



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE

BIOLOGIA MARINA

“Indagini preliminari riguardanti gli effetti delle malattie infettive emergenti sulla riproduzione di *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) e *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) spiaggiati lungo la costa del Mar Adriatico Centrale”

“Preliminary investigations concerning the effects of emerging infectious diseases on reproduction of *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) and *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) stranded along the coast of Central Adriatic Sea”

Tesi di Laurea Magistrale di:
Eleonora Gerini

Relatore:
Chiar.mo Prof. **Giorgia Gioacchini**

Correlatori:

Dott.ssa **Erica Trotta**

Dott.ssa **Ludovica Di Renzo**

Sessione straordinaria – Febbraio 2023

Anno Accademico 2021 - 2022

Ho bisogno del mare perché m'insegna...

- Pablo Neruda

ABSTRACT

Tursiops truncatus (Montagu, 1821) and *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833) are the two most widespread cetacean species in the Mediterranean Sea and they are currently assessed as "vulnerable" in the Red list of the International Union for Conservation of Nature (IUCN); considering their life-history and ecological traits, marine mammals are particularly vulnerable to a wide range of threats. Nowadays, these two species are suggested as useful bioindicators of the potential effects of anthropogenic impacts, such as emerging infectious diseases (EIDs) and environmental contaminants like persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals, in order to manage and conserve wild populations. As well as all cetaceans in general, *T. truncatus* and *S. coeruleoalba* play key roles within the marine ecosystem. Indeed, they influence the structure and the function of several aquatic communities, the recycling of nutrients and have a "top-down" effect on predation.

To prevent this delicate equilibria from being compromised, it is fundamental to obtain a deeper knowledge of the reproductive biology and health status of wild populations.

For this reason, the aim of this thesis is to present a general overview on the trend of stranded *T. truncatus* and *S. coeruleoalba* specimens registered during the last seven years (from May 2016 to November 2022), with a

special focus on animals found along the Central Adriatic coasts (Abruzzo and Molise, Italy). First of all, these animals were analyzed by necropsies carried out by the Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise "G. Caporale" (Teramo, Italy). Afterward, through microbiological and parasitological analyses, the presence of emerging infectious diseases (EIDs) such as *Brucella* spp, *Dolphins MorbilliVirus* (DMV) and *Toxoplasma* spp was evaluated. The presence of this pathogen agents on *T. truncatus* and *S. coeruleoalba* was correlated with the sexual maturity, the hepatic health status and the reproductive capacity of organisms histologically evaluated.

Furthermore, to determine a possible correlation of EIDs occurrence with pollutants, CYP-450 and metallothioneins levels were evaluated as biomarkers for exposure to persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals, respectively.

Histological analysis reported histopathological alterations on male and female reproductive system such as vacuolization, infiltration of white blood cells, necrosis, abnormalities in the morphology of germ cells and gas embolism. In the liver, the most common impairments were necrosis, hemolysis, gas embolism and thickened blood vessels and macrophage infiltration.

Immunohistochemical analysis showed exposure to environmental contaminants in almost all the specimens analyzed but from correlation between response's biomarkers and emerging infectious diseases with alteration associated and no significant value emerges.

To date, to our knowledge, this is the first study performed on the central Adriatic coasts assessing the correlation between the presence of EIDs with the indirect responses of environmental pollutants biomarkers and the health status of these marine organisms. More studies should be performed to understand direct effects of these pathologies on the reproduction and the survival of these species, especially in this area of the Mediterranean sea.

INDICE

| | |
|--|----------|
| 1. INTRODUZIONE | 1 |
| <i>1.1I cetacei: generalità</i> | 1 |
| <i>1.2I cetacei nel Mar Mediterraneo e Mar Adriatico</i> | 1 |
| <i>1.2.1 La stenella striata Stenella coeruleoalba (Meyen, 1833): morfologia, biologia ed ecologia</i> | 4 |
| <i>1.2.2 Il tursiope Tursiops truncatus (Montagu, 2821): morfologia, biologia ed ecologia</i> | 10 |
| <i>1.3 Caratteristiche vitali e ciclo riproduttivo nei cetacei Odontoceti</i> | 18 |
| <i>1.4 Gametogenesi nei cetacei</i> | 27 |
| <i>1.4.1 Oogenesi</i> | 29 |
| <i>1.4.2 Spermatogenesi</i> | 37 |
| <i>1.5 Gli spiaggiamenti</i> | 46 |
| <i>1.5.1 Gli spiaggiamenti di tursiope e stenella striata in Mediterraneo: la situazione in Italia</i> | 51 |
| <i>1.6 Stato di conservazione e minacce in Mediterraneo</i> | 53 |
| <i>1.6.1 Le malattie infettive emergenti nei cetacei</i> | 56 |
| <i>1.6.1.1 Brucella ceti</i> | 57 |
| <i>1.6.1.2 CeMV: DMV (Dolphin morbillivirus)</i> | 62 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.6.1.3 | <i>Toxoplasma gondii</i> | 63 |
| 1.5.2 | <i>Contaminanti: POPs (Persistent Organic Pollutants) e Metalli</i> | 65 |
| 1.7 | <i>Biomarkers dello stato di salute nei cetacei</i> | 71 |
| 1.7.1 | <i>Fegato</i> | 73 |
| 1.7.1.1 | <i>Metallotioneine</i> | 76 |
| 1.7.1.2 | <i>Citocromo P-450</i> | 77 |
| 2. | SCOPO | 79 |
| 3. | MATERIALI e METODI | 81 |
| 3.1 | <i>Raccolta dati e campionamento</i> | 81 |
| 3.2 | <i>Preparati istologici: preparazione dei campioni</i> | 83 |
| 3.2.1 | <i>Riduzione dei preparati</i> | 83 |
| 3.2.2 | <i>Inclusione in paraffina</i> | 84 |
| 3.2.3 | <i>Taglio al microtomo</i> | 84 |
| 3.2.4 | <i>Colorazione con Ematossilina-Eosina (EE)</i> | 85 |
| 3.2.5 | <i>Colorazione P.A.S. – A (Period Acid Schiff)</i> | 86 |
| 3.2.6 | <i>Osservazione al microscopio ottico</i> | 87 |
| 3.3 | <i>Immunoistochimica</i> | 88 |
| 3.4 | <i>Analisi statistiche</i> | 90 |
| 4. | RISULTATI E DISCUSSIONI | 92 |
| 4.1 | <i>Malattie infettive emergenti</i> | |

| | |
|---|-----|
| <i>(EIDs: emerging infectious diseases)</i> | 92 |
| <i>4.2Analisi istologiche</i> | 100 |
| <i>4.3Analisi immunoistochimiche</i> | 106 |
| <i>4.4Indice di correlazione lineare di Pearson</i> | 109 |
| 5. CONCLUSIONI | 149 |
| 6. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA | 151 |

1. INTRODUZIONE

1.1 I cetacei: generalità

Il termine cetaceo deriva dal latino “*cetus*” (grande animale marino) e del greco “*ketos*” (mostro marino) ed il nome delfino (dal greco “*delphis*”, utero) annovera questi animali fin da subito come mammiferi, la cui filogenesi tuttavia lo ha portato ad assumere adattamenti anatomici tipici dei pesci: dal punto di vista evolutivo, circa 55 milioni di anni fa, si sono riadattati all’ambiente primordiale, assumendo una forma idrodinamica con assenza di pelo e pelle levigata, sviluppo della capacità di compiere immersioni prolungate anche a notevoli profondità, trascorrendo quindi tutto il loro ciclo vitale in acqua pur rimanendo filogeneticamente imparentati con i ruminanti terrestri (Miller, 2007)

I cetacei si suddividono in due sott’ordini: Mysticeti (balene e balenottere), dotati di fanoni presenti nella mascella superiore, e gli Odontoceti (delfini, orche e capodogli) i quali hanno mantenuto la dentatura ossea (Ponganis et al., 2003)

1.2 I cetacei nel Mar Mediterraneo e Mar Adriatico

Con una superficie totale di circa 2,5 milioni di km², il Mar Mediterraneo occupa solo lo 0,8% della superficie oceanica globale. I mammiferi marini non sono distribuiti uniformemente in tutto il Mar Mediterraneo: in diverse porzioni

della regione risentono delle interazioni tra le loro specifiche esigenze ecologiche e geografiche, eterogeneità ecologiche risultanti anche dagli effetti dei fattori antropici; la comprensione attuale della distribuzione ed abbondanza dei mammiferi marini nella regione, anche se messa in discussione da un'irregolarità a livello geografico e limitata conoscenza ecologica, indica l'esistenza di aree che ospitano una cospicua diversità di specie; infatti, nonostante le sue piccole dimensioni, la regione ospita un totale di 28 specie diverse di mammiferi marini, 8 delle quali regolarmente presenti (Notarbartolo di Sciara, 2016) (Fig. 1).

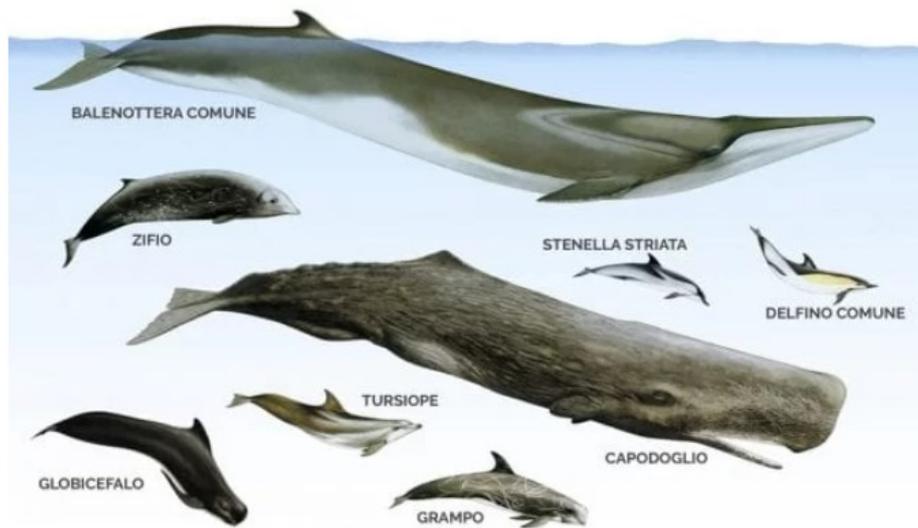


Figura 1: 8 specie di cetacei stanziali nel Mar Mediterraneo. Fonte: Alessandro Nicoletti (2020).

Il Mar Adriatico è una sub-regione allungata e semi-chiusa, lungo circa 800 km, largo poco più di 150 km e con una superficie di circa 139000 Km² ,

contenuta tra la penisola italiana e quella balcanica, comunicante con il corpo mediterraneo principale attraverso il canale di Otranto (75 km); è stato oggetto di recenti e ripetute indagini sistematiche che si aggiungono in modo significativo a precedenti studi costieri altamente localizzati e condotti principalmente nella porzione a Nord (Gaspari et al., 2015).

Il Mar Adriatico è caratterizzato da una geomorfologia marcatamente eterogenea, con una profondità media di poche decine di metri nella sua parte settentrionale e di profondità > 1200 m in quella meridionale; anche la pressione antropica ed il suo sfruttamento sono per lo più eterogenei: più frequenti lungo la sua sponda occidentale bassa e sabbiosa rispetto a quella alta e rocciosa orientale (Notarbartolo di Sciara, 2016).

Benché ricopra meno del 5% del Mediterraneo, il mar Adriatico è considerato una delle aree con la maggiore diversità di specie marine oggi a rischio ed offre un'ampia gamma di condizioni ed habitat alla “sua” fauna di mammiferi marini: *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833), *Grampo griseus* (G. Cuvier, 1912), *Physeter macrocephalus* (Linneus, 1758) e *Balenoptera physalus* (Linneus, 1758) sono le principali specie di cetacei che lo abitano, sebbene le ultime tre specie siano rare. Il delfino comune, *Delphinus delphis* (Linneo, 1758), era in passato la specie di

delfino più comunemente riscontrabile, al giorno d'oggi è considerata localmente estinta (Bearzi et al., 2004).

L'Adriatico settentrionale, oggi, è regolarmente popolato esclusivamente da tursiopi mentre l'Adriatico meridionale è più favorevole anche alla presenza di stenelle striate. Infatti, nel Mar Adriatico il tursiope diviene progressivamente preponderante sulle altre specie di cetacei risalendo verso Nord, fino a divenire, nella porzione settentrionale del bacino, l'unico cetaceo comunemente avvistato (Bonizzoni et al., 2021).

1.2.1 La stenella striata *Stenella coeruleoalba* (Meyen, 1833): morfologia, biologia ed ecologia

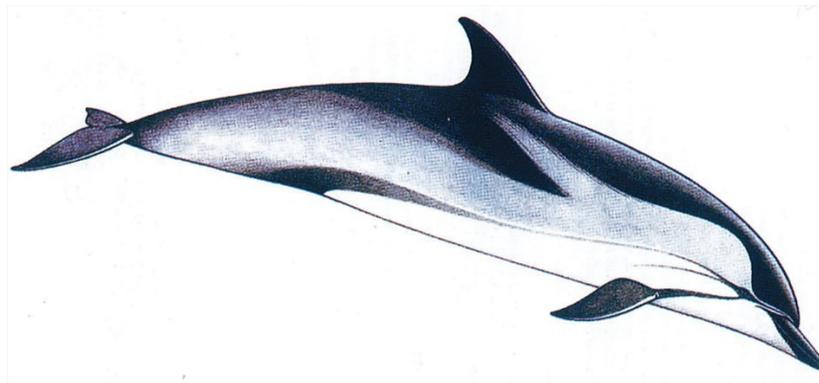


Figura 2: Disegno di *stenella striata*, fonte: Notarbartolo di Sciara e Demma (2004).

La stenella striata (striped dolphin), è il più comune ed abbondante cetaceo “offshore” nel Mar Mediterraneo, osservabile ovunque siano presenti acque profonde, da Gibilterra al Mar Levantino; è particolarmente abbondante nel mare di Alboran, nelle acque tra le isole Baleari e la terraferma iberica, il Golfo

del leone ed il Mar Ligure; è anche frequente nel Mar Tirreno, Ionio e nelle acque aperte dell'Adriatico meridionale (Fig. 3) (Notarbartolo Di Sciara e Demma,2004).



Figura 3: Areale di distribuzione in Mediterraneo di *Stenella coeruleoalba*, fonte: Notarbartolo di Sciara e Demma (2004).

Non sono state fatte stime di abbondanza per il Mar Adriatico ed il Mar Mediterraneo orientale: nonostante le stenelle striate siano state viste anche frequentemente in queste aree, la loro densità risulterebbe essere inferiore rispetto a quella nelle regioni occidentali (Aguilar, 2018).

Il genere *Stenella* (comprendente 5 specie esistenti: *S. attenuata*, *S. clymene*, *S. coeruleoalba*, *S. frontalis*, e *S. longirostris*) è stato finora trovato parafiletico in studi di genetica, quindi la risoluzione tassonomica finale per le Stenelle striate attende ulteriori lavori (Amaral et al., 2014).

Questa specie mostra una corporatura slanciata ed affusolata, con il capo arrotondato, melone ben distinto ed un rostro lungo e assottigliato; la pinna dorsale è di medie dimensioni, triangolare e falcata mentre le pinne pettorali sono piccole, sottili e leggermente incurvate; la coda ed il peduncolo caudale sono sottili e slanciati (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Nel Mediterraneo occidentale la lunghezza dell'adulto di stenella striata si aggira intorno ai 2 m, con un peso che oscilla tra gli 80 e i 120 kg (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). Il maschio è leggermente più grande della femmina e recenti ricerche comparative hanno evidenziato come le popolazioni mediterranee siano nettamente più piccole di quelle rinvenute in altre parti del mondo, che possono raggiungere punte di 2,6 m e 156 kg (Archer, 2018). Il neonato misura poco meno di 1 m e pesa circa 11 kg (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). Per il Mediterraneo orientale le informazioni sono molto più limitate: non sono stati fatti studi né sulla variazione della lunghezza del corpo in base all'area geografica né sulla morfologia/composizione genetica delle popolazioni di stenella striata (Aguilar, 2000).

Il nome specifico, *coeruleoalba*, fa riferimento al pattern diagnostico di strisce bianche-azzurre e bagliori lungo la parete laterale e dorsale ai lati del corpo dell'animale (Fig. 2); la stenella striata presenta una livrea caratteristica, che ne permette il riconoscimento, dove si distinguono tre zone longitudinali: la zona

dorsale, di colore grigio scuro; quella dei fianchi, grigio chiaro e il ventre, bianco. A colpo d'occhio sono evidenti una linea scura che parte dagli occhi, assottigliata, e si allarga arrivando alla zona dei genitali; un'altra linea di color bianco o grigio chiaro, la "fiammata", che dalla regione toracica si sviluppa all'indietro e verso l'alto, in direzione della pinna dorsale.

L'aspetto di questi colori può variare a seconda della qualità della luce o della limpidezza dell'acqua e tendono a sbiadire rapidamente dopo la morte (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

La formula dentale è: 38-59 denti, piccoli e conici con la punta leggermente ricurva all'interno, nella mascella superiore e 37-55 denti nella mascella inferiore, con un diametro medio del dente di 3,7 mm a livello della gengiva (Archer, 1996).

Le particolarità del nuoto della stenella striata non si discostano da quelle di tutti gli altri piccoli delfinidi pelagici e comprendono una grande agilità ed eleganza associate alla capacità di sviluppare notevoli velocità; la stenella striata, chiamata anche "streaker", è inoltre dotata di notevoli doti acrobatiche che manifesta con salti di vario tipo (Archer, 2018).

La stenella striata vive, in genere, in gruppi di 10-40 unità (in Mediterraneo la media è di 26,5), che tuttavia possono occasionalmente assembrarsi in

supergruppi di parecchie migliaia di esemplari (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

La temperatura dell'acqua non sembra essere un fattore limitante per questo cetaceo prettamente euritermo, che può pertanto essere osservato sia in acque tropicali che temperate e temperato-fredde (minimo 12°C) di tutti gli oceani (Fortuna et al., 2007).

Questi delfini sono stati ben studiati in diverse regioni: Pacifico settentrionale Occidentale, Pacifico tropicale Orientale e Mediterraneo e come per le abitudini riproduttive, anche per quanto concerne il comportamento sociale, la maggior parte delle informazioni su questa specie derivano da ricerche effettuate su popolazioni giapponesi; in quella zona la struttura sociale è organizzata in due tipi principali di gruppi: quello degli adulti (che comprende però anche i piccoli) e quello dei giovani; i piccoli rimarrebbero nel gruppo di nascita fino a 2 anni, dopodiché se ne staccherebbero per andare ad unirsi ad un gruppo di giovani. Il ritorno al gruppo degli adulti avverrebbe dopo il raggiungimento della maturità sessuale (Miyazaki and Nishiwaki, 1978).

Tale specie in Mediterraneo differisce geneticamente rispetto ai conspecifici atlantici: questo è stato constatato sulla base dei caratteri morfologici e genetici e da un ridotto o assente flusso genico attraverso lo stretto di Gibilterra (Aguilar and Gaspari, 2019).

In Mediterraneo la profondità media delle località di avvistamento è di poco inferiore ai 1900 m, mentre la distanza media dalla costa più vicina è di circa 34 km (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

In Mediterraneo si suppone che la stenella striata sia stanziale, ma ricerche precise in merito non esistono; non si può pertanto escludere che anche qui possano esservi movimenti oscillatori, seppure di modesta entità, tra le acque del largo e quelle più costiere (Archer and Perrin, 1999).

La stenella striata è, sotto il profilo alimentare, un generalista: si ciba di una notevole varietà di prede, a seconda delle circostanze e della disponibilità (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Da diversi studi inerenti all'esame dei contenuti stomacali di stenelle striate mediterranee è emerso che le prede più frequentemente catturate sono una combinazione di pesci (famiglie Gadidae, Sparidae e Gonostomiidae) e cefalopodi (famiglie Ommastrephidae e Histioteuthidae), talvolta crostacei (Aguilar, 2000). Inoltre, le gamme di prede note indicano che le stenelle striate spesso si nutrono nelle zone pelagiche o bentopelagiche lungo il versante continentale o appena fuori nelle acque continentali: infatti, la maggior parte delle prede, dal 75 all'80 %, ha organi luminescenti suggerendo che potrebbero nutrirsi a grandi profondità, possibilmente immergendosi da 200 a 700 m (Archer and Perrin, 1999; Aguilar, 2000).

1.2.2 Il tursiope *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821): morfologia, biologia ed ecologia

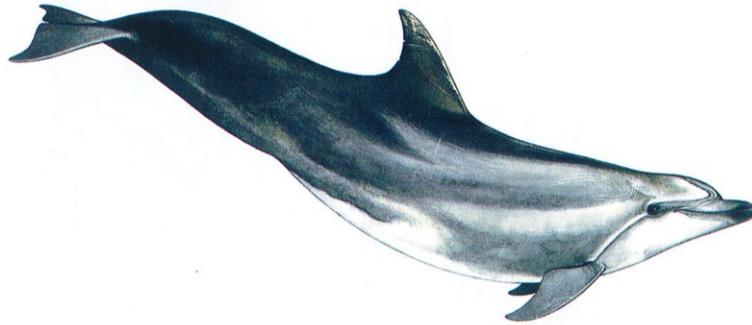


Figura 4: Disegno di *Tursiops truncatus*, fonte: Notarbartolo di Sciara e Demma (2004).

