sonar. Entre ellos, 14 zifios de Cuvier (*Ziphius cavirostris*) encontraron la muerte. Los estudios realizados confirmaron un cuadro de embolias grasas resultando en hemorragias multiorgánicas (Jepson et al., 2003). Posteriormente se descubrieron también embolias gaseosas (Fernández et al. 2005).

Los émbolos gaseosos/grasos encontrados durante las necropsias de los zifios varados, proporcionaron evidencia diagnóstica excepcional que relacionaba la mortalidad de estas especies con la exposición al ruido. El zifio de Cuvier es el mamífero que mayor profundidad y tiempo puede estar sumergido, pudiendo permanecer hasta 137 minutos bajo el agua y llegar a una profundidad de casi 3000 metros. Esto puede explicar por qué otras especies de cetáceos no parecen desarrollar síndrome de émbolos gaseosos/grasos en respuesta a la exposición del sonar (Aguilar de Soto y Kight, 2016).

Dependiendo del tipo de sonar utilizado, pueden producirse efectos sobre los cetáceos hasta a 100 kilómetros de distancia. Aunque se propuso que el daño de los sonares podría deberse a resonancias provocando la vibración de todas las cavidades del cuerpo, de la tráquea, las mandíbulas, los espacios craneales (senos) y los órganos internos, con mayores repercusiones sobre aquellos que contienen aire, y puede provocar hemorragias en los pulmones y los oídos, incluso destruirlos (Oceana, 2004), realmente estas resonancias podrían ocurrir solo para frecuencias bajas y a distancias mucho más cortas que las que se han evidenciado que dañan a los zifios. Por ello, la hipótesis más aceptada actualmente es que los zifios reaccionan con una respuesta comportamental de estrés agudo a la exposición a sonares de alta intensidad, que alteran su homeostasia y los mecanismos fisiológicos que controlan el equilibrio de gases en condiciones normales. Todo ello desemboca en las embolias gaseosas y grasas descubiertas en las necropsias.

La excepcionalidad de los hechos hizo que en 2004 se aprobara una moratoria anti-sonar en los mares del archipiélago, que ha sentado un precedente internacional y ha prevenido nuevas mortandades atípicas de zifios en la última década (Fernández et al., 2013). Se calcula que esta medida ha reducido hasta en un 25% la muerte de cetáceos derivada de la acción humana en Canarias, una cifra que en el caso de los zifios alcanza el 60% (MARCET, 2017).

Para todos los animales marinos, independientemente de su edad, el ruido es un factor estresante potente que estimula el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA). Un aumento en el ruido ambiente, generalmente dominado por el ruido de los barcos, podría generar en algunos

casos un aumento en los niveles de cortisol, mientras que su disminución produce una reducción en los niveles de esta hormona, lo que sugiere una correlación positiva y directa entre el ruido y el eje HHA. También se ha demostrado en los delfines en cautividad que existe una correlación directa entre la intensidad del ruido y la frecuencia cardíaca, lo que confirma aún más la activación del eje HHA por la exposición al ruido (Nabi et al., 2018).

En presencia de ruido antropogénico intenso, algunos mamíferos marinos modifican su comportamiento, aumentando la duración de la inmersión y la velocidad, y alterando la sincronía respiratoria. Todas estas actividades pueden reducir la eficiencia de búsqueda de alimento.

En un estudio de marcaje de zifios de Cuvier, se detectó una reducción del 50% en la eficiencia de la alimentación de un individuo marcado que coincidió con el paso de un gran buque incrementando el ruido de fondo. Si esto es una reacción habitual, en zonas de alto tráfico marino la alteración del comportamiento puede afectar el equilibrio energético de los animales, lo que puede tener consecuencias negativas adicionales. Por ejemplo, si los mamíferos marinos gastan más energía de la que ingieren, el animal podría sobrevivir y crecer, pero no quedará energía suficiente para la reproducción, la lucha contra las enfermedades y la migración. Algunos mamíferos marinos dejan de alimentarse en presencia de buques, lo que puede reducir o incluso detener la adquisición de energía.