Il tursiope (bottlenose dolphin) è un delfino che è stato studiato intensamente in numerose località di tutto il mondo e ad oggi è uno dei più noti tra le oltre 85 specie di Cetacei viventi (Bearzi et al., 2009; Wells & Scott, 2018).

A livello mondiale, esiste una grande variabilità geografica del tursiope: recentemente, le moderne analisi genetiche hanno confermato l'esistenza di due sole specie principali del genere *Tursiops* (Leduc et al., 1999):

Tursiops truncatus (Montagu, 1821) (common bottlenose dolphin)

Tursiops aduncus (Ehrenberg, 1832) (Indian -Ocean bottlenose dolphin)

Quest'ultimo vive esclusivamente nell'emisfero australe, precisamente nelle acque indopacifiche, non ha una colorazione omogenea, ha la pinna dorsale più bassa e più falcata e alla maturità sessuale ha delle caratteristiche macchie scure nella zona ventrale (Wells & Scott, 2009).

T. truncatus è distribuito in tutte le acque temperate, tropicali e subtropicali del mondo, dove la temperatura superficiale dell'acqua non scende sotto i 16°C e solo le acque più fredde del globo ne sono prive (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004; Wells e Scott, 2009); inoltre, è il cetaceo più diffuso attraverso la piattaforma continentale del Mar Mediterraneo, che va da Gibilterra al Mar Levantino compreso l'Adriatico settentrionale e l'Egeo settentrionale, nonostante il degrado dell'habitat abbia probabilmente causato la frammentazione della popolazione in alcune parti del suo areale (Fig. 5) (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004; Reeves e Notarbartolo di Sciara, 2006; Bearzi et al., 2008; Wells e Scott, 2009).

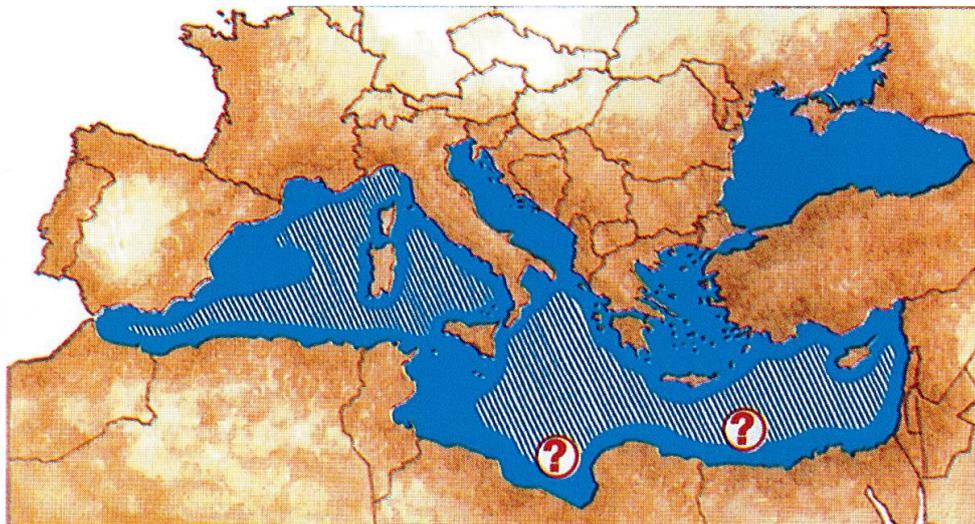


Figura 5: Areale di distribuzione in Mediterraneo di *Tursiops truncatus*, fonte: Notarbartolo di Sciara e Demma (2004).

Questa specie è un animale di grande mole, dalla corporatura possente e muscolosa, il quale raggiunge una lunghezza media di 250-350 cm ed un peso

fra i 270 e i 350 Kg (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004). All'interno di questa specie il maschio raggiunge dimensioni superiori a quelle della femmina (dal 2% al 10%) e questo dimorfismo si osserva negli adulti quando alla stessa età le femmine deviano l'energia per la riproduzione piuttosto che per l'accrescimento fisico (Fernandez & Hohn, 1998; Chivers, 2018).

Le popolazioni mediterranee, ed in particolare quella adriatica, raggiungono le dimensioni maggiori al mondo (Fernandez e Hohn, 1998; Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Il neonato è lungo circa 1 m (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

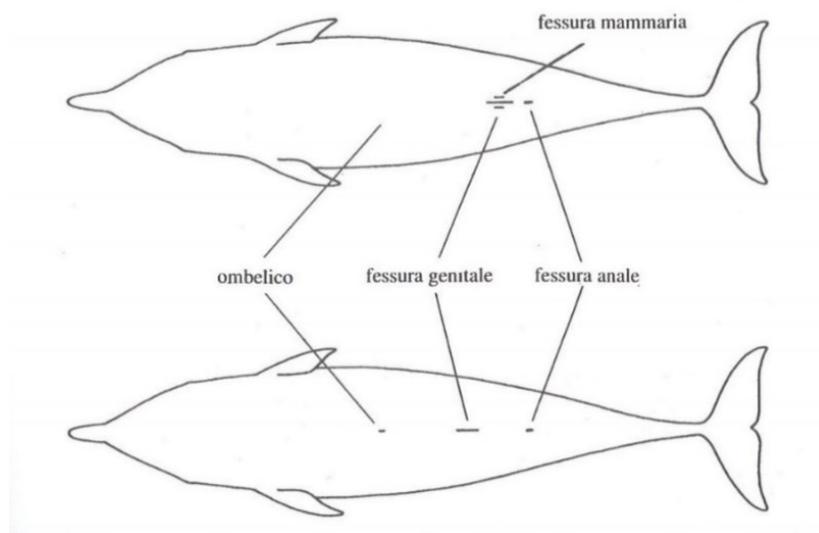


Figura 6: la determinazione del sesso è possibile tramite l'osservazione diretta del basso ventre in cui si trovano le fessure genitali. Fonte: Notarbartolo di Sciara e Demma (2004).

Il maschio presenta fessura genitale e fessura anale ben separate, mentre nella femmina le due fessure sono più vicine e ai lati della fessura genitale sono

evidenti le fessure mammarie che contengono le ghiandole mammarie per l'allattamento dei piccoli (Fig. 6) (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Il capo è sovrastato dal caratteristico melone, ben pronunciato e talvolta un po' schiacciato, separato dal rostro corto e tozzo da un solco ben marcato.

Questo animale possiede da 20 a 26 denti robusti e conici per emi-mascella, che possono misurare fino a 9 mm di diametro al livello della gengiva e servono per la cattura delle prede, le quali vengono poi ingoiate intere; la pinna dorsale è moderatamente alta e falcata e situata in posizione mediana, le pinne pettorali sono corte e sottili; la livrea è di diverse sfumature di grigio a seconda dell'individuo ed i contorni sono sfumati nelle diverse aree del corpo: il dorso e la zona posteriore sono di un grigio più scuro, quasi nero, che va schiarendosi sui fianchi fino al ventre, quest'ultimo di colore biancastro o rosato; anche la mandibola, compreso il suo apice, è in genere bianca (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004; Wells e Scott, 2009) (Fig. 4).

Ad una più attenta osservazione si riconoscono disegni e sfumature tipici delle diverse popolazioni, a seconda del mare in cui si trovano: nel Mar Mediterraneo, ad esempio, possono essere confusi con le stenelle striate a causa di una fiamma chiara che spicca dalla gualdrappa verso il torace (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Il tursiope raggiunge facilmente notevoli velocità (oltre 30 km/h) ed è in grado di immergersi per circa 8 minuti fino a 600 m di profondità.

Quando nuota in superficie, in condizioni di normale trasferimento, il tursiope emerge per respirare circa una volta ogni 15-20 secondi ma la frequenza e la durata delle immersioni dipendono strettamente dall'attività in cui è impegnato l'animale (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Lo strato di grasso che si trova nell'ipoderma dei cetacei (blubber), proporzionale alla relativa massa corporea e lunghezza, arriva a costituire l'80-90% del tessuto tegumentario: la sua funzione è quella di isolare le strutture interne dal freddo e limitare gli scambi di calore con l'acqua (Liwanag et al., 2012).

Alcune specie prediligono le acque salate, altre le acque dolci risalendo corsi d'acqua per periodi di tempo limitati e in molte delle zone nelle quali è stato studiato, *T. truncatus* si presenta in due ecotipi che risultano diversi per habitat, morfologia, tipo di alimentazione, parassiti, per parametri ematici quali numero di globuli rossi e tipo di emoglobina (Walker et al., 1981).

L'ecotipo costiero preferisce le acque basse (anche con profondità minore di 30 metri) e calde e si adatta a diversi tipi di fondali, quali lagune limacciose, baie, estuari dei fiumi, canali, insenature e altre acque interne fin lungo l'esterno della linea di costa. Tuttavia, si possono trovare anche tursiopi

pelagici negli oceani, in acque profonde della piattaforma continentale e all'interno della scarpata continentale, che vengono avvistati a centinaia di miglia dalla costa (Forcada et al., 2004; Bearzi et al., 2009; Well e Scott, 2009). Gli esemplari appartenenti all'ecotipo costiero sono più piccoli e dotati di pinne più larghe per aumentare la dispersione di calore mentre l'ecotipo pelagico, più soggetto a predazione, ha dimensioni maggiori ed un corpo più robusto con colorazione più scura, anche un maggior numero di globuli rossi e un'emoglobina più concentrata, a causa delle lunghe immersioni richieste dalla necessità di alimentarsi in profondità (Norris & Schilt, 1988; Perrin et al., 2011).

Gli ecotipi costieri, a seconda delle zone, possono migrare o essere stanziali e costantemente presenti. In alcune aree costiere, infatti, le migrazioni dei tursiopi sono stagionali e sembra siano dovute a cambiamenti nella temperatura delle acque, all'abbondanza e distribuzione delle prede, presenza di predatori, esigenze riproduttive e pressione antropica (Wells & Scott, 2009; Díaz López, 2011). È stato osservato come talvolta le acque costiere vengano utilizzate come area di nursery e non sempre l'utilizzo dell'home range è uniforme: i gruppi residenti, infatti, utilizzano aree limitate prediligendone alcune per l'alimentazione, altre per la socializzazione o il riposo (Barco et al., 1999). La

maggior parte dei tursiopi costieri però è stanziale. Non si sa, invece, se l'ecotipo pelagico sia soggetto a migrazioni.

Globalmente, non c'è dubbio che l'ecotipo più diffuso e studiato sia quello costiero (Klatsky et al., 2007). Nel Mediterraneo, malgrado esistano rari avvistamenti di tursiopi a notevole distanza dalla costa, l'ecotipo prevalente è quello costiero; infatti, la profondità media del mare nelle località di avvistamento è risultata di poco superiore ai 100 m (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

L'alimentazione del tursiope è composta principalmente da pesce (merluzzi, salmoni, triglie, acciughe, aringhe, naselli, anguille ecc.) in quanto prevalentemente ittiofago, ma varia dai calamari ed altri cefalopodi ai crostacei (macro-invertebrati bentonici) sino a razze e piccoli squali, a seconda della disponibilità delle prede (Gnone et al., 2011; Bearzi et al., 2009).

In molte zone il tursiope ha modificato il suo flessibilissimo comportamento alimentare per avvantaggiarsi delle attività di pesca dell'uomo, sia sottraendo il pesce dalle reti, sia nutrendosi di pesce di scarto gettato in mare dai pescatori o intorno alle gabbie di allevamento di acquacoltura (Díaz López, 2011; Bonizzoni et al., 2021).

L'unità familiare è l'elemento fondamentale su cui si basa la struttura sociale ed è composta dalle femmine adulte (5-10 esemplari) con i loro piccoli non

ancora svezzati. Quando i piccoli diventano indipendenti dalla madre lasciano il gruppo d'origine per formare un gruppo misto di giovani: le femmine torneranno una volta raggiunta la maturità sessuale dove presumibilmente rimarranno per tutta la vita, i maschi si uniranno fra loro per poi aggregarsi a diversi gruppi di femmine durante il periodo riproduttivo (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

La struttura sociale della forma pelagica non è nota, ma sembra essere piuttosto differente da quella costiera: i gruppi, in questo caso, sono formati da svariate decine e talvolta centinaia di esemplari mentre è stato osservato che nei tursiopi costieri del Mediterraneo le dimensioni si mantengono sempre piuttosto ridotte, in media 7 individui; il motivo di ciò risiede probabilmente nella mancanza di predatori (come squali ed orche) e nelle strategie alimentari rivolte essenzialmente a pesci bentonici che non richiedono tecniche di caccia in larghi gruppi (Forcada et al., 2004).

Ulteriori studi genetici hanno messo in evidenza una divisione su piccola scala dei due diversi gruppi di popolazione dominanti all'interno sia del Mar Adriatico che del Mar levantino, probabilmente da considerare come una possibile distinzione tra delfini pelagici e costieri (Gaspari et al., 2015).

Modelli di struttura di popolazione su distanza così brevi sono comunemente descritti per il tursiope in tutto il mondo (Rosel et al., 2009; Ansmann et al., 2012).

Non esiste una stima dell'abbondanza a livello regionale, ma soltanto una conoscenza quantitativa derivante da diversi studi effettuati a scala locale nel Mare di Alboran, Mare delle Baleari, Mar Ligure, altopiano tunisino, Adriatico settentrionale, Grecia occidentale e Israele (Gonzalvo et al., 2016).

L'unica area del Mediterraneo per cui sono riportati dati storici quantitativi a cui poter fare riferimento per dedurre la tendenza della popolazione è l'Adriatico settentrionale: probabilmente i numeri sono diminuiti di almeno il 50% nella seconda metà del XX secolo (Bearzi et al., 2004; Bearzi et al., 2009).

1.3 Caratteristiche vitali e Ciclo riproduttivo dei cetacei odontoceti

Le caratteristiche vitali di una specie sono definite da come gli individui distribuiscono le risorse tra crescita, riproduzione e sopravvivenza (Miller, 2007). La variabilità nelle caratteristiche vitali dei cetacei rispecchia il loro range dimensionale e la diversità degli habitat che occupano: sono relativamente ben note solo per poche specie studiate ininterrottamente dagli anni '70, tra cui *Tursiops truncatus*, mentre per la maggior parte delle altre specie, la conoscenza è generalmente limitata agli aspetti dei modelli di crescita e caratteristiche riproduttive; questo perché i dati biologici disponibili per gli

studi sulle strategie vitali sono spesso raccolti da animali prelevati direttamente/indirettamente (By-catch) o spiaggiati (Perrin & Reilly, 1984).

I parametri stimati includono crescita per età e tassi di gravidanza, taglia ed età alle quali viene raggiunta la maturità sessuale, stagione riproduttiva, intervallo del parto e longevità. L'età di raggiungimento della maturità sessuale è tardiva in tutte le specie di cetacei, come ci si aspetterebbe per i mammiferi grandi e longevi: infatti, è correlata in una certa misura alla longevità ed alle dimensioni corporee. I modelli di crescita differiscono tra i sessi nella maggior parte delle specie, dando luogo ad un certo grado di dimorfismo sessuale; entrambe i sessi hanno alti tassi di crescita durante l'allattamento mentre saranno più lenti dopo lo svezzamento fino al raggiungimento della taglia adulta. In ogni caso, il sesso che diventerà più grande tenderà a crescere per un periodo di tempo più lungo ed in generale sosterrà tassi di crescita più elevati dopo lo svezzamento; nella maggior parte dei cetacei odontoceti i maschi sono più grandi delle femmine, raggiungendo la maturità sessuale più tardi rispetto ad esse (C. Kemper et al., 2019)

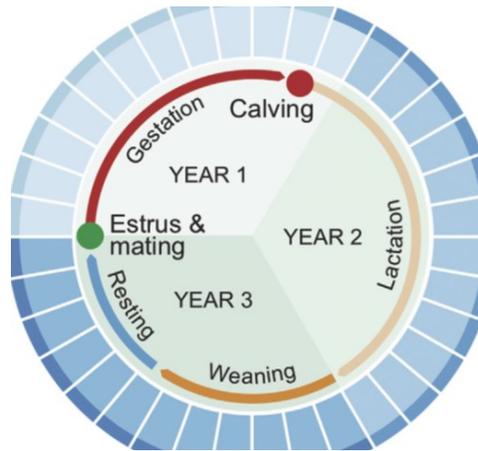


Figura 7: Il ciclo riproduttivo dei cetacei odontoceti. Fonte: modificato con il permesso di Berta et al. (2005) di Nick Rowland, Ivy Press, Regno Unito.

Si è iniziato a determinare il ciclo riproduttivo nei cetacei all'inizio degli anni '80, quando lo sviluppo di test ormonali per misurare la concentrazione di diversi ormoni (estradiolo-17 β e ormone luteinizzante), che regolano l'estro e l'ovulazione, ha permesso di valutare il ciclo riproduttivo durante tutto l'anno delle diverse specie. Il ciclo riproduttivo si compone di tre periodi a seconda dei livelli di progesterone (P4), uno dei più importanti ormoni steroidei sessuali prodotti nelle ovaie e nella placenta di molte specie di mammiferi (Fig. 7):

- un **periodo di gestazione**: caratterizzato da elevati livelli di P4,
- un **periodo di allattamento o pseudo-gravidanza**: caratterizzato dal mantenimento di elevati livelli di P4 per diversi mesi,
- un **periodo di riposo o di anestro**: caratterizzato da bassi livelli di P4, ma da una secrezione continua di estradiolo.

Il lungo periodo di gestazione (un anno) in parte bilancia il costo energetico per il parto di un "piccolo di grandi dimensioni". La presenza di più feti o nascite multiple è stata raramente documentata e non ci sono evidenze che riportino successo nell'allevamento di più piccoli (Berta, 2009).

La sincronia riproduttiva varia tra i cetacei odontoceti: le specie che abitano acque temperate tendono maggiormente ad avere gestazioni nello stesso periodo rispetto alle specie che abitano le acque tropicali (Miller, 2007).

E' importante conoscere il periodo e la durata del ciclo riproduttivo dei cetacei per l'accoppiamento, ma non è sempre facile da determinare; la maggior parte dei cetacei, compresi gli odontoceti, sono ovulatori spontanei e riproduttori stagionali: si ritiene che i cetacei ovolino solo una volta all'anno ad eccezione di alcuni, come il tursiope, che possono ovulare più volte (ciclo poliestrale) durante la stagione riproduttiva. Nel tursiope l'ovulazione può verificarsi 2-3 volte all'anno con un picco da Agosto a Novembre e con grandi variazioni tra gli individui; inoltre, come per gli altri riproduttori stagionali, il comportamento estrale non è sempre associato all'ovulazione (Urian et al., 1996).

Alcune specie, tra cui *T. truncatus*, sono note per avere una riproduzione con cambiamenti stagionali nella produzione di testosterone ma la fertilità viene mantenuta durante tutto l'anno (Wells & Scott, 2018).

La riproduzione, sia essa stagionale o continua, di un mammifero dipende in gran parte dal suo ambiente: le differenze stagionali nella disponibilità di cibo, precipitazioni, temperatura, fotoperiodo, predazione, esposizione a contaminanti e biotossine, malattie e condizioni del corpo della femmina sono tutti fattori determinanti importanti dei periodi e della durata del ciclo stagionale (McFee et al., 2020).

Sebbene la stagionalità riproduttiva sia stata ampiamente studiata nei mammiferi terrestri, i fattori che influenzano la stagionalità nei mammiferi marini sono poco conosciuti, poiché l'ambiente marino è complesso con la sua variazione spaziale e temporale, in gran parte imprevedibile, nei fattori biotici e abiotici. Poiché i maschi devono adattare il loro modello riproduttivo annuale al modello più vantaggioso ed adottato dalle femmine, la stagionalità riproduttiva è stata ampiamente esaminata in considerazione dei periodi e della durata del parto (Urian et al., 1996).

Studi su tursiopi in cattività e stenella striata hanno messo in evidenza che i livelli sierici di testosterone cambiano stagionalmente, riflettendo l'attività testicolare stagionale (Harrison, 1971). Mentre i pesi dei testicoli variano stagionalmente in un certo numero di cetacei, ci sono poche prove istologiche per una completa cessazione stagionale della spermatogenesi sia nei mysticeti che negli odontoceti (Perrin & Reilly, 1984).

Il successo riproduttivo varia nel corso della vita della femmina adulta: inizialmente, il successo riproduttivo è relativamente basso e raggiunge il suo picco diversi anni dopo che la femmina è diventata sessualmente matura e prima di declinare con l'età. Femmine post-riproduttive con ovaie senescenti sono state identificate in alcune specie cetacei odontoceti: i cicli estrali, in realtà, non si fermano mai con l'età ma diminuiscono la loro frequenza (meno ovulazioni), diventano progressivamente più distanti e diminuiscono anche il numero di gravidanze ed i parti (intervalli da 3 a 8 anni per *T. truncatus*). Il significato adattativo della senescenza non è ancora ben compreso, ma probabilmente contribuisce ad un maggiore successo riproduttivo di individui imparentati; specie che mostrano senescenza hanno anche strutture sociali abbastanza complesse, che vedono femmine post-riproduttive prendersi cura di piccoli che non sono loro ma con cui potrebbero essere imparentate (Miller, 2007).