Esto pone al animal en riesgo de tener energía insuficiente para la reproducción. La baja o nula energía excedente en mamíferos marinos compromete el embarazo y la lactancia. En un período con baja o nula energía excedente, la edad de inicio de la pubertad, la gametogénesis, la calidad y la viabilidad de los gametos, e incluso la ovulación se ven afectados en ballenas francas del Atlántico Norte. El sistema inmune en mamíferos marinos que carecen de energía deja de funcionar, haciendo que sea más expuesto a enfermedades infecciosas, y afectar negativamente la reproducción (Nabi et al., 2018).

La exposición de una marsopa común en cautiverio a varias sesiones de ruido de 1 hora determinó un aumento en el nivel de esfuerzo y ansiedad del animal, evidenciado por una mayor velocidad de natación, aumento del 7% de la tasa de respiración y del número de saltos (Kastelein et al., 2015).

Las respuestas de los cetáceos al aumento del ruido de fondo incluyen, en algunos casos: desplazamiento de hábitat, cambios de comportamiento y alteraciones en patrones de vocalización como cambio de banda de frecuencia o nivel de energía de las llamadas, hacer señales más largas o más repetitivas, o esperar hasta que el ruido se reduzca para vocalizar

(Rolland et al., 2018). Los efectos negativos producidos por la contaminación acústica podrían tener además un efecto acumulativo, que es necesario estudiar a largo plazo. Hasta la fecha, los diversos estudios realizados sobre los efectos negativos en los organismos marinos han sido, en su gran mayoría, estudios a corto plazo. Las consecuencias a largo plazo son difíciles de estudiar y prever, pero en todo caso, deben ser tenidas en cuenta. Asimismo, si a los efectos negativos a corto plazo se unen las consecuencias no demostradas, pero fácilmente extrapolables (aparición de patologías crónicas, afectación del sistema inmunitario por una tasa de estrés mantenida, efectos en la reproducción, etc.), los efectos del ruido aparecen como un factor de riesgo para la supervivencia de algunas poblaciones amenazadas (SEC, 2005).

#### **4.4. Factores biológicos**

Una grave amenaza para la salud y el bienestar de los cetáceos está representada por las infecciones víricas, fúngicas y bacterianas. Aunque la evaluación del estado de salud de los cetáceos silvestres es difícil de llevar a cabo sin captura, las lesiones cutáneas, como lobomycosis por *Lacazia loboi*, dermatitis causada por herpesvirus y lesiones romboidales causadas por *Erysipelothrix rhusiopathiae*, una enfermedad potencialmente letal, proporcionan evidencia visible de enfermedad. En consecuencia, la creciente prevalencia de lesiones cutáneas en cetáceos puede indicar inmunidad debilitada, posiblemente como resultado del estrés causado por la perturbación ambiental, la degradación del hábitat debido al aumento de los efectos antropogénicos, la infección simultánea y/o la presencia de contaminantes en el medio ambiente (Powell et al., 2018).

Los contaminantes antropogénicos se han relacionado con la supresión inmune en mamíferos marinos; por lo tanto, los altos niveles de exposición a los PCB podrían contribuir a la mayor prevalencia de lesiones en la piel entre estos animales, debido a la incapacidad para combatir a los patógenos (Hart et al., 2012).

Desde 1988, se han observado mortalidades masivas devastadoras debido a infecciones por morbilivirus asociadas con inmunosupresión inducida por el virus en diferentes especies de mamíferos marinos en todo el mundo. Además, se detectaron concentraciones elevadas de xenobióticos en los delfines listados (*Stenella coeruleoalba*) que murieron durante la epidemia por morbilivirus en el mar Mediterráneo durante 1990 y 1991, lo que generó especulaciones sobre la contaminación ambiental como factor implicado en los brotes de enfermedades (Beineke et al., 2010).