I maschi di tutte le specie di cetacei sembrerebbero essere poliginici, ma esistono diversi metodi di competizione tra i maschi stessi. Queste strategie non sono limitate alla competizione diretta maschio-maschio per l'accesso alle femmine in estro, ma includono anche la coalizzazione fra maschi per isolare selettivamente e tenere sotto controllo le femmine in estro, la promiscuità maschile e casi di femmine per cui i maschi competono fra loro attraverso la

competizione spermatica per la stessa femmina dopo l'accoppiamento. Sulla base della relazione tra la dimensione del testicolo e la lunghezza complessiva del corpo, un rapporto che fornisce una misura della capacità di produzione di sperma all'interno di una data specie, si assume che i maschi con valori più bassi (testicoli più piccoli rispetto alla lunghezza del corpo) sono più probabilmente coinvolti nella competizione fisica per le femmine rispetto alla competizione spermatica post-copulatoria (Chivers, 2018)

La stagione riproduttiva del tursiope non è ben definita, malgrado in genere accoppiamenti e nascite avvengano nella stagione più calda: infatti, la presenza dei piccoli è osservata durante tutto l'anno con un picco durante le stagioni primaverili ed estive (Uran et al., 1996; Blasi et al., 2020).

La gestazione dura 12 mesi e il piccolo rimane in stretto contatto con la madre per alcuni anni (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Lo svezzamento definitivo avviene nella seconda metà del secondo anno di vita e comunque prima della nascita del piccolo successivo: l'intervallo di riproduzione è tra i 3 e i 6,2 anni (Grellier et al., 2011). Per i tursiopi sono rari i parti gemellari; infatti, viene partorito un piccolo alla volta che si presenta in posizione caudale (parto podalico) per impedirne l'annegamento (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

La maturità sessuale viene raggiunta tra i 9 ed i 10 anni per le femmine e tra i 10 ed i 13 anni per i maschi e la sua longevità si aggira attorno ai 40 anni (Bearzi et al., 2009).

Assai poco si conosce, in proposito, delle popolazioni mediterranee di stenella striata e le uniche informazioni note provengono dalla parte più a Nord del bacino occidentale. In quest'area le nascite avvengono prevalentemente a fine estate-autunno per permettere alle mamme di sfruttare abbastanza bene la produttività oceanica regionale e stagionale, oltre a rappresentare le condizioni ideali per l'allattamento (Aguilar, 2018).

Assai più note sono, invece, le caratteristiche vitali delle stenelle striate che vivono nelle acque giapponesi dove le abbondanti catture, periodicamente effettuate, hanno consentito dettagliate ricerche: in questa zona la stenella striata conosce due stagioni riproduttive, in inverno ed in estate. La gestazione sembrerebbe durare all'incirca 12-13 mesi; il piccolo viene allattato per ca. 1,5 anni con latte composto dal 28% di grassi; lo svezzamento avviene all'incirca 18 mesi dopo la nascita e l'intervallo tra un parto e l'altro oscilla tra 1.5 e 3 anni. I numerosi dati raccolti hanno anche consentito di stabilire che la longevità della stenella striata supera i 30 anni, con una punta di 57. La fecondità delle femmine diminuisce all'età di ca. 30 anni; la femmina incinta più anziana registrata aveva 48,5 anni (Ito & Miyazaki, 1990).

Nel Pacifico settentrionale Occidentale, entrambe i sessi aumentano rapidamente in dimensione per i primi 2 anni dopo la nascita (con lunghezze che raggiungono 166 cm nel primo anno e 188 cm nel secondo anno); il dimorfismo sessuale inizia a 2-3 anni di età, con i maschi che superano le femmine in lunghezza di ca. 4 cm. I maschi raggiungono la maturità sessuale tra i 7 e i 15 anni, ad una lunghezza corporea media di 220 cm; il peso del testicolo mostra un ampio grado di variazione mensile, con i pesi medi maggiori nel mese di Ottobre; le femmine raggiungono la maturità sessuale tra i 5 ed i 13 anni, ad un lunghezza corporea media di 212 cm (Calzada et al., 1996; Miyazaki, 1984; Kasuya, 1972).

Le femmine di stenella striata nel Mediterraneo occidentale diventano sessualmente mature a 12 anni di età e misurano in lunghezza circa 187 cm ed i maschi a circa 11.3 anni quando misurano 190 cm (Calzada et al., 1997; Aguilar, 2018).

Nell'oceano Indiano sud-Occidentale, in media, la lunghezza alla maturità sessuale è di 2,1 m per le femmine e di 2,1-2,2 m per i maschi e l'età massima stimata per entrambi maschi e femmine è di 57,5 anni (Archer, 2018).

Cambiamenti nell'età per il raggiungimento della maturità sessuale e nei tassi di gravidanza sono stati riportati per la stenella striata, dopo una significativa

riduzione dell'abbondanza della popolazione: queste risposte portano a variazioni del tasso di crescita della popolazione (Miller, 2007).

1.4 Gametogenesi nei cetacei

La gametogenesi è il processo biologico che porta a livello della gonade, alla produzione e alla maturazione dei gameti, le cellule deputate alla riproduzione. In particolare, l'oogenesi porta alla formazione di gameti femminili maturi (uova) nelle ovaie mentre la spermatogenesi porta alla formazione di gameti maschili maturi (spermatozoi) nei testicoli (Arora R., 2009).

Le ovaie sono situate sul lato dorso-ventrale della cavità addominale, in posizione caudale rispetto ai reni; l'ovaio negli odontoceti è più o meno sferico, con una superficie abbastanza liscia quando si trova nella fase di "resting" (Slijper, 1966).

Il testicolo è un organo cilindrico abbastanza allungato con una superficie lucida quasi bianca e liscia; è situato nella cavità addominale, esterna ed in posizione caudale rispetto ai reni (Orbach, 2019) L'assenza di uno scroto è certamente un vantaggio per l'aerodinamica del corpo, ma la posizione del testicolo all'interno del corpo può anche essere messa in relazione con il fatto che la temperatura critica per la spermiogenesi è di circa 37-38°C, di conseguenza la spermiogenesi non sarebbe messa in pericolo da una posizione intra-addominale dei testicoli nei mammiferi (Slijper, 1966).

Nella spermatogenesi si ottengono, da ogni divisione meiotica, 4 spermatozoi maturi che hanno le stesse probabilità e possibilità di fecondare un oocita; mentre nell'oogenesi, al termine di una divisione meiotica, solo una cellula risulterà funzionante ovvero l'uovo maturo che ha la possibilità di essere fecondato e le altre 3 cellule, invece, andranno a costituire i corpi polari. I gameti maschili, con il procedere della meiosi, riducono le loro dimensioni (per perdita di citoplasma) fino a cambiare completamente forma: da spermatogoni rotondeggianti si passa a spermatozoi maturi con una struttura polare composta da acrosoma e coda; mentre nella linea femminile l'uovo maturo, rotondeggiante, ha solamente il minimo indispensabile al suo interno poiché l'embrione entra in contatto con la madre già dallo stadio di blastocisti; di conseguenza, l'uovo maturo non mostrerà dimensioni molto più grandi rispetto all'oogonio di partenza e dipenderà completamente, dal punto di vista metabolico, dalle cellule follicolari che lo circondano. Nella spermatogenesi la divisione meiotica è praticamente immediata: nel giro di poche ore da uno spermatogonio si arriva alla formazione di spermatozoi maturi; mentre per quanto riguarda la durata dell'oogenesi ed il numero di uova prodotte, nel caso delle femmine di mammifero marino, già nel momento in cui l'organismo è nel grembo della madre (stadio embrionale) tutti gli oogoni assieme entrano in meiosi nello stesso momento: di conseguenza, si avrà come numero massimo

di uova che potranno essere prodotte il numero iniziale di oogoni che erano a disposizione. Il gruppo di oogoni, una volta andato incontro a meiosi, si fermerà in diplotene (prima divisione meiotica) e solo successivamente riprenderà il ciclo (seconda divisione meiotica), quando l'organismo raggiungerà la pubertà, che porterà alla formazione dell'uovo maturo. Generalmente, la lunghezza del periodo di blocco della meiosi varia da specie a specie e nel caso dei mammiferi marini può durare anche svariati anni: la durata dei processi della divisione meiotica è quella che fa la differenza sulla capacità riproduttiva degli organismi (Korzh, 2005).

1.4.1 Oogenesi

Una descrizione dettagliata della morfologia e dell'istologia delle ovaie di delfini e balene e dei tratti riproduttivi è stata esaminata anche se i cambiamenti morfologici delle ovaie rispetto all'età, alla stagione riproduttiva e all'attività riproduttiva non sono ancora stati completamente compresi (Harrison, 1971; Schroeder & Keller, 1990).

Si pensa che le ovaie dei cetacei siano simili a quelle di altri mammiferi: l'ovaio è costituito da un gran numero di follicoli a vari stadi di maturazione localizzati nella zona corticale, ciascuno contenente un singolo ovulo (Fig. 8 e 9).

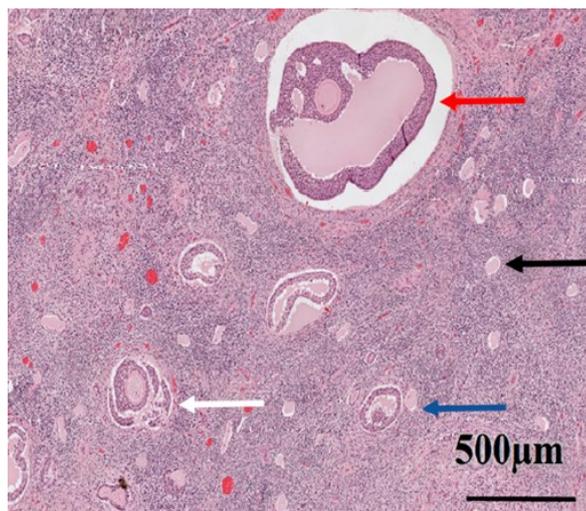


Figura 8: Sezione istologica di ovaio maturo di *S. coeruleoalba*, in cui sono presenti follicoli a differenti stadi di maturazione: la freccia nera indica un follicolo primordiale, la freccia blu indica un follicolo primario, la freccia bianca un follicolo secondario e la freccia rossa un follicolo di Graaf (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

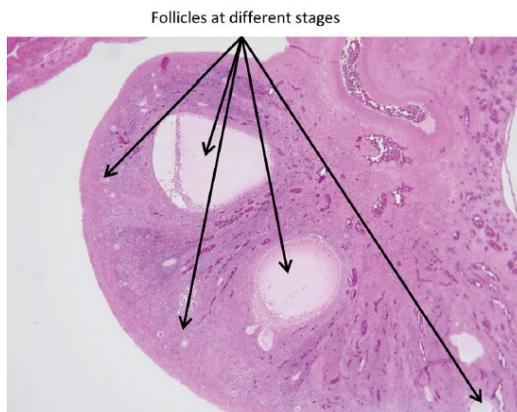


Figura 9: Sezione istologica di ovaio maturo di *T. truncatus*, in cui sono presenti follicoli a differenti stadi di maturazione (fonte: Cozzi et al., 2010).

Questi follicoli si muovono lentamente verso la superficie, di solito verso l'estremità anteriore dell'ovaio, aumentano in dimensione e quindi l'ocita maturo viene rilasciato (ovulato). Inoltre, nell'ovaio è presente una grande percentuale di stroma basofilo contenente cellule connettive intrecciate e la

medulla che contiene meno cellule ma più vasi sanguigni e fibre di collagene (Fig.10) (Gardner, 2001).

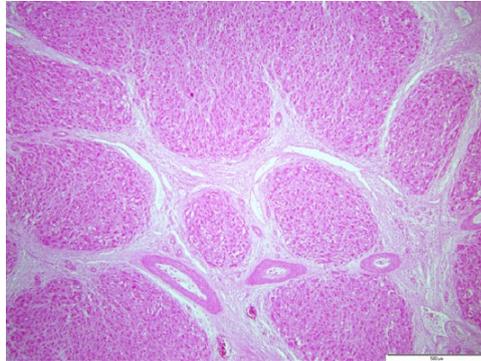


Figura 10: Sezione istologica in cui è visibile lo stroma di *T. truncatus* (fonte: Cozzi et al., 2010).

Non sono state osservate cellule interstiziali nella medulla o nella corteccia ovarica. Gli ovociti vengono rilasciati singolarmente e solo occasionalmente vengono rilasciati due ovociti contemporaneamente, il che potenzialmente può risultare in una gravidanza gemellare (Styer et al., 2016).

La morfologia dell'ovaio destro e sinistro è quasi identica sebbene in alcune specie sia stata notata una crescita preferenziale (Fig. 11 e 12): in molte specie di odontoceti come *S. coeruleoalba* e *T. truncatus*, l'ovaio sinistro è noto per essere più attivo dell'ovaio destro che anch'esso è perfettamente funzionante ma spesso matura e ovula successivamente (il tasso di accumulo dei corpi lutei e l'ovulazione, a tal punto, diventa maggiore nell'ovaio destro) o può

subentrare in caso di danno/degenerazione di quello sinistro (Ohsumi, 1964; Brook et al., 2002).

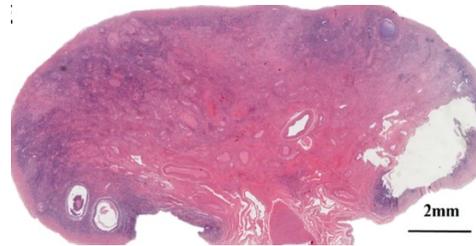


Figura 11: Sezione istologica dell'ovaio sinistro di *S. coeruleoalba*, (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

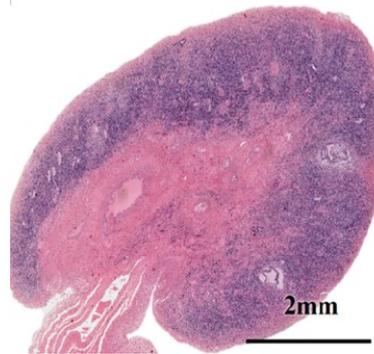


Figura 12: Sezione istologica dell'ovaio destro di *S. coeruleoalba*, (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

Tutti gli oogoni iniziano la meiosi e maturano contemporaneamente in **follicolo primordiale** (M1): a questo stadio si bloccano; la componente somatica è formata solo dalle cellule della granulosa che si dispongono attorno all'ocita ma non hanno ancora funzione endocrina (Fig. 13).

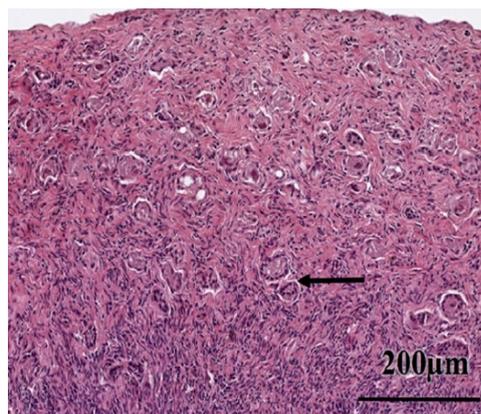


Figura 13: Sezione istologica dell’ovaio immaturo di *S. coeruleoalba*, la freccia nera evidenzia i numerosi follicoli primordiali nella zona corticale (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

Nella fase di follicolo primario l’ocita inizia a crescere: le dimensioni rimangono sempre abbastanza ridotte ma cambiano forma e funzione delle cellule della granulosa, le quali sono disposte in un unico strato iniziando a diventare cuboidali e ad attivarsi diventando recettive verso altri ormoni e prendendo contatto con l’ocita mediante la fusione dei microvilli e formazione della zona pellucida.

Passando alla fase di follicolo secondario, si evidenzia un aumento sia di strati che di numero di cellule della granulosa e iniziano a comparire, per la prima volta, le cellule della teca. Le cellule della granulosa iniziano a diventare molto attive da un punto di vista metabolico poiché iniziano a produrre tante sostanze (fluido follicolare) che riversano all’esterno: la matrice extracellulare richiama acqua per cui nel follicolo inizia a crearsi un antro (“follicolo antrale”).

Nella fase antrale si distinguono:

- Fase precoce (early antral) in cui la presenza dell'antro è minima ed interessa solo una piccola parte dell'intero follicolo.
- Fase finale (late antral) in cui l'antro è diventato importante come dimensioni ("follicolo Graafiano").

Il rivestimento di cellule della granulosa in cui è contenuto l'oocita primario, circondato da una zona pellucida, sono le cellule del cumulo ooforo: queste rimarranno a stretto contatto con l'oocita e quando quest'ultimo verrà ovulato usciranno con esso mentre rimarranno nel follicolo le cellule murali della granulosa e le cellule della teca che daranno origine al corpo luteo destinato ad andare incontro a degenerazione e riassorbimento tramite apoptosi delle cellule follicolari.

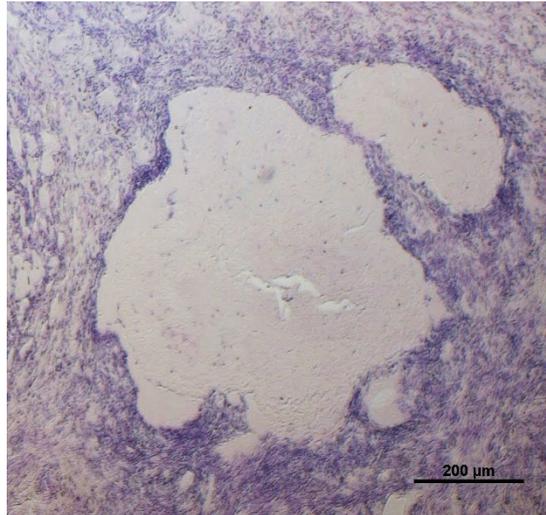


Figura 14: esempio di sezione istologica dell'ovaio con il corpo luteo di una stenella striata femmina adulta. Scala: 200 μm . Colorazione H-E.

Le cellule follicolari del corpo luteo producono l'ormone progesterone che sarà di supporto per l'embrione, se verrà fecondato, fino a che non si avrà la formazione della placenta; quindi, avvenuta la fecondazione, la formazione di progesterone verrà continuata dalla placenta mentre se non ci sarà fecondazione le cellule della granulosa e della teca andranno incontro ad apoptosi e verranno riassorbite; un altro gruppo di follicoli primari riprenderà la meiosi e ridarà luogo al processo di oogenesi (Korzh, 2005).

Il corpo luteo (CL) (Fig.14) ha una forma rotondeggiante e si trova alla periferia dell'ovaio; il corpo luteo in via di sviluppo si piega e si osservano vasi sanguigni e tessuto connettivo nelle pieghe ed al centro del corpo stesso. Il CL produce ormoni, principalmente P4, durante il periodo della gravidanza e poi, alla fine del ciclo ovarico, degenera in una massa biancastra di tessuto

connettivo noto come “corpo albicans” (CA) (Fig.15): questi CA di solito persistono per tutta la vita nelle balene, sebbene negli animali terrestri di solito scompaiano dopo un certo periodo di tempo, forse per ridurre al minimo le dimensioni ovariche (Slijper, 1966; Harrison, 1969; Harrison, 1971); se il CL dell’ovulazione si sviluppa senza gravidanza, presto si trasforma in un CA (Harrison & Ridgwa, 1971).

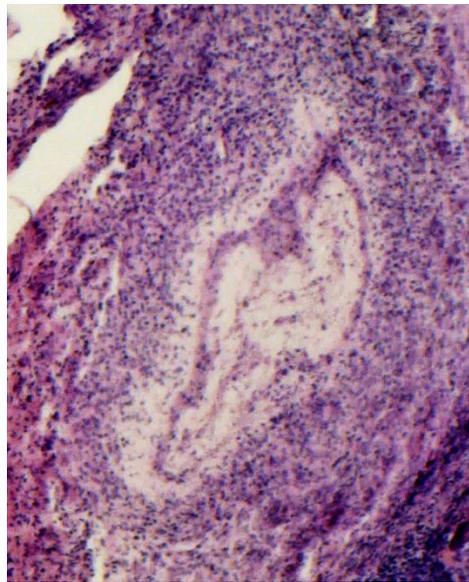


Figura 15: esempio di sezione istologica dell’ovaio con il corpo albicans di un tursiope femmina sub adulto maturo. Scala: 200 μ m. Colorazione H-E.

Non sempre ogni ovulazione determina la formazione di un CL ed inoltre, è probabile che alcuni CA vengano riassorbiti: di conseguenza, non è certo che i CA rappresentino una storia completa dell’attività ovarica e pertanto i tassi di ovulazione non possono essere determinati contando i corpi ovarici persistenti in alcune specie (Perrin & Reilly, 1984).

La conta dei CA permanenti è considerata utile per determinare l'età dell'animale durante la necropsia (sebbene la presenza di CL accessori possa falsarne le stime); nei tursiopi e nelle stenelle striate la presenza di CL, CA o follicoli di Graaf è indicatore di maturità poiché il numero di ovulazioni e l'età non hanno un'unica relazione lineare; inoltre, *S. coeruleoalba* conserva i CA solo quando originati dal CL della gravidanza ed il CL degenera dieci giorni dopo l'ovulazione (Steinman & O'Brien, 2005; Edwards et al., 2013). In *T. truncatus* la presenza di CA, alcuni quasi certamente legati a gravidanza, è riportata su base istologica fino a dieci anni (Slijper, 1966).

In *S. coeruleoalba* le ovaie delle femmine mature presentano un'asimmetria mentre prima del raggiungimento della maturità sessuale non c'è un'evidente asimmetria macroscopica (Ohsumi, 1964).

Per comprendere la fisiologia riproduttiva dei cetacei sono necessarie informazioni sulla regolazione dello sviluppo ovarico fetale e, in generale, ulteriori informazioni sull'oogenesi nei mammiferi marini sono necessarie per la ricerca di base (Miller, 2007).

1.4.2 Spermatogenesi

Le ricerche passate sulla riproduzione dei cetacei si sono concentrate principalmente sulle femmine, mentre gli studi che prendono in considerazione

esclusivamente la riproduzione maschile rimangono rari (Hohn et al., 1985; Desportes et al., 1993; Thayer et al., 2003).

L'attenzione sulla ricerca femminile è probabilmente dovuta al fatto che gli eventi riproduttivi femminili sono fondamentali per la modellizzazione della popolazione da utilizzare nelle strategie di gestione (Honma et al., 2004).

Tuttavia, le informazioni sul comportamento riproduttivo maschile possono migliorare i modelli di popolazione e le strategie di gestione, oltre a fornire preziose informazioni sulla salute della popolazione (Slooten, 2011).

Pertanto, recentemente il focus della ricerca sulla biologia riproduttiva dei cetacei si è spostato su studi dettagliati di entrambi i sessi (Diaz-Aguirre et al., 2020; Spinelli et al., 2021).

La morfologia delle gonadi maschili dei cetacei è stata ampiamente studiata; le diverse specie di cetacei riportano piccole differenze nella morfologia dei testicoli e il volume del testicolo può cambiare con l'età e l'attività sessuale e tra le specie (Slijper, 1966).

La spermatogenesi è un indicatore importante della biologia riproduttiva di un mammifero maschio, sia per quanto riguarda l'inizio della maturità che l'inizio della riproduzione nelle specie a riproduzione stagionale (Miller, 2007).

La spermatogenesi avviene in maniera graduale e tutte le cellule germinali, una volta intrapresa la divisione meiotica o anche durante le ultime fasi di divisione mitotica, sono collegate tra di loro per mezzo di ponti citoplasmatici che verranno rotti solo quando la maturazione degli spermatozoi sarà completata e saranno pronti per essere eiaculati: questo al fine di riuscire a formare tanti spermatozoi che siano tutti maturi allo stesso momento nel liquido seminale (Korzh, 2005).

Nei mammiferi in generale, inclusi quelli marini, il testicolo ha una struttura a tubuli seminiferi: tubi cavi intrecciati e ripiegati su sé stessi al cui interno vengono raccolti gli spermatozoi maturi; il processo di maturazione mostra un gradiente e avviene dalla parete del tubulo (presenza di spermatogoni) fino al lume del tubulo (presenza di spermatozoi maturi). Gli spermatozoi maturi vengono poi rilasciati, mediante fecondazione interna, nel corpo della femmina.

Sono presenti anche cellule somatiche: le cellule del Sertoli si trovano dentro il tubulo seminifero, prendono contatto con tutte le cellule della componente germinativa e non vanno incontro a divisione mitotica, per cui il loro numero rimane costante; sono fondamentali poiché fungono da supporto sia per il tubulo seminifero che per le cellule germinative e riassorbono il citoplasma che lasciano gli spermatozoi passando dallo stadio di “spermatidio secondario” a quello di “spermatozoo maturo”; inoltre, le cellule del Sertoli distribuiscono in

maniera graduale il testosterone poiché producono una proteina in grado di legare il testosterone stesso: si viene a creare un gradiente di concentrazione del testosterone che a sua volta crea un gradiente di maturazione per la spermatogenesi. Le cellule del Leyding_si trovano all'esterno nello spazio interstiziale e non entrano a far parte della struttura del tubulo seminifero; sono fondamentali poiché hanno i recettori per LH (ormone luteinizzante), sintetizzano testosterone ovvero l'ormone per eccellenza che promuove la spermatogenesi. Sia le cellule del Sertoli che quelle del Leyding sono comunemente usate come indicatori dello stato riproduttivo nei mammiferi (Setchell, 1978).

Sulla spermatogenesi dei mammiferi marini la conoscenza è ancora molto limitata, ma trattandosi di mammiferi, si ritiene che avvenga in maniera analoga a quella dei mammiferi terrestri (Miller, 2007).

C'è una certa discrepanza su quanti diversi stadi di maturità possono essere definiti negli odontoceti: mentre la pratica più comune è distinguere tra animali immaturi, pubescenti (o pre-puberi o anche in fase di maturazione) e maturi, alcuni studi definiscono quattro diversi stadi di maturità: immaturo, maturazione precoce, maturazione tardiva e maturo sulla base del differenziamento dei tubuli seminiferi e sulla presenza di spermatozoi nel lume (Hohn et al., 1985; Desportes et al., 1993; Murphy et al., 2005).

Poche ricerche sono state fatte sullo sviluppo delle gonadi nei cetacei immaturi, questo probabilmente è dovuto in gran parte alla difficoltà nell'ottenere campioni rappresentativi durante i vari stadi ontogenetici precedenti la maturità. Tali studi di riferimento stanno diventando sempre più importanti in vista dei potenziali effetti che un certo numero di inquinanti ambientali hanno sul sistema endocrino dei mammiferi marini (Borrell & Aguilar, 2005).

Gli animali generalmente immaturi sono caratterizzati da tubuli seminiferi stretti e fitti, senza lume, circondati da abbondante tessuto interstiziale oppure dalla presenza di alcuni tubuli seminiferi con lume aperto ma senza spermatociti in divisione. I tubuli sono rivestiti da un epitelio costituito da un singolo strato di spermatogoni lungo la membrana basale e le cellule del Sertoli situate più vicino al centro del tubulo (Fig. 16) (Hohn et al., 1985; Desportes et al., 1993; Murphy et al., 2005).

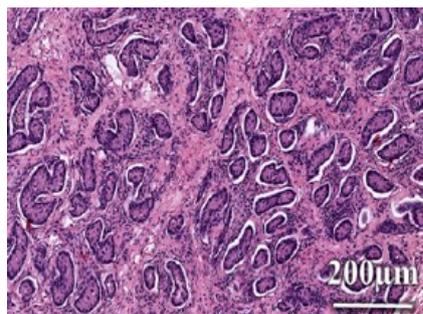


Figura 16: Sezione istologica del testicolo di *S. coeruleoalba* con tubuli seminiferi immaturi (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

I giovani maturi (sul punto di raggiungere la maturità sessuale) presentano due condizioni:

La spermatogenesi precoce è caratterizzata da 2-4 strati cellulari di spermatogoni e spermatociti nell'epitelio seminifero, non sono presenti spermatidi e tra i tubuli seminiferi è presente pochissimo tessuto interstiziale (Fig. 17) (Setchell, 1978b; Hohn et al., 1985; Murphy et al., 2005).

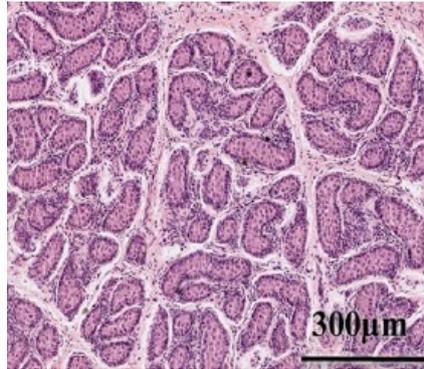


Figura 17: Sezione istologica del testicolo di un giovane maschio di *S. coeruleoalba* vicino alla pubertà, in cui sono presenti tubuli seminiferi ancora immaturi (fonte: Roca-Monge et al., 2022).

La spermatogenesi tardiva è caratterizzata da grandi tubuli seminiferi con un lume aperto, è presente un epitelio seminifero complesso che comprende 3 o più strati cellulari di spermatogoni-spermatociti e spermatidi ed inoltre è presente poco tessuto interstiziale (Setchell, 1978b; Hohn et al., 1985; Murphy et al., 2005).

Nei maschi sessualmente maturi sono stati osservati tutti gli stadi di maturazione delle cellule germinali, compresi gli spermatozoi; la piena attività testicolare è caratterizzata dalla presenza di spermatozoi nel lume dei tubuli seminiferi e dell'epididimo: abbondanza relativa di tessuto interstiziale, cellule del Sertoli e spermatogoni sono diminuiti contemporaneamente ad una

produzione di numerosi spermatociti, spermatidi e spermatozoi in *S. coeruleoalba* (Fig. 18 e 19) (Murphy et al., 2005; Roca-Monge, 2022).

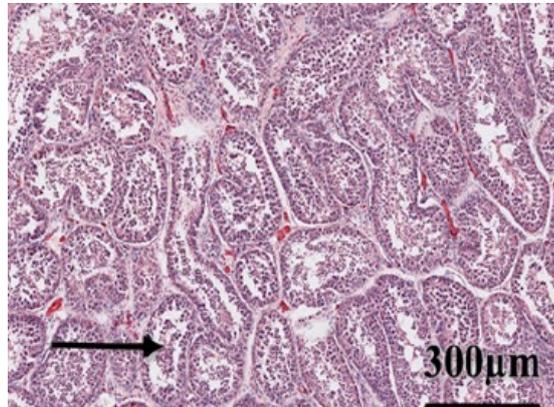


Figura 18: Sezione istologica del testicolo di un maschio adulto di *S. coeruleoalba*, in cui sono presenti tubuli seminiferi maturi; la freccia nera indica gli spermatozoi nel lume (fonte: Roca-Monge, 2022).

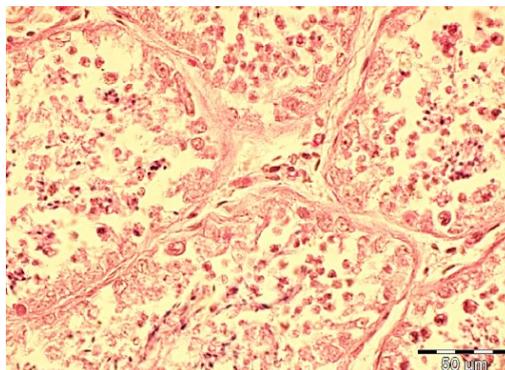


Figura 19: Sezione istologica del testicolo di *T. truncatus* con tubuli seminiferi; i tubuli seminiferi contengono le cellule del Sertoli e le cellule germinative a vari stadi di maturazione: spermatogoni, spermatociti, spermatidi, spermatozoi (fonte: Cozzi et al., 2010).

La maggior parte degli studi contemporanei sulla riproduzione dei cetacei utilizza campioni di animali spiaggiati o catturati accidentalmente con attrezzi

da pesca (utilizzando così tessuti che non potevano essere raccolti immediatamente dopo la morte) e adeguatamente fissati e conservati per l'esame istologico; di conseguenza, gran parte del tessuto potrebbe essere danneggiato e dovrebbe essere interpretato con attenzione; tuttavia, anche con tessuti che non si trovano in buone condizioni, è possibile distinguere gli stadi di maturità (Murphy et al., 2005).

L'arresto della spermatogenesi, durante la fase di regressione, può essere causato direttamente dall'apoptosi delle cellule germinali e/o da segnali ormonali che impediscono la divisione degli spermatogoni o indirettamente se le cellule del Sertoli cessano di mantenere il loro ruolo di supporto per le cellule germinali (Neimanis et al., 2000).

Durante la regressione stagionale dei testicoli, i testicoli conservano ancora tubuli seminiferi caratteristicamente più grandi rispetto ai testicoli immaturi, oltre ad avere spermatociti presenti nel lume: di conseguenza, i testicoli maturi ed immaturi sono facilmente distinguibili durante tutto l'anno (Kesselring et al., 2019).

Generalmente, durante la fase di regressione testicolare, gli spermatociti e gli spermatidi rotondi sono scomparsi dapprima dal lume dei tubuli seminiferi dispersi casualmente mentre presenti spermatogoni, ciò è stato seguito da una diminuzione del numero e dalla graduale scomparsa degli spermatozoi nel lume

tubulare. Alla fine, tutti i segni di spermatogenesi risultavano assenti, ma i tubuli seminiferi conservavano un rivestimento alternato di cellule del Sertoli e spermatogoni; i cambiamenti regressivi sono stati accompagnati da un aumento dell'area del tessuto interstiziale fino a due volte, una diminuzione del diametro dei tubuli seminiferi e membrane basali che erano quasi due volte più spesse di quelle dei testicoli completamente attivi. I cambiamenti nell'istologia dei testicoli sono stati accompagnati da cambiamenti negli epididimi: mentre il lume degli epididimi era pieno di spermatozoi e il rivestimento epiteliale era spesso e ben sviluppato durante la piena attività dei testicoli, la densità degli spermatozoi è diminuita e sono state osservate cellule spermatogene degenerate durante la regressione stagionale dei testicoli (Neimanis et al., 2000).

Questa è una modalità analoga a quanto succede per *Stenella coeruleoalba*; (Miyazaki, 1977; Neimanis et al., 2000).

Tursiops truncatus mostra spermatogenesi continua durante tutto l'anno (Kemper et al., 2014).

In passato, pochi cetologi si sono concentrati su questo aspetto e le prove basate sull'esame degli organi riproduttivi maschili sono state raccolte solo per poche specie di cetacei, tra cui il tursiope (Harrison e Ridgway, 1971).

Generalmente nei mammiferi ci si aspetta che gli accoppiamenti avvengano quando gli epididimi sono pieni di spermatozoi perché gli spermatozoi

maturano nell'epididimo e sono immagazzinati lì prima della copulazione (Murphy et al., 2005). Ci si aspetterebbe che il picco stagionale dell'attività testicolare si verifici poco prima o in coincidenza con il periodo dell'estro femminile (Kjeld et al., 2011).

Tuttavia, la selezione dovrebbe favorire la massima attività testicolare per l'intera durata del periodo riproduttivo nel caso in cui alcune femmine ovulino all'inizio o alla fine della stagione riproduttiva o altre non riescano a concepire durante il primo ciclo dell'estro; sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire i cicli maschili della maggior parte delle specie di cetacei (Neimanis et al., 2000).

1.5 Gli spiaggiamenti

Di tutte le perplessità e le curiosità che maggiormente affasciano l'uomo verso i mammiferi marini, gli spiaggiamenti rimangono un mistero in parte ancora irrisolto. Secondo il National Marine Fisheries Service statunitense (NMFS) per essere considerato spiaggiato l'animale non deve essere per forza malato, ferito o morto, ma viene considerato tale anche quando si trova su una spiaggia affollata, o comunque fuori dal suo ambiente, magari trasportato dalle correnti, e rappresenta un potenziale rischio per la salute umana.

Questi eventi possono essere singoli o di massa, coinvolgendo gruppi di soli maschi o solo femmine con i loro cuccioli o misti; inoltre, possono interessare tratti lunghi di costa ed essere spalmati nel tempo (Sergeant, 1972).

Per molti anni gli animali spiaggiati hanno rappresentato un'importante fonte di informazioni scientifiche e di reperti per i musei italiani: gli animali spiaggiati rappresentano un'opportunità per poter approfondire le conoscenze sui cetacei e compiere studi ecologici, biologici, patologici, genetici, microbiologici, istologici, di immunoistochimica ed ecotossicologici senza impattare direttamente sulle popolazioni residenti negli Oceani, contribuendo così alla salvaguardia delle diverse specie (Arrigoni et al., 2011; Peltier et al., 2014).

Nel caso in cui l'animale spiaggiato sia in buone condizioni di salute, lo shock subito può essere talmente grave da compromettere il suo ritorno in mare aperto (Perrin & Geraci, 2009). In animali strettamente gregari è possibile vedere spiaggiamenti di massa: in alcuni casi gli animali in buone condizioni di salute seguono fino a riva l'animale morente, rischiando essi stessi di rimanere spiaggiati e di morire (Mazzuca et al., 1999). Inoltre, sembrerebbe che alcuni mammiferi marini si orientino mediante il campo magnetico terrestre e, di conseguenza, anomalie o disturbi magnetici possano portarli a percorrere

rotte errate, disorientandoli, facendoli giungere sulla costa (Kirschvink et al., 1986).

Spesso gli animali che arrivano vivi sulla spiaggia muoiono e neppure l'intervento umano riesce a salvarli, anche se, in alcuni casi, il salvataggio è possibile; altre volte, invece, l'animale giunge sulla spiaggia o nella sua prossimità già morto (Wiley et al., 2001).

Le cause dei decessi possono essere diverse: dalle condizioni naturali avverse ai parassiti, dalla morte naturale o causata da un predatore alle cause antropiche quali: pesca commerciale, plastiche, inquinamento chimico e acustico (sonar), collisioni con le navi veloci (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

Per salvaguardare le specie in via di estinzione e i loro ambienti di vita, sono sorte diverse organizzazioni di protezione della natura in senso lato e sono stati stipulati trattati internazionali (convenzioni) che ogni singolo Paese firmatario ha ratificato.

Con il Decreto del Ministero della Salute del 22 ottobre 2014 (GU Serie Generale n.12 del 16-1-2015) presso la sede di Genova dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, il Ministero ha istituito Il Centro di Referenza per le Indagini Diagnostiche sui Mammiferi marini spiaggiati (C.Re.Di.Ma), al fine di monitorare con maggior rigore il fenomeno spiaggiamento e studiarne le cause, che possono avere

ripercussioni sulla conservazione delle specie ma anche sulla salute pubblica (www.izsto.it).

Il C.Re.Di.Ma. ha quindi istituito una Rete Nazionale Spiaggiamento composta dai refenti degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IIZZSS) presenti su tutto il territorio Nazionale, la Guardia Costiera, il *Cetacean Stranding Emergency Response Team* (CERT), la Banca per i Tessuti dei Mammiferi Marini del Mediterraneo dell'Università di Padova, la Banca Dati Spiaggiamenti (BDS) gestita dal CIBRA dell'Università di Pavia (CIBRA - Banca Dati Spiaggiamenti), il Museo Civico di Storia Naturale di Milano e con le Università di Genova, Teramo e Siena.

Gli IIZZSS eseguono gli accertamenti *post-mortem* sui cetacei spiaggiati e attraverso l'elaborazione dei dati di provenienza nazionale si garantisce la sorveglianza su tutti gli eventi di spiaggiamento.

Da un'analisi del report nazionale degli spiaggiamenti lungo le coste italiane avvenuti negli anni 2016-2021 emerge un trend opposto per le due specie *T. truncatus* e *S. coeruleoalba*; a partire dal 2016 il numero di individui spiaggiati era maggiore per *S. coeruleoalba*, nel 2018 il numero degli individui spiaggiati per le due specie all'incirca si equivale per poi passare ad un numero di individui spiaggiati maggiore per *T. truncatus* nel 2021 (C.Re.Di.Ma, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta).

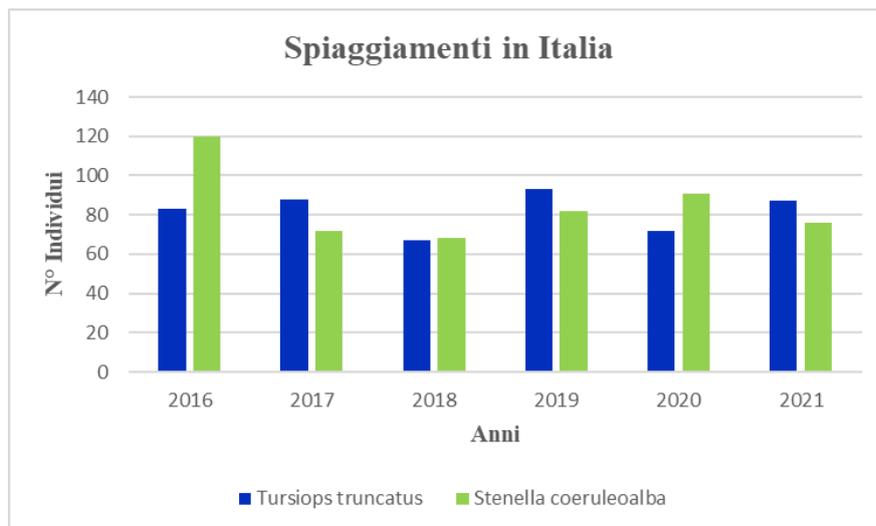


Figura 19: numero di *T. truncatus* e *S. coeruleoalba* spiaggiati lungo le coste dell'Italia negli anni 2016-2017-2018- 2019-2020-2021.

La regione Abruzzo e la regione Molise hanno istituito delle reti regionali di intervento animali marini spiaggiati e in difficoltà (DG/21/167 del 31.12.2014; DCA n.67 del 22/05/2019) . Le figure coinvolte sono le stesse per entrambe le regioni potendo convenzionalmente definirla una Rete di intervento Bi-Regionale.

A livello locale, oltre agli enti definiti dai protocolli della rete nazionale e le linee guida nazionali, quali Capitanerie di Porto, Servizi Veterinari locali, Istituto Zooprofilattico competente per territorio (IZSAM) ed Università (UNITE) troviamo attivamente coinvolti e attori principali nella realizzazione delle reti regionali l'associazione del Centro Studi Cetacei (CSC) Onlus.

Il CSC è un'associazione per lo studio di Mammiferi e rettili marini, creata nell'ambito del Museo di Storia Naturale di Milano nel 1985, quale espressione

operativa della Società Italiana di Scienze Naturali. Il primo compito del CSC consistette nell'organizzare una rete di segnalazioni e di interventi di ispezione e recupero dei Cetacei spiaggiati sulle coste italiane.

Dal 2010, l'impegno scientifico del CSC si è anche concretizzato nella pubblicazione online di rapporti annuali sugli animali spiaggiati e sulle cause di mortalità all'interno del database "GeoCetus": una banca dati georeferenziata degli spiaggiamenti e degli interventi effettuati su cetacei e tartarughe marine lungo le coste italiane.