La epidemiología de las lesiones cutáneas denominadas “tatuajes” ha sido relativamente bien estudiada en odontocetos pero no en los mysticetos. La infección se caracteriza por lesiones

de la piel irregulares, grises, negras, blanquecinas o amarillentas que, con alguna experiencia, se distinguen fácilmente macroscópicamente de otros tipos de afecciones y cicatrices de tegumentos, incluso en cetáceos libres.

Mientras que la evidencia fotográfica de tatuajes está limitada a las áreas que frecuentemente sobresalen la superficie del agua, como el lado dorsal y la aleta dorsal, se han fotografiado lesiones en todo el cuerpo.

Estas lesiones están producidas por un poxvirus, y se han encontrado en numerosas poblaciones de cetáceos, tanto Odontocetos como Mysticetos, como es el caso de delfines mulares (Powell et al., 2018) y ballenas jorobadas (*Megaptera novaeangliae*) (Van Bresse et al., 2014). Se trata de poxvirus relacionados entre sí, pero distintos.

La infección viral se manifiesta como lesiones del diámetro de hasta 5cm, planas y redondas con coloración oscura, un patrón punteado característico y un borde más oscuro que se decolora hasta un color más claro antes de desaparecer por completo. Por el hecho de que las partes visibles del cuerpo de un cetáceo están limitadas a las que pueden verse y fotografiarse durante las emersiones, existe un registro muy extenso de imágenes de lesiones dorsales en animales vivos. Sin embargo, durante las necropsias, en muchos casos es posible detectar lesiones de tipo tatuaje en todo el cuerpo del animal.

En un estudio realizado en el sitio de Shark Bay, en Australia, proclamado Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO, la prevalencia de lesiones similares a tatuajes en la población de delfines mulares fue del 19,4% (Powell et al., 2018), aunque otro estudio realizado en el Atlántico del Noreste demuestra que la prevalencia de lesiones cutáneas entre delfínidos varían entre 48% y 100%, y 63% a 100% para los delfines mulares (Hart et al., 2012). Una investigación llevada a cabo sobre una población no migratoria de ballenas jorobadas a lo largo de la costa de Omán, demostró que 13 de 60 ejemplares (21.7%) presentan este tipo de lesiones (Van Bresse et al., 2014).

Aunque la presencia de lesiones no se asocia significativamente con la mortalidad, podría ser indicativa de un sistema inmune debilitado y, junto con infecciones o tensiones concurrentes, podría ser un factor en la mortalidad de las crías. Los animales mayores de 9 meses tienen más probabilidades de tener la enfermedad que los animales más jóvenes, probablemente por la protección proporcionada por la leche materna. Se sugiere que los tatuajes pueden ser un buen indicador de la salud de la población. La documentación cuidadosa de la prevalencia y la edad específica de estas y otras lesiones cutáneas en cetáceos puede ser un bioindicador del deterioro de las condiciones ambientales (Powell et al., 2018).

#### 4.5. *El estrés*

El estrés rompe el equilibrio de un organismo, es decir, su estado homeostático, como consecuencia de la acción de un estímulo, proveniente del exterior o de su interior, que recibe el nombre de agente estresante. Como respuesta a este estímulo, se desencadenan una serie de reacciones de comportamiento y/o fisiológicas con el fin de adaptarse lo mejor posible a esta nueva situación. En esta respuesta el organismo activa su eje hipotálamo-simpático-cromafin y el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

Desde el punto de vista fisiológico la reacción al estrés es beneficiosa para el animal, ya que le permite recuperar su estado homeostático anteriormente alterado. Sin embargo, si la situación de estrés se convierte en crónica, el animal ya no tiene tanta capacidad para reaccionar y eso repercute en los procesos de crecimiento, reproductivos, osmorreguladores e inmunitarios, que se reflejan a nivel de organismo, población y comunidad.

Los factores estresantes potenciales que se encuentran en la naturaleza incluyen enredos en las redes de pesca, el contacto con contaminantes ambientales (incluida la contaminación por metales pesados, petróleo o ruido, entre otros), así como los cambios extremos en la temperatura ambiental, por ejemplo debido al cambio climático. También puede haber estrés nutricional si se reducen los recursos tróficos. Los cetáceos en cautiverio están sujetos a otros factores estresantes, representados por las condiciones de mantenimiento, incluido el tamaño del recinto y el contacto con individuos particulares alojados en el mismo. Además, el contacto con humanos y el régimen de entrenamiento o el nivel de dificultad de las tareas requeridas, pueden actuar como factores estresantes (Beineke et al., 2010).

Aunque son sobradamente conocidos los efectos positivos de la activación del sistema de estrés, con la consiguiente producción y liberación de glucocorticoides y catecolaminas (hormonas de estrés), tanto el hombre como los animales pueden verse afectados adversamente por sus efectos, desarrollando respuestas que causan un notable deterioro de su condición física e incluso la muerte.

Una posible consecuencia del estrés sobre los cetáceos son los varamientos. De hecho, varamientos y muertes masivas de cetáceos han aumentado en la última década. Son emblemáticos los casos del varamiento masivo de más de 600 calderones (*Globicephala melas*) en las costas de Nueva Zelanda en 2015, de los que más de 300 murieron, o la muerte de más de 300 rorcuales norteros (*Balaenoptera borealis*) en la costa de Chile en 2017.

Se han propuesto muchas teorías para explicar por qué ocurren los varamientos; sin embargo, ninguna teoría única ha encontrado un acuerdo unánime en la comunidad científica. Una característica común subyacente de los encallamientos de cetáceos es el estrés. No se sabe en qué

medida el estrés de un varamiento puede contribuir a la supresión de las respuestas inmunes, aunque en los roedores, que representan el modelo de estudio, muchos factores estresantes agudos y crónicos, incluidos los factores estresantes psicológicos, pueden inducir la inmunosupresión. Factores como estos pueden estar involucrados en los mamíferos acuáticos estresados e inmunodeprimidos, quizás contribuyendo a procesos infecciosos que finalmente están implicados en su muerte.

En el ser humano y en muchos animales terrestres, está reconocida la relación entre el estrés y el sistema inmune como factor determinante en la aparición de enfermedades de vario tipo. Sin embargo, el conocimiento de los efectos del estrés sobre el sistema inmune de la mayoría de las especies de mamíferos marinos sigue siendo fragmentario. También hay pocos estudios comparativos entre poblaciones silvestres y en cautividad, que podrían proporcionar nuevos datos. En este sentido, se han comparado marcadores endocrinos e inmunológicos de delfines mulares silvestres y de cuidado controlado, que están sujetos a una variedad de condiciones ambientales. Los niveles de hormona adrenocorticotropa (ACTH) más elevados se detectaron en ejemplares de vida libre. No se demostraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol. Por el contrario, los delfines de vida libre presentaron niveles muy elevados de epinefrina (Fair et al., 2017).

Se ha demostrado que en beluga y delfines mulares en cautividad, los niveles de indicadores de estrés, como las catecolaminas, aumentan (Romano et al., 2004). Entre los glucocorticoides, la aldosterona es un mejor indicador del estrés en los cetáceos que el cortisol (Thomson y Geraci, 1986).

Entre los parámetros más importantes, se observan concentraciones de leucocitos totales significativamente mayores en los grupos de delfines salvajes frente a los delfines en cautividad. También se detectan diferencias significativas en numerosos parámetros relativos al sistema inmune. En general, los delfines en cautividad presentan números absolutos significativamente más bajos que los delfines salvajes de células MHCII<sup>+</sup>, linfocitos T CD2<sup>+</sup>, linfocitos T helper CD4<sup>+</sup> y linfocitos B CD21 maduros. Los niveles séricos de IgG son significativamente más bajos en los grupos de delfines de atención administrada en comparación con los grupos de delfines salvajes. En general, las células NK de los delfines cautivos son más activas.