1.5.1 Gli spiaggiamenti di tursiope e stenella striata in Mediterraneo: la situazione in Italia

Data la sua dimestichezza con le regioni costiere in cui vive e la sua abilità a destreggiarsi in acque basse, il tursiope non è specie particolarmente soggetta a spiaggiamenti di massa ed i pochi casi noti comprendono gruppi di piccole dimensioni (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004); è una specie particolarmente vulnerabile all'inquinamento, soprattutto in forma di intossicazione cronica (Adriatico). Si conoscono anche importanti morie di tursiope, causate per lo più da epizootie virali (da Morbillivirus) (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

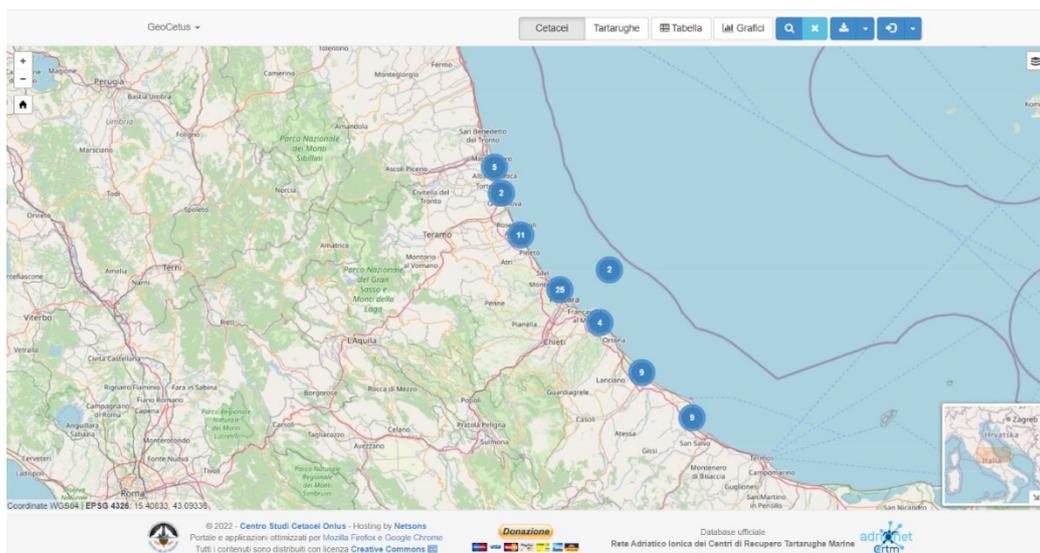


Figura 20: Distribuzione geografica dei 89 spiaggiamenti, registrati dal 2016 al 2022, di *Tursiops truncatus* lungo le coste dell'Abruzzo e del Molise. Fonte: GeoCetus, Centro Studi Cetacei.

La stenella striata frequentemente è ritrovata spiaggiata, ma sempre in spiaggiamenti individuali e non sono riportati episodi di spiaggiamenti collettivi. In Italia è di gran lunga la specie che spiaggia più di frequente, di certo per via della sua predominanza numerica su tutte le altre specie di cetacei pelagici delle nostre acque (Notarbartolo di Sciara e Demma, 2004).

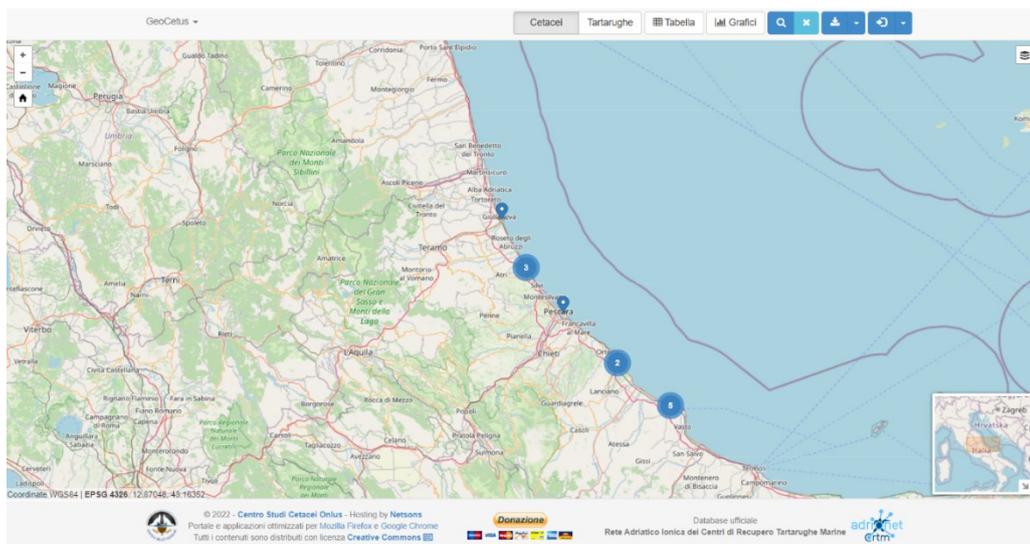


Figura 21: distribuzione geografica dei 15 spiaggiamenti, registrati dal 2016 al 2022, di *Stenella coeruleoalba* lungo le coste dell’Abruzzo e del Molise Fonte: GeoCetus, Centro Studi Cetacei.

1.6 Stato di conservazione e minacce nel Mar Mediterraneo

Il Mar Mediterraneo, un “hotspot” eccezionale per la biodiversità marina, lungo le sue coste e nelle sue acque subisce fattori di minaccia che includono lo sviluppo costiero e l’espansione incontrollata, overfishing, la pesca illegale, bycatch, plastiche e microplastiche, contaminazione di sedimenti e biota da inquinamento, eccesso di nutrienti, disturbo ed inquinamento acustico causato da traffico marittimo, industrie marine, zoonosi (EIDs), diffusione di specie invasive in molti casi facilitate dal cambiamento climatico e dal degrado delle zone di transizione e degli estuari; di conseguenza, tutti questi fattori di pressione esercitano un impatto significativo sul biota e sui taxa mediterranei compromettendo la fisiologia dei singoli organismi, disturbando le interazioni

ecologiche, modificando o annullando le barriere biogeografiche, inducendo eventi di estirpazione e portando ad un numero crescente di specie ad alto rischio d'estinzione (Bianchi & Morrià, 2007; UNEP-MAP, 2012; D.S & R, 2013).

I mammiferi marini sono fortemente colpiti dalla pressione antropogenica a causa dei loro caratteri ecologici e delle loro caratteristiche vitali che li rendono particolarmente vulnerabili (D.S & R, 2013). In particolare:

Il tursiope è esposto direttamente ed indirettamente ad un'ampia varietà di attività umane che possono talvolta tradursi in minacce per la sua conservazione: continua mortalità accidentale data da pesca, uccisioni dirette occasionali, traffico nautico, perdita di habitat o degrado (sviluppo costiero), pesca eccessiva delle prede (“overfishing”) e alti livelli di contaminazione sia chimica (inquinanti organici persistenti (POPs): xenobiotici, PCB, DDT) che acustica, cambiamenti climatici, malattie/infezioni/tumori e predazione (squali e orche) (Reeves e Notarbartolo di Sciara, 2006; Bearzi et al., 2012).

Nel 2022 il Tursiope è stato inserito nella Red List della IUCN (“International Union for Conservation of Nature”) come specie “Least Concern” in quanto, sebbene ci siano alcune minacce che operano sulle popolazioni locali, la specie a livello globale è diffusa ed abbondante (LISTA ROSSA IUCN DEI VERTEBRATI ITALIANI, 2013). La sub-popolazione mediterranea, tuttavia,

viene considerata come “Vulnerable” in accordo con i criteri della Red List dell’IUCN; questo cetaceo, quindi, sta via via rarefacendosi e scomparendo dalle regioni più soggette a degrado e allo stesso tempo, in zone dove la sua distribuzione era un tempo continua, si vanno creando lacune ogni anno sempre più vaste e numerose (Bearzi et al., 2012).

La popolazione di stenella striata del Mediterraneo è considerata come un’unità conservativa distinta dalla IUNC ed è isolata geneticamente da quella dell’Atlantico (Reeves and Notarbartolo di Sciara, 2006); essendo soggetta ad un ampio spettro di minacce comprese le morie causate da epizooti (morbillivirus, brucellosi, toxoplasmosi), alti livelli di contaminanti, by-catch dato da reti derivanti pelagiche, nel 2022 è stata classificata come “Vulnerable” nella Lista Rossa della IUCN (LISTA ROSSA IUCN DEI VERTEBRATI ITALIANI, 2013).

Le popolazioni mediterranee sono state ridotte in seguito (non si conosce in qual misura) anche dalla sopracitata epizootia da morbillivirus favorita, presumibilmente, da effetti immunodepressivi legati a contaminazioni da DDT e PCB, la quale ha causato nel 1990 lo spiaggiamento collettivo di centinaia di esemplari sulle coste della Catalogna, Francia e Italia occidentale e, nel 1992, in Italia meridionale e Grecia (Aguilar, 2018).

Si ritiene, tuttavia, che la stenella striata sia ancora un delfinide piuttosto abbondante ovunque nel suo areale di distribuzione globale; infatti, nel 2018, è stata valutata come “Least Concern” nella lista Rossa della IUCN (ISPRA, 2020).

1.6.1 Le malattie infettive emergenti nei cetacei

Circa il 75% delle malattie infettive emergenti sono zoonotiche e l'influenza antropogenica sugli ecosistemi sembra essere un fattore comune nell'emergenza e nel riemergere di agenti patogeni zoonotici, inoltre l'incidenza delle malattie associate è in aumento (Cunningham, 2005). Gli agenti zoonotici, quindi, si riversano dalla terraferma in mare arrivando alle specie marine e causandone gravi conseguenze per la salute della fauna selvatica e, dall'altra parte, con potenziali gravi perdite zoonotiche verso gli umani e gli animali domestici (Ross, 2010).

L'aumento delle malattie zoonotiche è guidato da una complessa interazione ambientale (riscaldamento globale, acidificazione degli oceani, inquinamento), ecologica (distruzione o frammentazione dell'*habitat*) ed epidemiologica (aumento delle densità umane che invadono la diminuzione delle popolazioni di fauna selvatica, movimenti globali di piante e animali fattori) (van Bresseem et al., 2009; Bossart et al., 2011).

Le più comuni malattie zoonotiche dei mammiferi marini più comuni sono infezioni localizzate, sebbene siano state comunque segnalate malattie sistemiche potenzialmente letali (Pizziferri & Di Guardo, 2017).

Il più vicino parente “oceanico” dell’uomo sono i mammiferi marini, i quali sono “specie sentinella” per la salute umana e oceanica, longevi-top predators e abitanti dello stesso ecosistema costiero utilizzato dall’uomo; la capacità di utilizzare mammiferi marini come sentinelle per agenti patogeni importanti per l'ecosistema e la salute umana richiede strumenti e protocolli appropriati per testare accuratamente e monitorare tali agenti patogeni nelle popolazioni sentinella e nell'ecosistema. (Jessup et al., 2004; Bossart, 2011).

La nostra conoscenza della diversità dei patogeni dei mammiferi marini si sta espandendo rapidamente: sono stati individuati agenti patogeni batterici, virali, fungini e protozoi che possono infettare l'uomo ed una serie di animali marini, tra cui pinnipedi, cetacei, lontre e rettili (Waltzek et al., 2012).

1.6.1.1 *Brucella ceti*

Brucella è un batterio Gram- della famiglia Brucellaceae (phylum Proteobacteria), coccobacillare, intracellulare facoltativo, patogeno per molte specie di mammiferi, tra cui mammiferi marini e uomo (Garofolo et al., 2020).

Fino agli anni ‘90 erano riconosciute 6 specie appartenenti al genere *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*; *B. canis* e *B. neotomae*;

successivamente, sono stati riportati isolamenti di ceppi sconosciuti di brucella da pinnipedi e cetacei da America, Europa, Giappone, Nuova Zelanda, Isole Salomone e Antartide: attualmente conosciuti come due nuove specie: *B. ceti* e *B. pinnipedialis*, che infettano rispettivamente cetacei e pinnipedi (Jahans et al., 1997; Guzmán-Verri et al., 2012).

Il primo isolamento di una specie di *Brucella* differente da quelle conosciute è avvenuto nel 1994 da un feto abortito di Tursiope (Ewalt et al., 1994).

Da quel momento in poi, *B. ceti* è stata isolata sia da specie appartenenti al sottordine degli odontoceti sia dei mysticeti. Il batterio è stato rinvenuto tramite isolamento diretto e PCR da quattro delle quattordici famiglie di cetacei. Tuttavia, gli anticorpi verso gli antigeni di *Brucella* (soprattutto verso LPS) sono stati rilevati in membri di sette di queste famiglie, indicando che l'infezione è molto più diffusa tra i cetacei di quanto i primi dati facessero pensare; nonostante ciò, solo una piccola parte degli animali risultati sierologicamente positivi mostra effettivamente segni clinici o patologici associati a brucellosi: questo sembrerebbe suggerire che una quota significativa degli animali infetti sia in grado di superare l'infezione, con la possibilità di rimanere portatori e quindi potenziali escretori di *Brucella* (Guzmán-Verri et al., 2012).

Sebbene la brucellosi nei mammiferi marini dovrebbe essere tenuta in considerazione in virtù del grande impatto che riveste per la conservazione di queste specie, a causa delle migrazioni anche piuttosto lunghe dei cetacei, questa infezione non è presa in esame nei programmi di controllo nazionale e non esistono stime complete derivanti da sorveglianza epidemiologica e controllo (Pizziferri & Di Guardo, 2017).

Sarebbe auspicabile l'istituzione di un piano di sorveglianza a carico delle specie di delfini e balene che occupano acque neritiche: in queste zone, le attività umane sono più intense, aumentando la probabilità di impattare sulle popolazioni di cetacei e facilitando la diffusione della brucellosi: infatti compromettono le fonti di cibo di cui sono soliti nutrirsi i cetacei, inoltre possono favorire il raggruppamento di specie differenti in aree ristrette dove c'è maggiore disponibilità di cibo, aumentando esponenzialmente la competizione che porta per alcuni animali a uno stato di denutrizione con conseguente aumento della suscettibilità a questa come ad altre infezioni e favorendo così la trasmissione della brucellosi tra cetacei della stessa specie o di specie differenti (Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

In Italia, i primi isolamenti di *B. ceti* sono stati effettuati di recente in stenelle striate spiaggiate (Alba *et al.*, 2013; Garofolo *et al.*, 2014).

La via di trasmissione preferenziale di *B. ceti* è lo stretto contatto diretto tra gli ospiti, come via venerea e allattamento. Infatti, il batterio è stato isolato dal sistema riproduttivo di cetacei infetti e dal latte (Guzmán-Verri et al., 2012).

Una seconda via è la trasmissione verticale dalla madre al feto, che non è possibile escludere considerando che sono stati rinvenuti feti e placentate di animali infetti contenenti grandi quantità di *Brucella* (Hernández-Mora et al., 2008; González-Barrientos et al., 2010; Guzmán-Verri et al., 2012).

Un'altra possibile via di trasmissione potrebbe essere attraverso il contatto ravvicinato con feti infetti abortiti e tessuti placentari: sono numerose, infatti, le specie di cetacei osservate mentre assistono attivamente alla nascita di giovani individui ed essere quindi in stretto contatto con neonati ed eventuali residui della placenta (Ewalt et al., 1994).

Esiste, inoltre, l'ipotesi che l'infezione possa avvenire attraverso l'ingestione di pesci o nematodi infetti con *Brucella* (Dawson et al., 2008).

In molti casi, *Brucella* è stata isolata da animali spiaggiati in condizioni di salute precarie o già morti; perciò, è difficile individuare con precisione quali siano le caratteristiche primariamente legate alla brucellosi e determinare i segni clinici e patologici relativi all'infezione da *Brucella* (González-Barrientos et al., 2010; Guzmán-Verri et al., 2012).

Brucella determina alterazioni patologiche a livello di apparato riproduttore di cetacei sia maschi che femmine: sono stati rinvenuti noduli granulomatosi nell'endometrio uterino, placentiti necrotizzanti, iperemia dei vasi sanguigni, necrosi del trofoblasto con perdita di mucosa placentare, intensi infiltrati infiammatori di neutrofili e moderata infiltrazione di macrofagi e linfociti, edema moderato della sottomucosa e numerose colonie batteriche mescolate agli infiltrati sulla superficie dello stroma corion-allantoideo (Hernández-Mora *et al.*, 2008; Van Bresseem *et al.*, 2009a ; González-Barrientos *et al.*, 2010).

Le lesioni testicolari sono caratterizzate principalmente da formazione di tessuto granulomatoso caratterizzato da fenomeni di necrosi caseosa e mineralizzazione, e in alcuni casi da ascessi. L'orchite è associata a proliferazione di cellule epitelioidei o giganti e infiltrazione mononucleare (Ohishi *et al.*, 2003; Dagleish *et al.*, 2008).

B. ceti è stato isolato anche dalle ghiandole mammarie di capodogli e delfini, suggerendo la localizzazione all'interno dei macrofagi in questi organi (González-Barrientos *et al.*, 2010).

Nei cetacei, la localizzazione del batterio a livello di sistema nervoso centrale è associata a disorientamento e, di conseguenza, spiaggiamenti (Hernández-Mora *et al.*, 2008; González- Barrientos *et al.*, 2010).

Brucella è stata isolata dai tessuti del sistema reticoloendoteliale quali linfonodi, milza, fegato, come anche da sangue, liquido peritoneale, reni, ulcere cutanee e ascessi sottocutanei dei cetacei (González-Barrientos *et al.*, 2010; Jauniaux *et al.*, 2010).

1.6.1.2 CeMV: DMV (*Dolphin morbillivirus*)

Il morbillivirus dei cetacei (CeMV) è un virus ad RNA facente parte del genere *Morbillivirus* e della famiglia *Paramyxoviridae*; ad oggi, sono stati descritti tre ceppi principali di CeMV tra cui il Dolphin morbillivirus (DMV) che è stato riconosciuto essere causa di imponenti eventi di spiaggiamento e mortalità in tutto il mondo, coinvolgendo numeri elevati di individui (Díaz-Delgado *et al.*, 2019). Il DMV è stato isolato per la prima volta nelle stenelle del Mediterraneo e ha provocato diverse epidemie nei tursiopi lungo le coste Atlantiche dell'USA (van Bresseem *et al.*, 1993). Si tratta di un virus endemico in numerose specie di cetacei, ma da studi è emerso che alcune specie sono più suscettibili all'infezione da DMV, tra cui stenelle striate e tursiopi (van Bresseem *et al.*, 2001; Mira *et al.*, 2019). In assenza di immunità di popolazione, il CeMV può causare epidemie letali caratterizzate da polmonite, meningo-encefalite non suppurativa e imponente deplezione linfocitaria (van Bresseem *et al.*, 2014).

1.6.1.3 Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii è un protozoo intracellulare appartenente al phylum *Apicomplexa* che può infettare uomo e altri animali a sangue caldo, inclusi i mammiferi marini (Dubey et al., 2003); è l'unica specie del genere *Toxoplasma* e, di questo, ne sono stati riconosciuti tre genotipi principali (più del 94% di tutti gli isolati) denominati Tipo I, II e III (Conrad et al., 2005; Van Bresseem et al., 2009 a). È un parassita ampiamente diffuso nell'ecosistema acquatico sia in acque costiere che oceaniche, nelle quali le oocisti resistono per mesi, contaminate dallo sversamento dal suolo in mare attraverso il dilavamento delle acque di superficie e fognature contaminate. Classicamente il ciclo biologico di *T. gondii* prevede la presenza di felidi domestici e selvatici come unici ospiti definitivi per *T. gondii*, tuttavia molti mammiferi e uccelli possono rivestire il ruolo di ospiti intermedi (Miller et al., 2008). L'esposizione a *T. gondii* dei cetacei può avvenire in tre modi: ingestione di oocisti sporulate, ingestione di cisti tissutali in ospiti intermedi o trasmissione verticale (Conrad et al., 2005). L'infezione di specie pelagiche di cetacei come *Stenella coeruleoalba*, invece, potrebbe essere dovuta all'acqua reflua da navi in presenza di scarse condizioni igieniche e di roditori, gatti o terreno contaminato a bordo (Van Bresseem et al., 2009a). I casi di toxoplasmosi nei cetacei riportati in Italia riguardano proprio alcuni esemplari di stenella striata sierologicamente positivi a *T. gondii* e

presentanti meningoencefalite non suppurativa con cisti parassitarie all'interno del parenchima cerebrale (Di Guardo et al., 2010; Di Guardo et al., 2011).

Tuttavia, il meccanismo attraverso cui i mammiferi marini sono in grado di infettarsi non è stato del tutto chiarito: i delfini, nei quali l'infezione è stata descritta, traggono il proprio approvvigionamento idrico dall'alimentazione, composta da cefalopodi, pesci e altri animali a sangue freddo, che non sembrano essere ospiti intermedi di *T. gondii* (Dubey et al., 2003). L'encefalite è il reperto patologico più frequentemente riscontrato in corso di infezione da *T. gondii*, tuttavia oltre a disturbi neurologici quali atassia e incoordinazione nel nuoto, si possono osservare linfadenite, alterazioni delle ghiandole surrenali, debolezza, letargia, anoressia, polmonite interstiziale acuta, epatite, miocardite, dispnea e opacità corneale (Dubey et al., 2003; Van Bressem et al., 2009). La toxoplasmosi nei cetacei in alcuni casi è stata associata a immunosoppressione conseguente a infezione da *Morbillivirus* e/o ad alte concentrazioni di contaminanti ambientali, inclusi i policlorobifenili (PCB) (Mikaelian et al., 2000; Lauriano et al., 2014a). In aggiunta, l'infezione simultanea da parte di più parassiti può modulare la gravità della malattia (Gibson et al., 2011).