Los delfines cautivos presentan niveles significativamente más bajos de transcritos que codifican las dos citoquinas proinflamatorias IL-17 y TNF, el antiviral MX-1 e INF $\alpha$ , y el factor regulador IL-10. Las concentraciones de IL-2R $\alpha$  y CD69, marcadores asociados con la activación de linfocitos, presentan valores menores en los delfines de vida libre (Fair et al., 2017).



**Conclusiones**

## 5. Conclusiones

- 1- En la literatura hay un discreto número de estudios sobre el sistema inmune de los cetáceos, pero muchos de ellos no son concluyentes. Esto se debe a que el estudio del sistema inmune en cetáceos es muy complejo; además, en muchos casos, por la dificultad de obtener muestras, se toman como modelos otros mamíferos como ratas y humanos.
- 2- Los compuestos orgánicos persistentes se han relacionado con el aumento de las enfermedades neoplásicas en beluga, disminución de la proliferación de los linfocitos T (inhibición de la respuesta inmune celular) en delfín mular, y con atrofia tímica, agotamiento del bazo, infecciones bacterianas y parasitosis en marsopa. En ratones se evidenció una disminución de linfocitos y deterioro del equilibrio entre las citoquinas Th2 y Th1. Además, se ha demostrado *in vitro*, y sucesivamente *in vivo*, una disminución de IL-2, y un aumento de IL-4.
- 3- Mercurio y cadmio podrían producir daños debido a reacciones autoinmunes (glomerulonefritis), disminución del título de anticuerpos, alteración de la funcionalidad de los linfocitos T y B, de los macrófagos y de las células NK. Hg y Cd *in vitro* en delfines mulares disminuyen la viabilidad celular, la fagocitosis y la proliferación de linfocitos. Además, desencadenan la apoptosis de linfocitos.
- 4- En muchos casos el efecto del ruido sobre el sistema inmune es indirecto: las alteraciones del comportamiento y la reducción de la búsqueda de alimento, producidos por los efectos del ruido, conllevan desórdenes inmunológicos, que exponen el animal a enfermedades infecciosas. El ruido estimula el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, aumentando los niveles de glucocorticoides. Además, se ha demostrado la correlación entre los niveles de ruido y la frecuencia cardíaca.
- 5- Entre los factores biológicos, hay que destacar la inmunosupresión en caso de infección por morbilivirus, además de un nivel elevado de xenobióticos en delfines listados enfermos. En muchas especies de cetáceos se encuentran lesiones típicas de la piel (tatuajes) producidas por poxvirus, cuya presencia podría indicar un sistema inmune debilitado.
- 6- El conocimiento de los efectos del estrés sobre el sistema inmune de los cetáceos es fragmentario. Serían necesarios muchos estudios comparativos entre animales en cautividad y de vida libre. Los indicadores de estrés aumentan en animales en cautividad. El número de leucocitos es mayor en animales de vida libre que en los cautivos. Generalmente, en los delfines cautivos se registra una sobrerregulación del sistema inmune.