1.5.2 Contaminanti: POPs (Persistent Organic Pollutants) e Metalli

Dato il ruolo ecologico cruciale svolto dai cetacei all'interno delle reti trofiche alimentari come predatori apicali, la loro elevata percentuale di grasso corporeo, le lunghe aspettative di vita e la ridotta capacità di metabolizzare rispetto ai pinnipedi ed ai mammiferi terrestri, essi risultano più inclini ad essere influenzati negativamente da Inquinanti Organici Persistenti (POPs) e Metalli (Casalone et al., 2014; Law, 2014; Silvia Pace, 2015; Hoydal et al., 2018; Randa M. Alarousy, 2018; Sonne et al., 2018; Revision et al., 2019; Minoia et al., 2023). Di conseguenza è stata dimostrata la loro utilità come “sentinel species” o “bioindicators” per l'inquinamento marino del mar Adriatico così come del mar Mediterraneo in generale (Storelli & Marcotrigiano, 2000; García-Alvarez et al., 2014; Polizzi et al., 2014) in quanto attraverso studi tossicologici e di valutazione del rischio viene fornito un allarme precoce sugli effetti cumulativi e sinergici di diversi fattori di stress ambientale sugli ecosistemi marini, sia costieri che offshore, e sulla salute umana (Bossart, 2011; Reif, 2011).

A partire dal 1970, elevate concentrazioni di metalli pesanti e composti organoclorurati sono state misurate in diverse specie di piccoli cetacei in Mediterraneo (Borrell & Aguilar, 2005). I POPs quali bifenili policlorurati (PCB), le dibenzo-p-diossine policlorurate e i furani (PCDD/F) e gli eteri di

difenile polibromurato (PBDE) sono composti organici lipofili chimicamente stabili e resistenti al degrado ambientale (UNEP/MAP, 2012); PCDD/F e PCB sono introdotti nell'ambiente principalmente come sottoprodotti di processi industriali e di combustione (Guo et al., 2019) . I POPs biomagnificano lungo la catena trofica e si bioaccumulano durante il ciclo vitale degli organismi marini (Marsili et al., 2018; Shoham-Frider et al., 2009a). Gli effetti avversi includono la cancerogenicità (Gruppo di lavoro IARC sulla valutazione dei rischi cancerogeni e per l'uomo, 2012-2016), immunotossicità (J. P. Desforges et al., 2018; Centelleghes et al., 2019; Marsili et al., 2018), disturbi endocrini (Galligan et al., 2019; Linares et al., 2015), compromissione della riproduzione (Murphy et al., 2010; Murphy et al., 2018) aumento della suscettibilità alle infezioni e quindi riduzione dei tassi di sopravvivenza sia degli adulti che della prole e della crescita della popolazione: tutti effetti fortemente dannosi per la sostenibilità a lungo termine delle popolazioni selvatiche (J. P. W. Desforges et al., 2012; Peterson et al., 2014; Jepson & Law, 2016; Marsili et al., 2018; Genov et al., 2019). I possibili effetti a lungo termine causati dai POPs sull'attività riproduttiva delle femmine delfino comune e focena comune, usando come indice i corpi albicans, sono stati valutati da Murphy et al., 2010; in particolare, sono state riportate situazioni differenti in base alla specie presa in considerazione: in alcuni casi elevate concentrazioni di POPs sono state

associate ad un numero inferiore di corpi albicans, probabilmente indicando che alti livelli di contaminanti stavano inibendo l'ovulazione oppure che alcune femmine abbiano trascorso un periodo di totale assenza di capacità riproduttiva prima sia di una gravidanza con successo che nascita e sopravvivenza della loro prima progenie durante l'allattamento; mentre, in altre specie i primi risultati hanno identificato che elevate concentrazioni di contaminanti, tali da superare il livello soglia per gli effetti negativi sulla salute dei mammiferi marini, erano presenti in femmine mature (fase di resting) con un elevato numero di corpi albicans. Ciò suggerisce che: 1) a causa dell'elevato accumulo di contaminanti le femmine possono non essere in grado di riprodursi e quindi continuare l'ovulazione, oppure 2) le elevate concentrazioni di contaminanti potrebbero non essere la causa dell'infertilità ma le femmine non si riproducono per altre cause (fisiche o sociali).

Produzione ed uso di PCB sono stati vietati dalla maggior parte dei paesi sviluppati alla fine degli anni '70; tuttavia, questi prodotti chimici continuano a persistere negli ambienti marini (Páez-Osuna et al., 2017) . Successivamente, la produzione di PCB, l'uso ed il rilascio involontario di PCDD/F sono stati regolamentati a livello globale nel 2001 dalla Convenzione di Stoccolma (Convenzione di Stoccolma, 2001): nonostante ciò, i PCB danno ancora il

maggior contributo al TEQ rappresentandone così la fonte principale per la possibile compromissione della salute degli organismi marini.

Il livello d'esposizione ai contaminanti può variare da individuo a individuo in relazione a: età, sesso, strategie riproduttive, alimentazione ed habitat (Aguilar et al., 1999). Sulla base di uno studio precedente, è stato riportato che processi biologici quali metabolismo, parto e allattamento possano contribuire a variazioni nei patterns dei contaminanti fra gli individui (Boon et al., 1997).

Le concentrazioni di composti organoclorurati e di alcuni metalli pesanti (Hg e Se) che si trovano comunemente nelle stenelle striate mediterranee superano di molto le soglie solitamente associate ad effetti dannosi; infatti, i livelli di DDT e PCB si classificano tra i più elevati mai registrati nelle popolazioni selvatiche di mammifero marino ed il loro potenziale impatto è motivo di seria preoccupazione (Aguilar, 2000).

Ad oggi si sa relativamente poco riguardo gli effetti delle miscele complesse di contaminanti nei cetacei; tuttavia, è stato riportato che le interazioni tra le sostanze chimiche all'interno della miscela possono modulare il tipo di effetto correlato all'esposizione (potenziamento immunitario vs. immunosoppressione) e contribuiscono anche alla comparsa di effetti a livelli inferiori alla soglia (Mori et al., 2008).

Il monitoraggio delle concentrazioni di inquinanti organici, attraverso l'analisi di campioni di grasso, sangue e tessuti, in specie come *T. truncatus* e *S. coeruleoalba* rende possibile sorvegliarne le tendenze temporali e geografiche e, quindi, la possibilità di attuare future strategie di mitigazione e azioni mirate alla riduzione di contaminazione ambientale nel Mar Mediterraneo, il quale è stato definito un "hotspot" globale di PCB e PBDE per i mammiferi marini (Jepson et al., 2016; Marsili et al., 2018).

I metalli pesanti sono divisi in essenziali (Zinco, Rame, Cromo, Selenio, Nichel) e i non essenziali (Mercurio, Cadmio, Piombo), questi ultimi potenzialmente tossici anche a basse concentrazioni (Shoham-Frider et al., 2009b).

Anche i Metalli biomagnificano lungo la catena trofica e bioaccumulano nel tempo raggiungendo concentrazioni elevate nei tessuti e organi dei cetacei: quelli maggiormente riscontrati sono Cd, Pb, Hg (Me pesanti, non essenziali con lunga emivita biologica), Se e As (Me essenziali) (Kehrig et al., 2016).

I metalli pesanti sono ampiamente dispersi nell'ambiente sia per cause naturali che antropiche e le possibili vie di assorbimento sono: captazione atmosferica attraverso i polmoni o la pelle, attraverso la placenta prima della nascita o il latte durante l'allattamento ed ingestione di acqua di mare; tuttavia, la

principale via di ingestione è la dieta (pesci e cefalopodi) (Storelli e Marcotrigiano, 2000; Zhou et al., 2001; Lahaye et al., 2007).

Durante l'esposizione a basse dosi, i metalli pesanti sono genotossici, cancerogeni ed immunosoppressori (Šuran et al., 2015). È stato dimostrato che l'accumulo può essere correlato con l'età, il sesso, la specie e la variabilità dei livelli di metalli in traccia tra le specie di cetacei e gli habitat marini è dovuta alle fonti di cibo, allo stato fisiologico dell'individuo e alle dinamiche tossicologiche del metallo specifico (Frodello & Marchand, 2001; Shoham-Frider et al., 2003; Endo et al., 2007).

Sebbene siano stati condotti diversi studi inerenti ai metalli nei mammiferi marini del Mar Mediterraneo, i dati sull'accumulo di metalli nei delfini del Mar Adriatico sono scarsi (Suran et al., 2015); ad oggi, lo studio condotto da Pompe-Gotal et al., 2009 riporta le concentrazioni di Hg in tursiopi e stenelle striate spiaggiate dal 1990 al 1999; ulteriori ricerche hanno determinato le concentrazioni di elementi tossici in *T. truncatus*, *S. coeruleoalba* e *G. griseus* spiaggiate in Adriatico dal 2000 al 2002 (Bilandžić et al., 2012).

Data l'importanza e la persistenza delle elevate concentrazioni di metalli nell'ambiente marino, questi dati storici sono fondamentali per studi futuri inerenti all'accumulo di tali metalli nei delfini in Mar Adriatico (Suran et al., 2015).

1.7 Biomarkers dello stato di salute nei cetacei

La maggior parte degli studi sulla risposta ai fattori di minaccia nei mammiferi marini in passato sono stati condotti utilizzando animali cacciati. Ad oggi è stata identificata una serie di biomarkers per la valutazione del rischio e la conservazione di specie in via d'estinzione: citocromo P-450, MFO activity, EROD activity, HgSe granules, metallotioneine che vengono comunemente usati nel fegato per la valutazione dello stato di salute dell'animale (Fossi & Marsili, 1997).

L'organo che maggiormente si presta alle analisi dei contaminanti è il fegato: numerosi studi sono stati effettuati in diverse aree del mondo su diverse specie di cetacei odontoceti, ma nonostante siano state riportate lesioni epatiche in esemplari di delfini spiaggiati, studi istopatologici a lungo termine nel Mar Mediterraneo e Mar Adriatico in particolare non sono ancora stati realizzati; Alterazioni come epatite cronica aspecifica, infiltrazione di linfociti e globuli rossi attraverso il parenchima epatico e nello stroma portale o perinvenulare con presenza o assenza di necrosi epatocitica, ispessimento dei vasi sanguigni possono essere correlate a ad un enorme numero di agenti epatotossici siano essi biologici, chimici o fisici (Gomerčić et al., 2000; Jaber et al., 2013; Fair et al., 2017; Alstrup et al., 2016; Mearns et al., 2019; Díaz-Santana et al., 2022).

La necrosi epatica è solitamente accompagnata da una reazione d'infiammazione dei vasi sanguigni e delle cellule mesenchimali; l'eccezione è rappresentata dal caso in cui l'animale muoia rapidamente, per cui la conseguente reazione infiammatoria non ha il tempo di svilupparsi (Guzmán-Verri et al., 2012a).

Diversi studi riportano che l'inquinamento acustico, come il sonar militare navale a media frequenza, potrebbe essere la causa della malattia da decompressione acuta in alcune specie di cetacei odontoceti; in particolare, è stata segnalata un'embolia gassosa sistemica ed acuta contemporaneamente alle lesioni epatiche cistiche (LLC) caratterizzate da un incapsulamento intraepatico di gas e provvisoriamente interpretate come "bolle di gas" in esemplari di *S. coeruleoalba*: è quasi certo che siano il risultato della combinazione di un preesistente disturbo vascolare concomitante a bolle di gas che prende il nome di "Budd-Chiari-like Syndrome", ma sono comunque necessarie ulteriori ricerche per determinare l'eziopatogenesi precisa e i fattori che contribuiscono a tale malattia nei cetacei odontoceti (A. Fernandez et al., 2022).

Lo stato di salute viene valutato anche sull'analisi del sistema riproduttivo maschile e femminile e differenti studi riportano biomarkers istopatologici quali vacuolizzazione, infiltrazione di globuli bianchi, iperemia dei vasi

sanguigni, necrosi, anomalie nella morfologia delle cellule germinative probabilmente ricollegabili a precedenti processi infiammatori d'origine parassitaria, virale o batterica e relativa attività antropogenica (Foster et al., 2002 ; Kemper et al., 2014; De Figueiredo et al., 2015; Mearns et al., 2019b; Diaz-Santana et al., 2022).

1.7.1 Fegato

Il fegato è la ghiandola più grande del corpo, ha un colore viola omogeneo tendente a volte al grigio-blu scuro, è localizzato posteriormente al diaframma, sopra allo stomaco e domina la maggior parte della cavità addominale; il peso ne rappresenta in media il 2-3% del peso corporeo totale nei delfini e mostra una fessura nel margine ventrale indicativa di una suddivisione macroscopica in lobi (Cozzi et al., 2010).

Una delle principali caratteristiche del fegato dei delfini è la pronunciata convessità della superficie diaframmatica e del margine dorsale, dovuta alla specifica forma e posizione del diaframma ed il relativo basso volume della cavità peritoneale (IZSTO) (Fig. 22). Il fegato dei cetacei, come quello di molte specie terrestri, è privo di cistifellea e la bile prodotta nello stroma è trasportata nel duodeno dal dotto epatico comune; l'assenza di un organo di deposito extra-epatico epatico per la bile è probabilmente correlata alla continua ingestione di

cibo e conseguente continua presenza di cibo nell'intestino prossimale del delfino (Cozzi et al., 2010).

Gli epatociti sono in stretto contatto con il sangue, specialmente quello proveniente dagli organi gastro-intestinali ed alcune specifiche sostanze epatotossiche hanno anche un effetto sugli epatociti, così come alcuni batteri e virus specifici influenzando profondamente sulla salute dell'individuo e sulle sue possibilità di sopravvivenza (Penzo-Mendez & Stanger, 2015).

Il fegato svolge un ruolo chiave nel metabolismo animale partecipando alla trasformazione ed alla sintesi di molte sostanze biologicamente importanti, alcune anche tossiche vista la loro posizione all'apice della catena trofica, che entrano nel tratto gastro-intestinale e vengono assorbite nell'intestino (Stanger, 2015).

Gli epatociti sono in stretto contatto con il sangue, specialmente quello proveniente dagli organi gastro-intestinali ed alcune specifiche sostanze epatotossiche hanno anche un effetto sugli epatociti, così come alcuni batteri e virus specifici influenzando profondamente sulla salute dell'individuo e sulle sue possibilità di sopravvivenza. Se la concentrazione è al di sopra del valore soglia tollerabile dagli epatociti oppure se hanno un effetto cronico, gli epatociti mostreranno cambiamenti reversibili solo all'inizio mentre se lo stimolo è abbastanza grave o dura sufficientemente a lungo, la capacità delle cellule di

adattarsi può essere superata e le funzioni cellulari vengono alterate con conseguente danneggiamento della cellula (Stanger, 2015).

Se la lesione è sub-letale, la cellula sopravvive, anche se il funzionamento può risultare anomalo: lesioni sub-letali croniche possono indurre le cellule a subire alterazioni strutturali e funzionali stabili, che ripristinano l'omeostasi ed anche le cellule danneggiate sub-letalmente possono continuare a deteriorarsi strutturalmente e funzionalmente raggiungendo il “tipping point”, il quale non è ancora stato precisamente stabilito sia strutturalmente che funzionalmente (Stanger, 2015).

Nella maggior parte dei casi gli epatociti rispondono a concentrazioni elevate di contaminanti con accumulo di grasso (infiltrazione e degenerazione) e successivamente con apoptosi e necrosi; in caso di persistenza dello stimolo nel tempo, prima della morte ci sarà anche cirrosi epatica (Schneider et al., 1997): questi cambiamenti possono essere la conseguenza di varie malattie o avvelenamento oppure un ritrovamento accidentale di individui morti per altre cause. McFee & Lipscomb nel 2009 hanno descritto la fibrosi epatica in un adulto di tursiope facente parte di una popolazione selvatica, mentre Birkun (1996) ha descritto la congestione venosa, stasi del sangue, degenerazione cellulare e necrosi nel fegato di tursiopi in cattività.

I delfini si trovano all'apice della catena trofica e quindi il loro fegato accumula le eventuali sostanze tossiche: questo è uno dei motivi per cui lo studio di inquinanti (compresi i metalli pesanti) nel fegato dei cetacei è così importante per comprendere le condizioni dell'ambiente marino.



Figura 22: Fegato di *T. truncatus* (A) e fegato di *S. coeruleoalba* (B) (fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale").

1.7.1.1 *Metallotioneine*

Le metallotioneine (MTs) sono delle proteine a basso peso molecolare ricche in cisteina e caratterizzate da un'elevata capacità di legare i metalli. L'abbondanza delle MTs nella cellula dipende dal contenuto di metalli nell'organismo e nella cellula stessa: se la concentrazione intracellulare di metallo è alta, viene indotta la sintesi di nuove molecole di metallotioneine; se il contenuto di metallo diminuisce, la sintesi di metallotioneine viene rallentata. Gli organismi viventi possono sfruttare questo meccanismo di sintesi regolata

per diminuire gli effetti dannosi dei metalli tossici come cadmio e mercurio (Sinaie et al., 2010; Polizzi et al., 2014b).

Ne esistono 2 isoforme: MT-1 e MT-2; MT-1 lega Cu, Zn, Hg e Cd mentre MT-2 lega solo Zn, Hg e Cd; questo suggerisce diverse funzioni metaboliche per le due isoforme, cioè MT-1 è principalmente coinvolta nell'omeostasi dei metalli essenziali, come Cu e Zn, mentre MT-2 svolge il ruolo di disintossicazione dei metalli non essenziali, quali Cd e Hg. Nei cetacei odontoceti l'espressione e il ruolo delle MT sono state evidenziate negli organi in cui si accumulano maggiormente i metalli, ovvero fegato e milza (Das et al., 2002).

1.7.1.2 Citocromo-P450

Il sistema enzimatico CYP-450 è costituito da enzimi mono-ossigenasi coinvolti nella catalizzazione di una vasta gamma di reazioni di ossidazione (idrossilazione alifatica e aromatica, epossidazione, dealchilazione e deaminazione) ed è stato trovato in diversi organismi tra cui batteri, funghi, piante, insetti, pesci, uccelli e mammiferi (Nelson & Strobel, 1987). I substrati sono numerosi e diversi: xenobiotici come inquinanti ambientali e droghe, composti endogeni come ormoni steroidei, acidi grassi e prostaglandine; la maggior parte degli xenobiotici viene metabolizzata dalle famiglie CYP 1-4, in particolare la famiglia CYP1 è composta dagli enzimi CYP1A e CYP1B che

sono molto importanti nel metabolismo e nell'attivazione degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), policlorurati bifenili (PCB), ammine ed ammidi (Godard et al., 2000).

Le informazioni sulle biotrasformazioni xenobiotiche e sugli enzimi P450 nei mammiferi marini sono scarse; tuttavia, in alcuni studi immunocistochimici con vari anticorpi CYP1A di pesce, è stata rilevata l'attività del CYP1A1 in alcune specie di cetacei tra cui *Tursiops truncatus* (Montie et al., 2008).

2. SCOPO

Le due specie di cetacei odontoceti considerate in questo studio di tesi, *T. truncatus* e *S. coeruleoalba*, ad oggi sono il bersaglio di diversi fattori di minaccia a causa del loro lungo ciclo vitale, del basso potenziale riproduttivo, delle piccole dimensioni delle popolazioni e della loro maturità tardiva (Bearzi et al., 2008; Gaspari et al., 2015).

Negli ultimi 25-30 anni, sono stati identificati diversi agenti patogeni microbici che interessano numerose specie di mammiferi acquatici come *Brucella* spp., *Dolphin Morbillivirus* (DMV) e *Toxoplasma* spp. che rappresentano una seria minaccia per la salute e la conservazione di queste due specie (Johnson et al., 2009; Di Guardo et al. 2011; Van Bressemer et al., 2009-2014; Isidoro-Ayza et al., 2014).

Queste specie, così come tutti i cetacei in generale, svolgono ruoli chiave all'interno dell'ecosistema marino: influenzano, infatti, la struttura e la funzione di diverse comunità acquatiche, il riciclo dei nutrienti, e hanno un effetto "top-down" sulla predazione (Ecol et al., 1997). Al fine di evitare che questo delicato equilibrio venga compromesso, risulta fondamentale una maggiore comprensione della biologia riproduttiva e una conoscenza approfondita dello stato di salute delle popolazioni selvatiche (Miller, 2007).

Inoltre, i delfini costieri sono considerate “specie sentinella” ideali per monitorare indirettamente la salute dell’ecosistema marino ed investigare sugli effetti che le attività umane possono avere sulla salute di questi animali (Bossart et al., 2011).

Per questo motivo, lo scopo di questa tesi è quello di presentare una panoramica generale sugli spiaggiamenti di 34 esemplari di tursiope e stenella striata verificatisi tra maggio 2016 e novembre 2022 lungo le coste dell’Adriatico centrale (Abruzzo e Molise). In seguito alle analisi necroscopiche preliminari effettuate dall’Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” (sede di Teramo, Italy), da cui sono stati raccolti i campioni, sono stati identificati agenti patogeni quali *Brucella ceti* - DMV e *Toxoplasma gondii*, principali responsabili delle EIDs “emerging infectious diseases” tramite opportuni esami microbiologici e parassitologici. La presenza di questi agenti eziologici e i differenti parametri biometrici sono stati successivamente messi in relazione allo stato di salute e alla capacità riproduttiva di ciascun animale esaminato al fine di evidenziarne un possibile correlazione. Inoltre, al fine di valutare altri fattori di minaccia, come l’esposizione agli inquinanti organici persistenti (POPs) e ai metalli pesanti, sono state effettuate analisi immunoistochimiche per analizzare la risposta di biomarkers specifici quali CYP-450 e Metallotioneine.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Raccolta dati e campionamento

Nel periodo di tempo compreso tra Maggio 2016 e Novembre 2022, 89 esemplari spiaggiati di tursiope e 15 esemplari spiaggiati di stenella striata sono stati recuperati lungo le coste adriatiche dell'Abruzzo e del Molise dalla rete regionale ufficiale per gli animali spiaggiati.