## 5. Conclusions

- 1- In the literature there is a discrete number of studies, but many of them are not conclusive. The study of the immune system in cetaceans is very complex; In addition, in many cases, due to the difficulty of obtaining samples, other mammals such as rats and humans are taken as models.
- 2- Persistent organic compounds have been associated with increased neoplastic diseases in beluga, decreased T cell proliferation (inhibition of cellular immune response) in bottlenose dolphins, and with thymic atrophy, spleen depletion, bacterial infections and parasitosis in porpoise. In mice, was seen a decrease in lymphocytes and deterioration of the balance between *Th2* and *Th1* cytokines. In addition, a decrease in IL-2 and an increase in IL-4 have been demonstrated *in vitro* and successively *in vivo*.
- 3- Heavy metals such as mercury and cadmium cause damage due to autoimmune reactions (glomerulonephritis), decreased antibody titer, impaired functionality of T and B lymphocytes, macrophages and NK cells. In bottlenose dolphins these metals decrease *in vitro* cell viability, phagocytosis and lymphocyte proliferation. In addition, they trigger lymphocyte apoptosis.
- 4- In many cases the effect of noise on the immune system is indirect: behavioral alterations and reduction of harvesting for food, produced by the effects of noise, lead to immunological disorders, which expose the animal to infectious diseases. Noise stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, increasing glucocorticoid levels. In addition, the correlation between noise levels and heart rate has been demonstrated.
- 5- Among the biological factors, immunosuppression caused by morbillivirus infection should be highlighted, in addition to an elevated level of xenobiotics in sick dolphins. In many species of cetaceans is it posible to detect some typical lesions of the skin (tattoos) produced by poxviruses, whose presence could indicate a weakened immune system.
- 6- The knowledge of the effects of stress on the immune system of cetaceans is fragmentary. Many comparative studies between captive and free-living animals would be necessary. Stress indicators increase and upregulation of the immune system is recorded in animals in captivity.



# **Bibliografía**

## Bibliografía

- Aguilar de Soto, N., Kight, C. (2016). Physiological effects of noise on aquatic animals. In Solan, M. and Whiteley, N. M. (Ed.), *Stressors in the Marine Environment: Physiological and ecological responses; societal implications* (pp. 135-158). Oxford, Inglaterra. Oxford University Press
- Aguilar de Soto, N., Diaz, F., Carillo, M., Brito, a, Barquín, J., Alayón, P., Falcón, J., González, G. (2001). Evidence of disturbance of protected cetacean populations in the Canary Islands. *Paper to the Scientific Committee at the 53rd Meeting of the International Whaling Commission*, (January), 3–16.
- Sociedad Española de Cetáceos (SEC). 2005. Protocolos especiales de las redes de varamiento y centros de recuperación, para la monitorización de los efectos de las prospecciones sísmicas en la fauna marina, especialmente en los cetáceos. Recuperado de: <http://cetaceos.com/wp-content/uploads/2016/12/Protocolo-CR-Prospecciones.pdf>
- Beineke, A., Siebert, U., Wohlsein, P., & Baumgärtner, W. (2010). Immunology of whales and dolphins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2–4), 81–94. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.06.019>
- Cámara Pellissó, S., Muñoz, M. J., Carballo, M., 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(3–4), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.09.009>
- Cámara, S., Esperón, F., de la Torre, A., Carballo, M., Aguayo, S., Muñoz, M., Sánchez, J. (2003). Inmunotoxicidad en cetáceos. Parte I: metales pesados. *Revista Canaria de Las Ciencias Veterinarias*, 3(1), 30–45.
- de Vere, A. J., Lilley, M. K., & Frick, E. E. (2018). Anthropogenic impacts on the welfare of wild marine mammals. *Aquatic Mammals*, 44(2), 150–180. <https://doi.org/10.1578/AM.44.2.2018.150>
- Desforges, J. P. W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S., Dietz, R. (2016). Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.007>
- Endo, T., Haraguchi, K., Cipriano, F., Simmonds, M. P., Hotta, Y., Sakata, M. (2004). Contamination by mercury and cadmium in the cetacean products from Japanese market. *Chemosphere*, 54(11), 1653–1662. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.09.029>
- Fair, P. A., Schaefer, A. M., Houser, D. S., Bossart, G. D., Romano, T. A., Champagne, C. D., Stott, J. L., Rice, C. D., White, N., Reif, J. S. (2017). The environment as a driver of immune and endocrine responses in dolphins (*Tursiops truncatus*). *PLoS ONE*, 12(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176202>

- Fernández, A., Arbelo, M., Martín, V. (2013). No mass strandings since sonar ban. *Nature*, **497**, 317.
- Fernández, A. M., Edwards, J. F., Rodríguez, F., Espinosa de Los Monteros, A., Herráez, P., Castro, P., Jaber, J. R., Martín, V., Arbelo, M. (2005). “Gas and fat embolic syndrome” involving a mass stranding of beaked whales (Family *Ziphiidae*) exposed to anthropogenic sonar signals. *Veterinary Pathology*, *42*, 446-457.
- Fernández Casado, M., Fernández López, E., López Jaime, J. A., Maldonado Warden, D., Martín Jaime, J. J., Mons Checa, J. L., Rodríguez Rodríguez, J. A., Rueda Ruiz, J. (1997). Mysticetos en el Mar de Alborán. In: *Mamíferos marinos y tortugas del Mar de Alborán. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Andalucía (Ed.). Málaga, p.69-77. 1997.*
- French, S. S., Neuman-Lee, L. A., Terletzky, P. A., Kiriazis, N. M., Taylor, E. N., DeNardo, D. F. (2017). Too much of a good thing? Human disturbance linked to ecotourism has a “dose-dependent” impact on innate immunity and oxidative stress in marine iguanas, *Amblyrhynchus cristatus*. *Biological Conservation*, *210* (April), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.04.006>
- Fundación Keto (2006-2013). Cetáceos. Ballenas, delfines y marsopas. San José, Costa Rica. Retrieved from <http://www.fundacionketo.org/cetaceos-alimentacion.php>
- Guevara, C. (2004). Muerte de cetáceos por el uso de sónar LFAS en las maniobras militares navales, 15. Retrieved from [http://europe.oceana.org/downloads/varamiento\\_cetaceos.pdf](http://europe.oceana.org/downloads/varamiento_cetaceos.pdf)
- Hall, A. J., McConnell, B. J., Schwacke, L. H., Ylitalo, G. M., Williams, R., Rowles, T. K. (2018). Predicting the effects of polychlorinated biphenyls on cetacean populations through impacts on immunity and calf survival. *Environmental Pollution*, *233*, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.074>
- Hart, L. B., Rotstein, D. S., Wells, R. S., Allen, J., Barleycorn, A., Balmer, B. C., Lane, S. M., Speakman, T., Zolman, E. S., Stolen, M., McFee, W., Goldstein, T., Rowles, T. K., Schwacke, L. H. (2012). Skin lesions on common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from three sites in the Northwest Atlantic, USA. *PLoS ONE*, *7*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033081>
- Investigation of the Marine Mammal Immune System and Impacts of Stress on Health - Mystic Aquarium Investigation of the Marine Mammal Immune System and Impacts of Stress on Health. (2015). Retrieved from <http://admin.searesearch.org/research/projects/104-immune-stress>
- Jepson, P. D., Arbelo, M., Deaville, R., Patterson, I. A. P., Castro, P., Baker, J. R., Degollada, E., Ross, H. M., Herráez, P., Pocknell, A. M., Rodríguez, F., Howie, F. E., Espinosa, A., Reid, R. J., Jaber, J. R., Martín, V., Cunningham, A. A., Fernández, A. (2003). Gas-bubble lesions in stranded cetaceans. *Nature*, *425*(6958), 575–576. <https://doi.org/10.1038/425575a>
- Jepson, P. D., Law, R. J. (2016). Persistent pollutants, persistent threats Perspectives: Polychlorinated biphenyls remain a major threat to marine apex predators such as orcas. *Science*, *352*(6292), 1388–1389. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9075>