Questa rete comprende l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" (IZSAM), Centro Studi Cetacei, Guardia Costiera, veterinari locali e uffici comunali. Di questi esemplari spiaggiati, ne sono stati presi in considerazione 43 per lo studio macroscopico: 33 tursiopi e 10 stenelle striate. Tutte le carcasse di cetaceo sono state sottoposte all'esame necroscopico secondo le procedure indicate dal protocollo di intervento sui cetacei spiaggiati morti sul territorio Nazionale (Cre.Di.Ma.), presso il Reparto di Diagnostica specialistica dell'IZSAM e, quando possibile, l'esame necroscopico è stato eseguito direttamente sul posto di rinvenimento. Per ogni intervento su esemplare spiaggiato sono stati raccolti con il supporto del medico veterinario ASL/ AREM e del CSC i seguenti dati:

- la data e le coordinate geo referenziate relative allo spiaggiamento, registrate poi sulla mappa geo-referenziata *Geocetus* e in apposita banca dati;
- identificazione della specie;

- i dati biometrici;
- determinazione del sesso, confermata in sede di esame autoptico;
- assegnazione stato di stato di nutrizione (Mazzariol et al., 2013);
- assegnazione codice di conservazione che va da 1 a 5 (Mazzariol et al., 2013).

Sulla base della lunghezza totale del corpo, ogni esemplare è stato attribuito ad una classe di età: lattante, giovane, sub adulto e adulto (Mazzariol et al., 2013).

Infine, gli esperti dell'IZS-Teramo hanno eseguito un esame necroscopico per la determinazione della causa di morte comprendente: un esame ispettivo esterno, un esame macroscopico degli organi, un esame batteriologico, un esame parassitologico, un esame virologico ed un esame istologico.

Tutti i dati raccolti sono stati inseriti in un datasheet appositamente creato che comprende: anno di spiaggiamento (2016,2017,2018,2019,2010,2021,2022), sede (TE- Teramo), N° registro, specie (*Tursiops truncatus* o *Stenella coeruleoalba*), sesso (maschio o femmina), lunghezza totale (cm), età (lattante, sub adulto, adulto), data e luogo di rinvenimento dell'animale, codice di conservazione (1,2,3,4,5), stato di nutrizione (scarso, discreto, buono, ottimo), Brucella (positivo/negativo), DMV (positivo/negativo), Toxoplasma (positivo/negativo), batteri (presenza/assenza e tipologia), parassiti (presenza/assenza e tipologia), rete (presenza /assenza), causa di morte.

Le successive indagini ai fini di questo studio sono state eseguite presso i laboratori di Biologia dello sviluppo e della riproduzione del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DISVA) dell'Università politecnica delle Marche.

3.2 Preparati istologici: preparazione dei campioni

Dei 43 animali spiaggiati (dataset 1) ne sono stati scelti 34 (25 tursiopi e 9 stenelle striate) sulla base dello stato di conservazione della carcassa e della presenza sia del fegato che della gonade propri degli individui per effettuare le successive analisi istologiche.

3.2.1 Riduzione dei preparati

I campioni di gonadi e fegato prelevati durante la necropsopia e conservati congelati in banca organi sono stati ridotti utilizzando delle lame da bisturi e posti nel fissativo "FORMOL" ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O} + \text{NaOH} + \text{Formaldeide (36.5\%)} + \text{Glutaraldeide (25\%)} + \text{H}_2\text{O}$) per un periodo di tempo adeguato (almeno 48 h). Le dimensioni del pezzo dovevano essere adatte per l'inserimento in apposite cassette monouso di resina acetlica per istologia, dette "biocassette" (Bio-Optica, Milan, Italy) opportunamente contrassegnate con il codice ID del campione.

3.2.2 Inclusione in paraffina (processazione)

I campioni, sistemati nelle biocassette, sono stati lavati mediante bagni in etanolo (70%) per tre volte (15 minuti ciascuno) e conservati nella stessa soluzione di etanolo 70% fino al processo di inclusione.

Successivamente i campioni sono stati disidratati in soluzioni di etanolo crescenti (80, 95 e 100%), lavati con xilene (Bio-Optica, Milano, Italy), inclusi in paraffina (Bio-Optica) e lasciati solidificare l'intera notte.

3.2.3 Taglio

Per ricavare le sezioni a partire dai blocchi di paraffina solidificata è stato utilizzato il microtomo Leica RM2125 RTS (Biosystems) mediante il quale si sono ottenute sezioni di 5-6 μm . Con l'aiuto di pinzette e pennellino bagnato, le sezioni dei campioni sono state immerse in acqua calda fino alla completa distensione ed eliminazione di pieghe della sezione e successivamente poste su vetrino porta-oggetti opportunamente siglato.

I vetrini con le sezioni adese sono stati fatti asciugare a temperatura ambiente.

Per ogni animale analizzato sono state ottenute un totale di sei sezioni, sia per il fegato che per la gonade, distanziate l'una dall'altra, da almeno 10 tagli in modo da avere una visione globale dell'intero campione.

3.2.4 Colorazione di base con Ematossilina-Eosina (H-E) (Merck KGaA)

Per il protocollo di colorazione, i vetrini hanno subito un processo di sparaffinatura attraverso due bagni consecutivi in xilene (Bio-Optica, Milano, Italy) di 10 minuti ciascuno ai quali sono seguiti, bagni in alcol a concentrazione decrescente (100% I e II, 95%, 80% e 70 %) di 5 minuti ciascuno ed infine un lavaggio in acqua corrente per 10 minuti.

Tutte le sezioni preparate sono state sottoposte ad una colorazione con ematossilina di Mayer ed eosina (H-E) attraverso l'immersione dei campioni in ematossilina per 1,5 minuti seguito da un lavaggio in acqua corrente per 5 minuti e una successiva immersione in eosina per 35 secondi, un lavaggio in acqua corrente per 2 minuti e da una disidratazione attraverso 10 bagni in una scala crescente degli alcoli (70%, 80%, 95%, 100% I) con immersione di 1 minuto in etanolo 100% finale ed un passaggio in xilene di montaggio per almeno 10 minuti.

Appena terminato tale processo, sul vetrino porta-oggetto, all'altezza della sezione colorata, è stato fatto aderire un vetrino copri-oggetto usando una colla acrilica trasparente per preparati istologici SafeMount® (Bio-Optica, Milan, Italy).

3.2.5 Colorazione P.A.S. – A (Periodic Acid Schiff)

Le sezioni di ovaio di 8 esemplari selezionati sono state anche sottoposte alla colorazione P.A.S, il cui protocollo prevede:

- Portare le sezioni all'acqua distillata
- Portare il reagente A a temperatura ambiente
- Porre 5-10 gocce del reagente A su ogni sezione: lasciare agire 10 minuti a temperatura ambiente
- Lavare i vetrini più volte in acqua distillata
- Porre 5-10 gocce del reagente B su ogni sezione: lasciare agire 10 minuti
- Lavare in acqua distillata
- Porre 5-10 gocce del reagente C su ogni sezione lasciare agire 20 minuti
- Lavare in acqua distillata
- Porre 5-10 gocce della soluzione D su ogni sezione: lasciare agire 2 minuti
- Sgocciolare il vetrino e, senza lavare, porre su ogni sezione 5-10 gocce del reagente E: lasciare agire 2 minuti
- Lavare in acqua distillata
- Porre su ogni sezione 5-10 gocce del reagente F: lasciare agire 3 minuti
- Far virare in acqua corrente di fonte per 5 minuti
- Disidratare nella serie ascendente degli alcol, xilene e balsamo.

La digestione su sezione istologica con soluzione di amilasi seguita dalla reazione PAS è indicata quando si voglia eliminare il glicogeno per osservare solo polisaccaridi e mucine neutre epiteliali. La specificità di questa reazione è basata sull'ossidazione elettiva mediante acido periodico dei gruppi: 1,2-glicolico, aminico primario, aminico secondario e 1-idrossi-2-chetonico. Durante questa ossidazione avviene la rottura del legame tra gli atomi di carbonio situati in posizione 1,2 con conseguente formazione di gruppi aldeidici e nella reazione successiva i due gruppi aldeidici strettamente contigui vengono trasformati dalla fucsina solforosa del reattivo di Schiff in un composto colorato insolubile (Bio-Optica Milano S.p.A.).

3.2.6 Osservazione al microscopio ottico

Tutte le sezioni sono state osservate utilizzando un microscopio ottico Zeiss Axio Imager.A2 e le immagini sono state scattate utilizzando una fotocamera digitale a colori combinata Zeiss Axiocam 503.

Sono state selezionate e scelte un totale di sei foto per ogni campione.

Alla fine delle analisi istologiche è stato possibile individuare la presenza di alterazioni istopatologiche nelle gonadi e nel fegato. Queste, sono state riportate nel dataset 2 ed associate ad ogni individuo insieme agli altri parametri raccolti durante la necropsia e le successive analisi effettuate presso L'IZSAM precedentemente descritte nel paragrafo 2.1.

3.3 Immunoistochimica

Per lo studio immunoistochimico sono stati analizzati preliminarmente 6 campioni di fegato di *S. coeruleoalba* e 8 di *T. truncatus* riportati nel Dataset 3, in cui per ogni esemplare è stato riportato: anno di spiaggiamento (2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022), sede (TE), N° registro, specie (*Tursiops truncatus* o *Stenella coeruleoalba*), sesso (maschio o femmina), lunghezza totale del corpo (cm), età (lattante, sub adulto, adulto), data e luogo di rinvenimento dell'animale, codice di conservazione (1,2,3,4), stato nutrizione (scarso, discreto, buono, ottimo), Brucella (positivo/negativo), DMV (positivo/negativo), Toxoplasma (positivo/negativo), batteri (presenza/assenza e tipologia), parassiti (presenza/assenza e tipologia), maturità sessuale (immaturo/maturo), alterazioni istopatologiche gonade, alterazioni istopatologiche fegato, MT (positivo/negativo), CYP1A1 (positivo/negativo).

I campioni per le analisi immunoistochimiche sono stati conservati e processati per i processi di inclusione e taglio al microtomo come già descritto per i campioni sottoposti ad analisi istologica. Le sezioni tagliate al microtomo sono state poste su vetrini gelatinizzati con gelatina, il cui protocollo di preparazione prevede una soluzione composta da 5 g di gelatina e 1 L di acqua, miscelando attraverso un agitatore, aggiungendo successivamente 0,5 g di solfato di cromopotassio.

I vetrini sono stati, successivamente, trattati con una soluzione di antigen retrieval (10 mM citrato di sodio e 0,05% (v/v) Tween-20, a pH 6) per 20 minuti a 100°C.

Dopo 5 min di lavaggio in acqua deionizzata, è stata aggiunta una soluzione di permeabilizzazione contenente 1% (v/v) Triton X100 in PBS per 20 minuti. Sono stati fatti tre lavaggi con PBS per tre minuti ciascuno. Il bloccaggio è stato effettuato con una soluzione al 3% (p/v) di BSA e 0,1% (v/v) di Tween-20 per un' ora ed i vetrini sono stati incubati overnight con gli anticorpi primari (concentrazione 1:100) a 4°C (Rabbit anti-Cod MT, Polyclonal antibody, KH-1 e Rabbit anti-fish CYP1A peptide, Polyclonal antibody, CP-226).

In seguito sono stati effettuati tre lavaggi uguali a quelli descritti in precedenza, si è passati all'incubazione con l'anticorpo secondario Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (ab150077, Abcam) (concentrazione 1:500) a 37°C per un'ora e mezza.

Le concentrazioni di entrambi gli anticorpi sono state ottimizzate preliminarmente con opportuni test a diverse diluizioni.

Sono stati ripetuti i lavaggi ed è stato montato un vetrino copri-oggetto grazie ad una soluzione di montaggio con il fluorocromo che colora i nuclei (Mounting Medium With DAPI - Aqueous, Fluoroshield (ab104139, Abcam)).

L'analisi qualitativa dei dati è stata effettuata visionando i vetrini al microscopio confocale Nikon A1R.

3.4 Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto software JASP 0.17 per Windows. Tutti i dati riportati nei 3 dataset (dataset 1 macroscopico, dataset 2 istologico, e dataset 3 immunohistochimico) sono stati analizzati dalla correlazione di Pearson. A ciascuna variabile è stato assegnato un valore numero: **Anno:** anno di spiaggiamento (16-17-18-19-20-21-22); **Specie:** *Tursiops truncatus* (0) o *Stenella coeruleoalba* (1); **Sesso:** maschio (0) o femmina (1); **Lunghezza tot.:** (cm); **codice di conservazione:** 1,2,3,4, 5; **stato nutrizione:** scarso (0), discreto (1), buono (2), ottimo (3); **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo (1) o negativo (0); **DMV:** dolphin morbillivirus, positivo (1) o negativo (0); **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo (1) o negativo (0); **batteri:** presenza (1) o assenza (0); **parassiti:** presenza (1) o assenza (0); **maturità sessuale:** immaturo (0) o maturo (1); **vacuolizzazione:** assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **Anom. Morf. Foll:** anomalia morfologia del follicolo, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **inf.g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **vasi sanguigni e inf. nella parete:** vasi sanguigni con

infiltrati di globuli bianchi nella parete, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **necrosi:** assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **Embolia gassosa:** assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **Infiltrazione g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **necrosi epatica:** assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4); **ispess. parete vasi sanguigni e inf.g.b.:** ispessimento della parete dei vasi sanguigni con associata infiltrazione di globuli bianchi, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4).; **LLC:** “liver lesion cystic”, lesioni cistiche epatiche, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4).; **emolisi:** assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4).; **riserva lipica:** grasso, assente (0), scarsa (1), abbondante (2), abbondantissima (4).. **MT:** metallothioneina, positivo (1) o negativo (0); **CYP-450:** CYP1A1, positivo (1) o negativo (0). La significatività è stata fissata a $p \leq 0,05$.

4. RISULTATI e DISCUSSIONI

4.1 Malattie infettive emergenti (EIDs: emerging infectious diseases)

Dalle preliminari analisi microbiologiche e parassitologiche effettuate su un totale di 43 esemplari di tursiopi e stenelle striate spiaggiati, tra il 2016 ed il 2022, lungo le coste dell'Adriatico centrale (dataset 1), emerge che la specie prevalentemente colpita dalle EIDs sia *Stenella coeruleoalba*: infatti, è bersaglio di tutti e tre gli agenti patologici mentre la specie *Tursiops truncatus* non è affetta dal DMV, è debolmente soggetta a Brucella (solo un caso positivo al siero) e risulta essere quella colpita maggiormente da Toxoplasma (fig. 23 A).

Più in dettaglio, distinguendo il sesso maschile da quello femminile, in *S. coeruleoalba*, generalmente, le femmine sono quelle maggiormente colpite; infatti, i maschi non sono bersaglio di Toxoplasma e sono meno soggetti a Brucella e DMV (fig. 24A; 23B).

Invece, in *T. truncatus*, le femmine sono il solo bersaglio di Brucella mentre i maschi sono affetti solamente da Toxoplasma (fig. 24B; 23B).

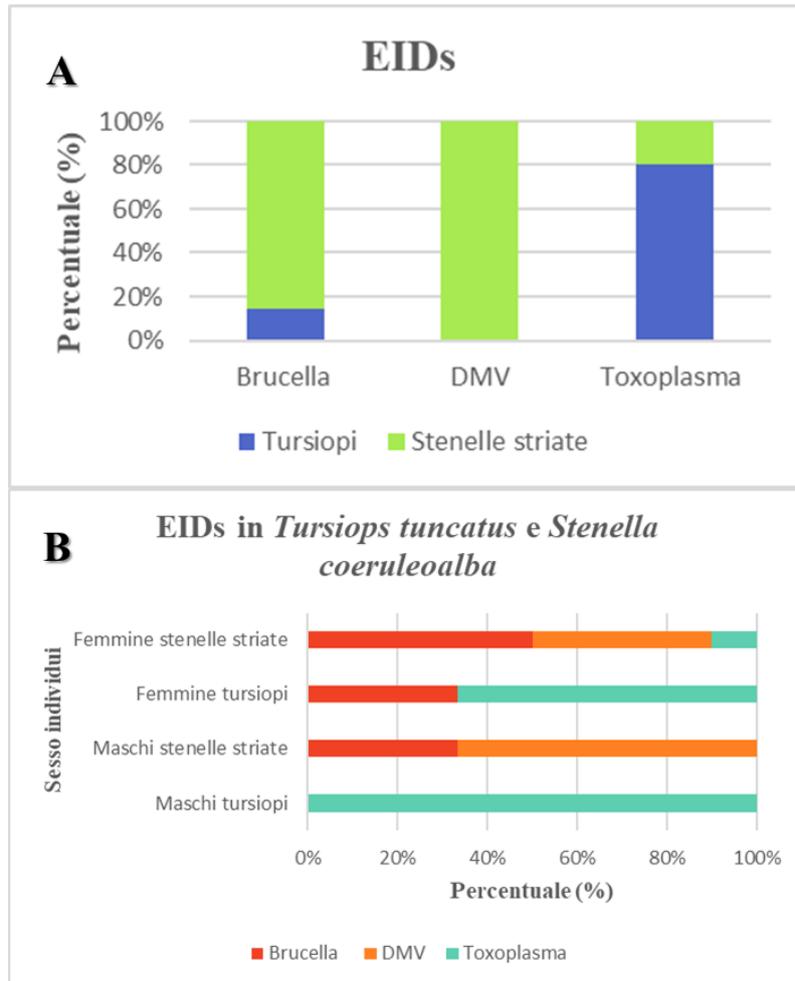


Figura 23: (A) percentuale (%) di tursiopi e stenelle striate colpita rispettivamente da Brucella, DMV e Toxoplasma (EIDs: emerging infectious diseases). (B) percentuale (%) di maschi e femmine in *S. coeruleoalba* e *T. truncatus* affetta rispettivamente da Brucella, DMV e Toxoplasma (EIDs: emerging infectious diseases).

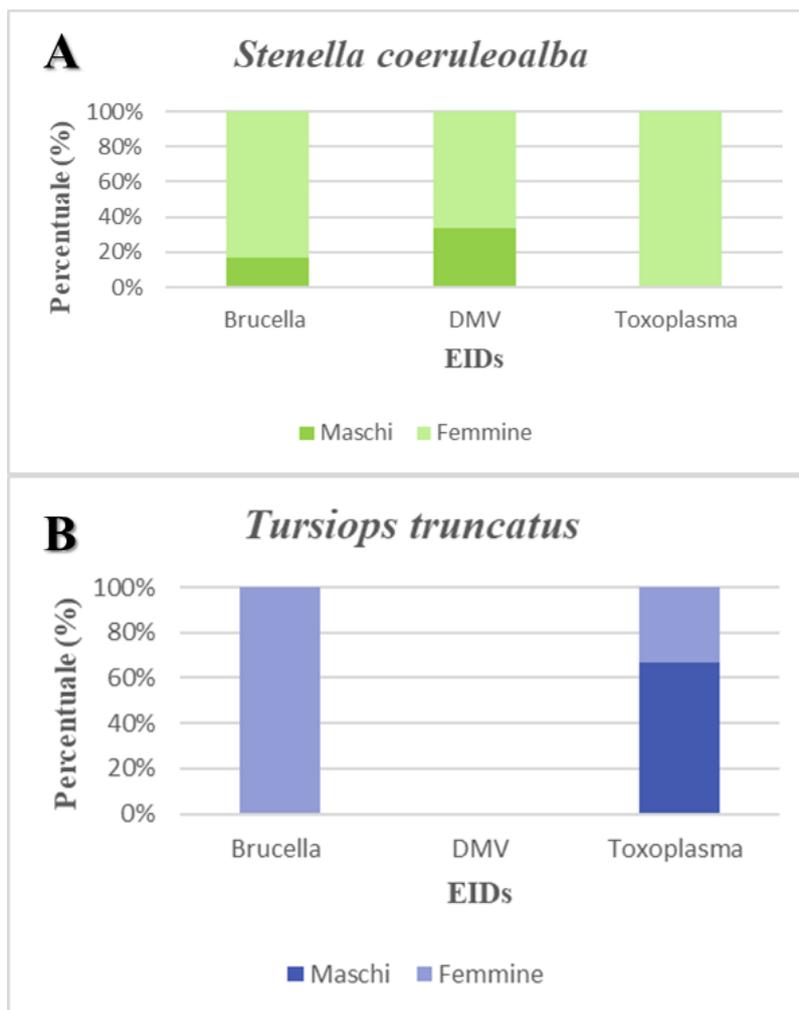


Figura 24: (A) percentuale (%) di maschi e femmine in *S. coeruleoalba* affetta rispettivamente da Brucella, DMV e Toxoplasma (EIDs: emerging infectious diseases). (B) percentuale (%) di maschi e femmine in *T. truncatus* affetta rispettivamente da Brucella, DMV e Toxoplasma (EIDs: emerging infectious diseases).

In *S. coeruleoalba* non sono presenti lattanti e giovani, tutti gli esemplari sono prevalentemente adulti ed in misura minore sub adulti (fig. 25A).

In *T. truncatus*, invece, sono presenti tutte le classi di età: il maggior numero di individui appartiene alla classe degli adulti, poi a seguire i sub adulti, i lattanti ed i giovani (fig. 25B).