- King, S. L., Janik, V.M. (2013). Bottlenose dolphins can use learned vocal labels to address each other. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (32), 13216 – 13221.
- Kastelein, R. A., Gransier, R., Marijt, M. A. T., Hoek, L. (2015). Hearing frequency thresholds of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) temporarily affected by played back offshore pile driving sounds. *Journal of the Acoustical Society of America*, 137(2), 556–564.
- MARCET (22, 23 de septiembre de 2017). Workshop “Advances in Technology and Research on Beaked Whales and Antisubmarine Sonar”, Pájara (Fuerteventura), España.
- Medrano González, L. (2009). La evolución de los cetáceos. pp 539-588. In: *Evolución biológica. Una visión actualizada desde la revista Ciencias. Morrone J.J. y Magaña P. (eds)*. Facultad de Ciencias UNAM. México, DF.
- Nabi, G., McLaughlin, R. W., Hao, Y., Wang, K., Zeng, X., Khan, S., Wang, D. (2018). The possible effects of anthropogenic acoustic pollution on marine mammals’ reproduction: an emerging threat to animal extinction. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2208-7>
- Nouri-Shirazi, M., Bible, B. F., Zeng, M., Tamjidi, S., & Bossart, G. D. (2017). Phenotyping and comparing the immune cell populations of free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and dolphins under human care. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0998-3>
- Oceana. (2004). The death of cetaceans through the use of LFA sonar in naval military manoeuvres, 13.
- Powell, S. N., Wallen, M. M., Bansal, S., Mann, J. (2018). Epidemiological investigation of tattoo-like skin lesions among bottlenose dolphins in Shark Bay, Australia. *Science of the Total Environment*, 630, 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.202>
- Rolland, R. M., Parks, S. E., Hunt, K. E., Castellote, M., Corkeron, P. J., Nowacek, D. P., Wasser, S. K., Kraus, S. D. (2012). Evidence that ship noise increases stress in right whales. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1737), 2363–2368. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2429>
- Romano, T. A., Keogh, M. J., Kelly, C., Feng, P., Berk, L., Schlundt, C. E., Carder, D. A., Finneran, J. J. (2004). Anthropogenic sound and marine mammal health: measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(7), 1124–1134. <https://doi.org/10.1139/f04-055>
- Romano, T. A., Felten, D. L., Stevens, S. Y., Olschowka, J. A., Quaranta, V., Ridgway, S. H. (2002). Immune response, stress, and environment: Implications for cetaceans. In: *Molecular and Cell Biology of Marine Mammals. Carl J. Pfeiffer (Ed.)*. Krieger Publishing Co., Malabar, FL. p.253-279. 2002., 27.
- Ross, P.S., De Guise, S., 2007. Marine mammal immunotoxicology. In: Luebke, R., House, R., Kimber, I. (Eds.), *Immunotoxicology and Immunopharmacology*, 3rd ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.

- Siebert, U., Joiris, C., Holsbeek, L., Benke, H., Failing, K., Frese, K., Petzinger, E. (1999). Potential relation between mercury concentrations and necropsy findings in cetaceans from German waters of the North and Baltic Seas. *Marine Pollution Bulletin*, 38(4), 285–295. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00147-7)
- Thomson, C. A., Geraci, J. R. (1986). Cortisol, aldosterone, and leucocytes in the stress response of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 43, 1010–1016.
- Van Bresseem, M. F., Minton, G., Collins, T., Willson, A., Baldwin, R., & Van Waerebeek, K. (2015). Tattoo-like skin disease in the endangered subpopulation of the Humpback Whale, *Megaptera novaeangliae*, in Oman (Cetacea: Balaenopteridae). *Zoology in the Middle East*, 61(1), 1–8. <https://doi.org/10.1080/09397140.2014.994316>
- Zaccaroni, A., Andreini, R., Franzellitti, S., Barceló, D., & Eljarrat, E. (2018). Halogenated flame retardants in stranded sperm whales (*Physeter macrocephalus*) from the Mediterranean Sea. *Science of the Total Environment*, 635, 892–900. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.147>
- Zafra, R., Jaber, J. R., Pérez, J., de la Fuente, J., Arbelo, M., Andrada, M., Fernández, A. (2015). Immunohistochemical characterisation of parasitic pneumonias of dolphins stranded in the Canary Islands. *Research in Veterinary Science*, 100, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.03.021>