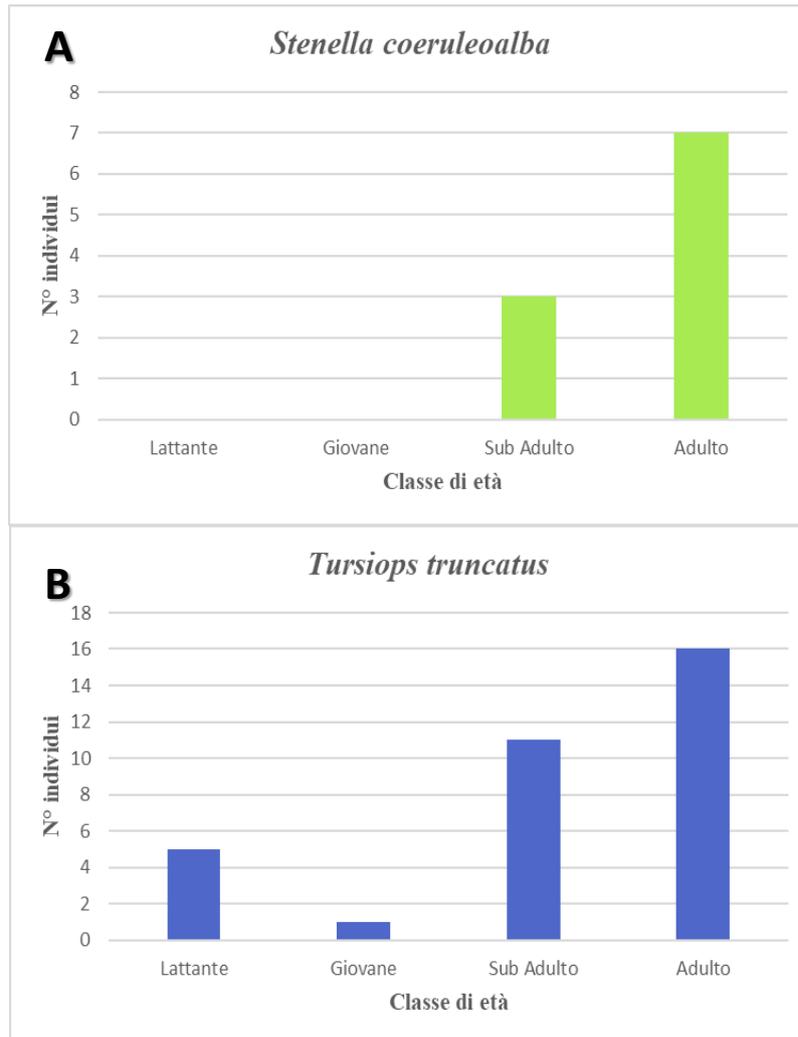


Figura 25: (A) Numero di stenelle striate appartenente a ciascuna classe di età: lattante, giovane, sub adulto e adulto. (B) Numero di tursiopi appartenente a ciascuna classe di età: lattante, giovane, sub adulto e adulto.

4.2 Analisi istologiche

A seguire, con le analisi istologiche effettuate su 34 esemplari selezionati (dataset 2), è stato possibile stabilire lo stadio di maturità sessuale di ciascun individuo anche in relazione alla sua lunghezza ed età. Tuttavia, non tutti gli individui mostravano un codice di conservazione ottimale per tali analisi.

Infatti, le difficoltà sono molte quando si lavora su animali spiaggiati e ciò è dovuto al fatto che spesso l'animale muore al largo. A causa della cospicua quantità di grasso presente nel corpo dei cetacei, la loro densità media non è molto differente da quella dell'acqua di mare, anzi, nella maggior parte delle specie è leggermente superiore, comportando la necessità del nuoto per il galleggiamento e, quindi, l'affondamento degli individui morti. Per tale motivo, quando la carcassa viene segnalata sul sito di spiaggiamento sono già passati molti giorni, ossia prima che le fermentazioni batteriche, producendo gas al suo interno, la riportino in superficie e le onde la dirigano sulle coste. Nella specie *S. coeruleoalba*, entrambe i sessi mostrano una % maggiore di esemplari maturi rispetto agli immaturi sessualmente; in particolare, spiaggiano maggiormente le femmine mature di stenella striata (fig. 26A, C). Nella specie *T. truncatus*, entrambe i sessi mostrano una percentuale (%) maggiore di esemplari maturi rispetto agli immaturi sessualmente ma, rispetto a *S. coeruleoalba*, le percentuali (%) dei due sessi differiscono in maniera meno significativa (fig. 26B, C).

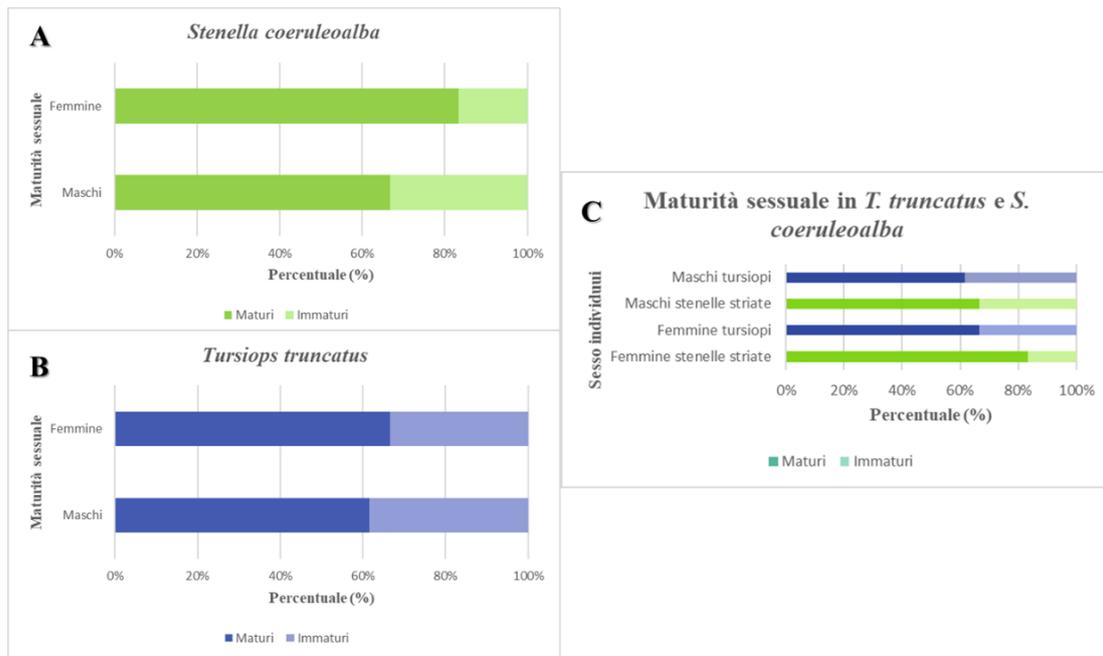


Figura 26: (A) percentuale (%) di stenelle striate maschi e femmine, sia maturi che immaturi sessualmente. (B) percentuale (%) di tursiopi maschi e femmine, sia maturi che immaturi sessualmente. (C) percentuale (%) di maschi e femmine, immaturi e maturi sessualmente, in entrambe le specie *T. truncatus* e *S. coeruleoalba*.

Per entrambe le specie è stato possibile determinare anche se gli esemplari maschili e femminili appartenenti alla classe di età “sub adulti” abbiano già raggiunto la maturità sessuale o se siano ancora immaturi sessualmente.

In *S. coeruleoalba* non sono state individuate femmine sub adulte mature sessualmente, mentre la percentuale (%) degli individui maschili sub adulti maturi ed immaturi sessualmente si equivale (fig. 27A).

Invece, in *T. truncatus* per entrambe i sessi si hanno sub adulti maturi ed immaturi: le femmine mostrano percentuali (%) equivalenti di sub adulti maturi

ed immaturi sessualmente mentre per i maschi la percentuale (%) è a favore degli individui ancora immaturi sessualmente (fig. 27B).

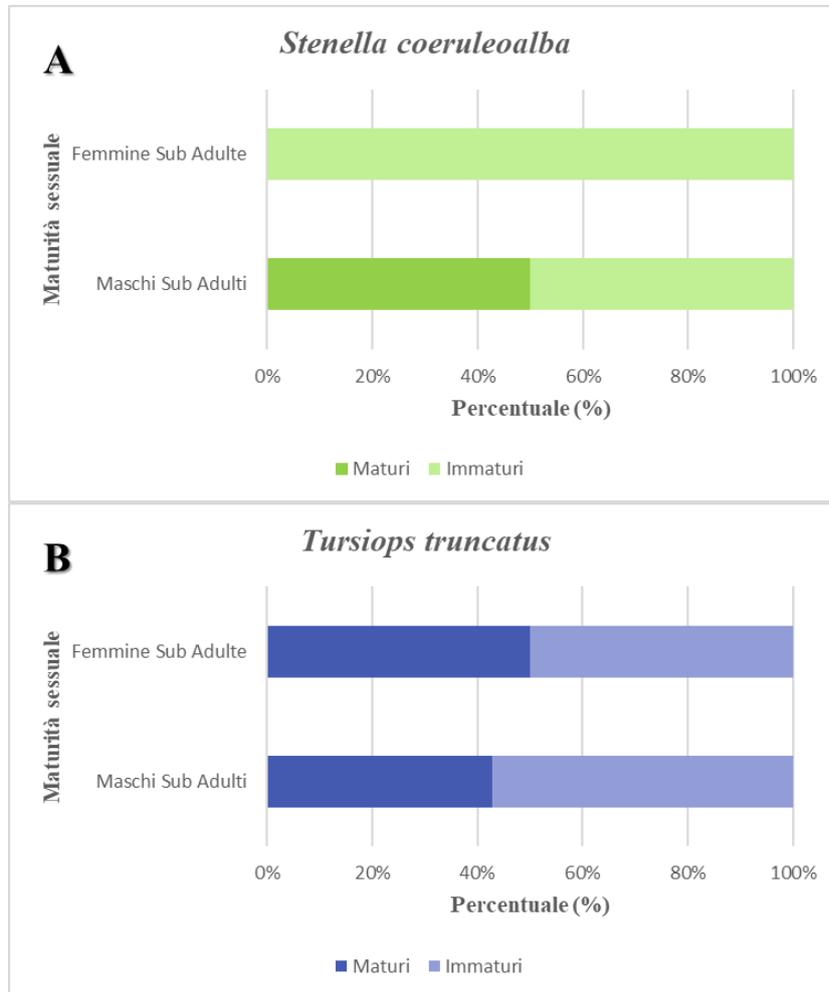


Figura 27: (A) Percentuale (%) degli esemplari maschili e femminili sub adulti in *S. coeruleoalba*, sia maturi che immaturi sessualmente. (B) Percentuale (%) degli esemplari maschili e femminili sub adulti in *T. truncatus*, sia maturi che immaturi sessualmente.

In *S. coeruleoalba*, fra gli individui maturi sessualmente, il genere femminile è quello maggiormente affetto dalle EIDs: infatti, mostra la percentuale (%) d'infezione maggiore per Brucella e DMV (fig. 28A).

In *T. truncatus*, fra gli individui maturi sessualmente, il genere femminile è l'unico colpito da Brucella, seppur risultato positivo solo nel siero; la percentuale (%) di maschi e femmine colpita da Toxoplasma si equivale mentre né maschi né femmine sono soggetti a DMV (fig. 28B).

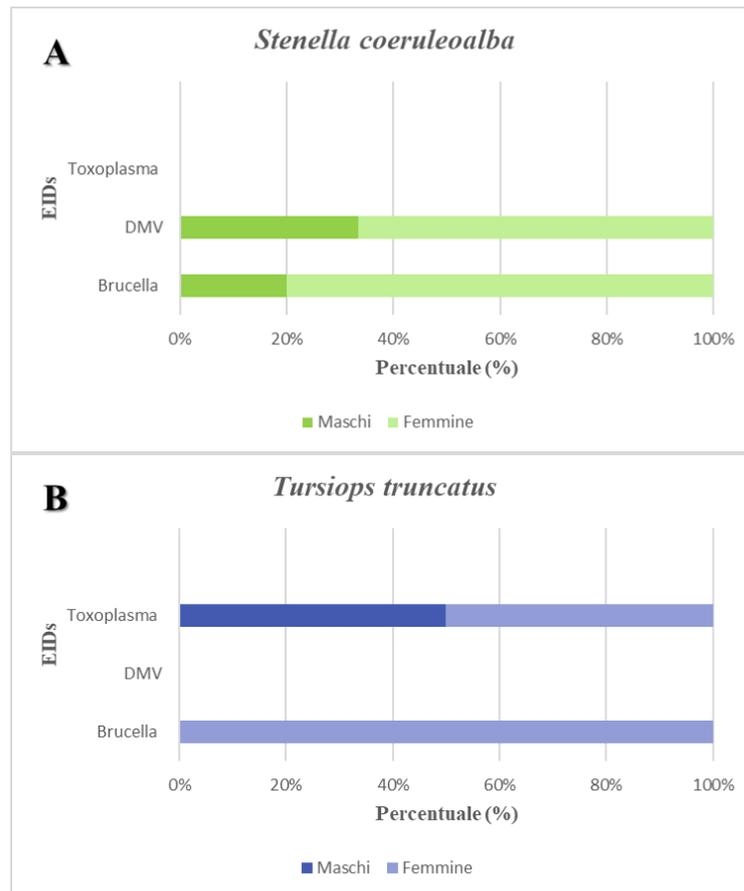


Figura 28: (A) Percentuale (%) degli individui maschili e femminili maturi sessualmente e colpiti dalle EIDs in *S. coeruleoalba*. (B) Percentuale (%) degli individui maschili e femminili maturi sessualmente e colpiti dalle EIDs in *T. truncatus*.

4.2 Analisi istologiche

Le analisi istologiche hanno anche portato a sottolineare la presenza di chiare ed evidenti alterazioni istopatologiche nei campioni di ovaie, testicoli e fegato analizzati per entrambe le specie.

Ciò che è emerso per le gonadi è stata la presenza di: vacuolizzazione citoplasmatica (fig. 29A; B), anomalia nella morfologia follicolare (fig. 30A; B), infiltrazione tissutale di globuli bianchi (fig. 29C; 30A, B, C; 31A, B, C; 32A, B, C, D), vasi sanguigni con presenza di infiltrazione nella parete (fig. 31A, B, C), necrosi (fig. 29C, D; 31A) ed embolia gassosa (fig. 32C, D).

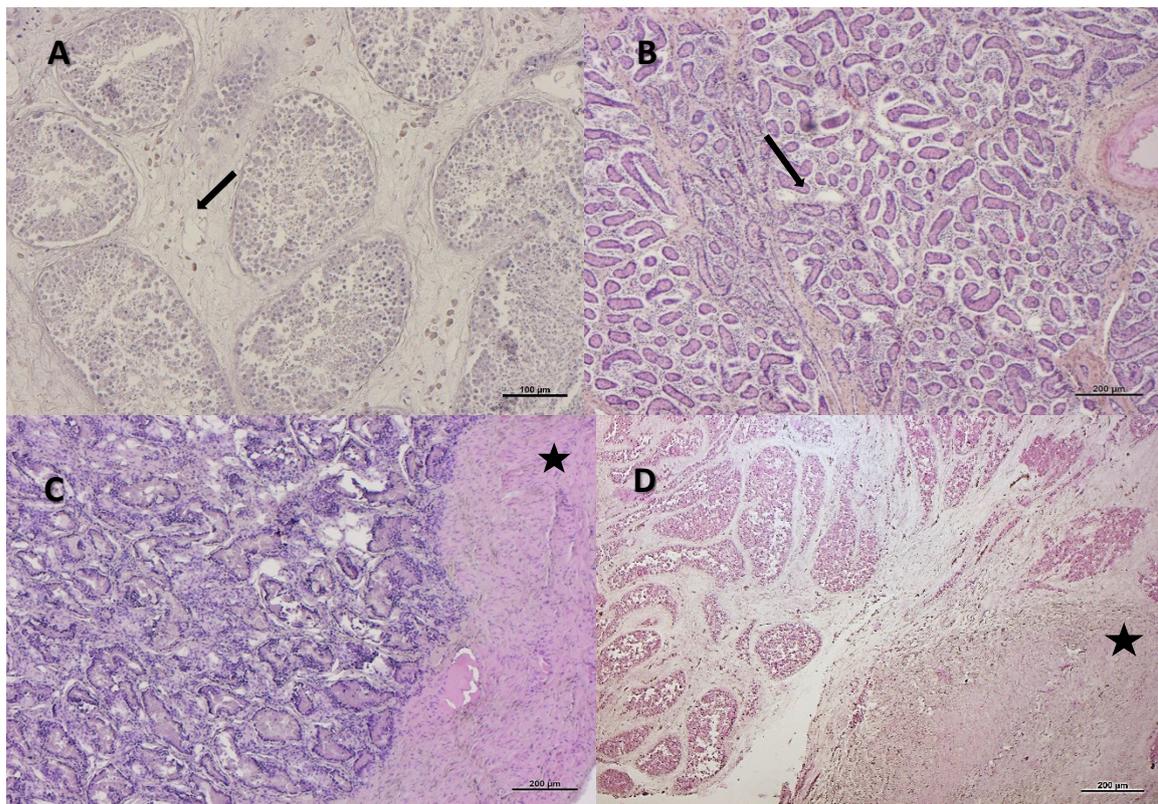


Figura 29: esempi di sezioni istologiche di testicolo. **(A)** Tursiope sub adulto maturo, la freccia nera indica le zone vacuolate. Scala: 100 μm . **(B)** Stenella striata adulta, la freccia nera indica le zone vacuolate. Scala: 200 μm . **(C)** Tursiope adulto, ★ indica la necrosi corticale. Scala: 100 μm . **(D)** Tursiope adulto, ★ indica la necrosi acuta. Colorazione H-E. Scala: 200 μm .

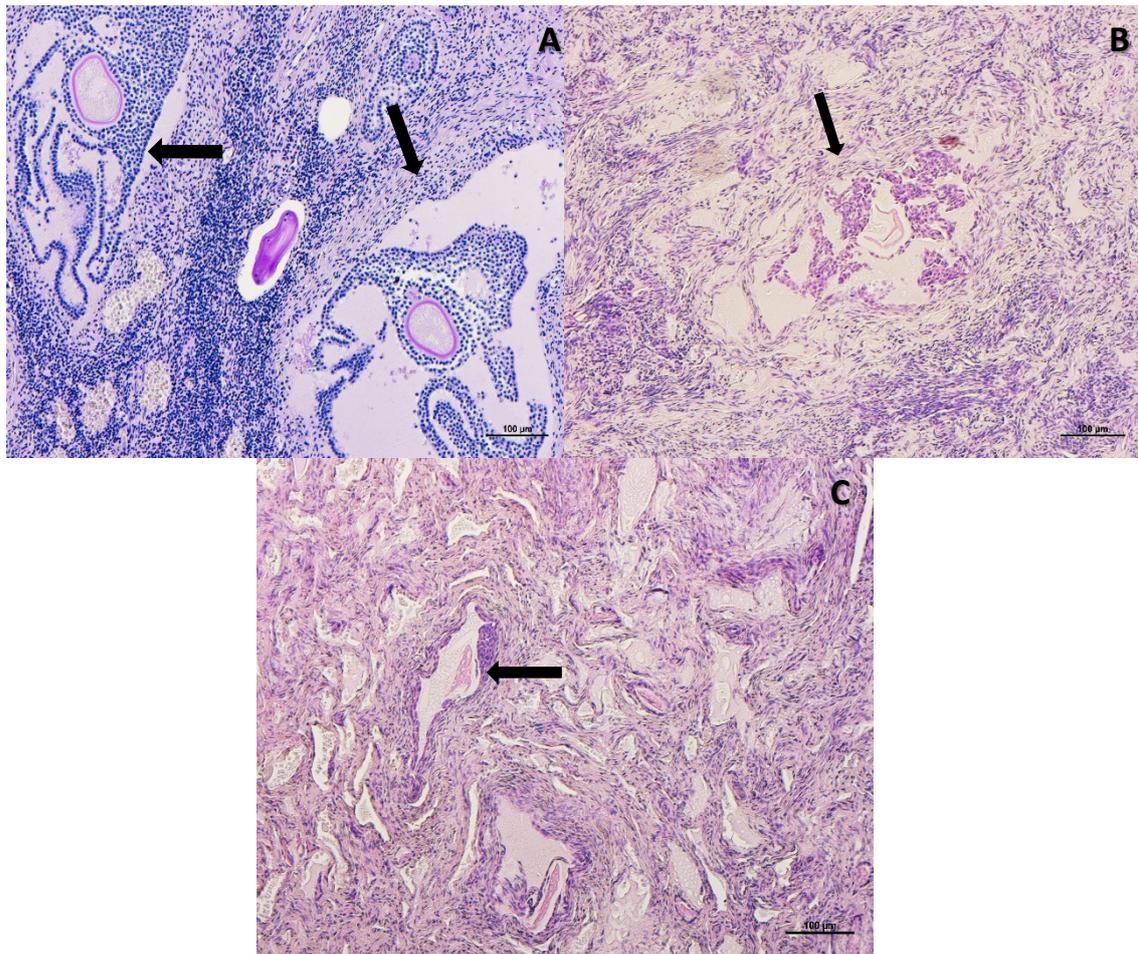


Figura 30: esempi di sezioni istologiche delle ovaie. **(A)** Tursiope femmina adulta, le frecce nere indicano un'anomalia nella morfologia del follicolo graafiano. colorazione P.A.S.-A. **(B)** Stenella striata femmina adulta, la freccia nera indica un' anomalia nella morfologia del follicolo graafiano. **(C)** Tursiope femmina adulta, la freccia nera indica follicoli

di una normale morfologia e a differenti stadi di maturazione. Colorazione H-E. Scala: 100 μm .

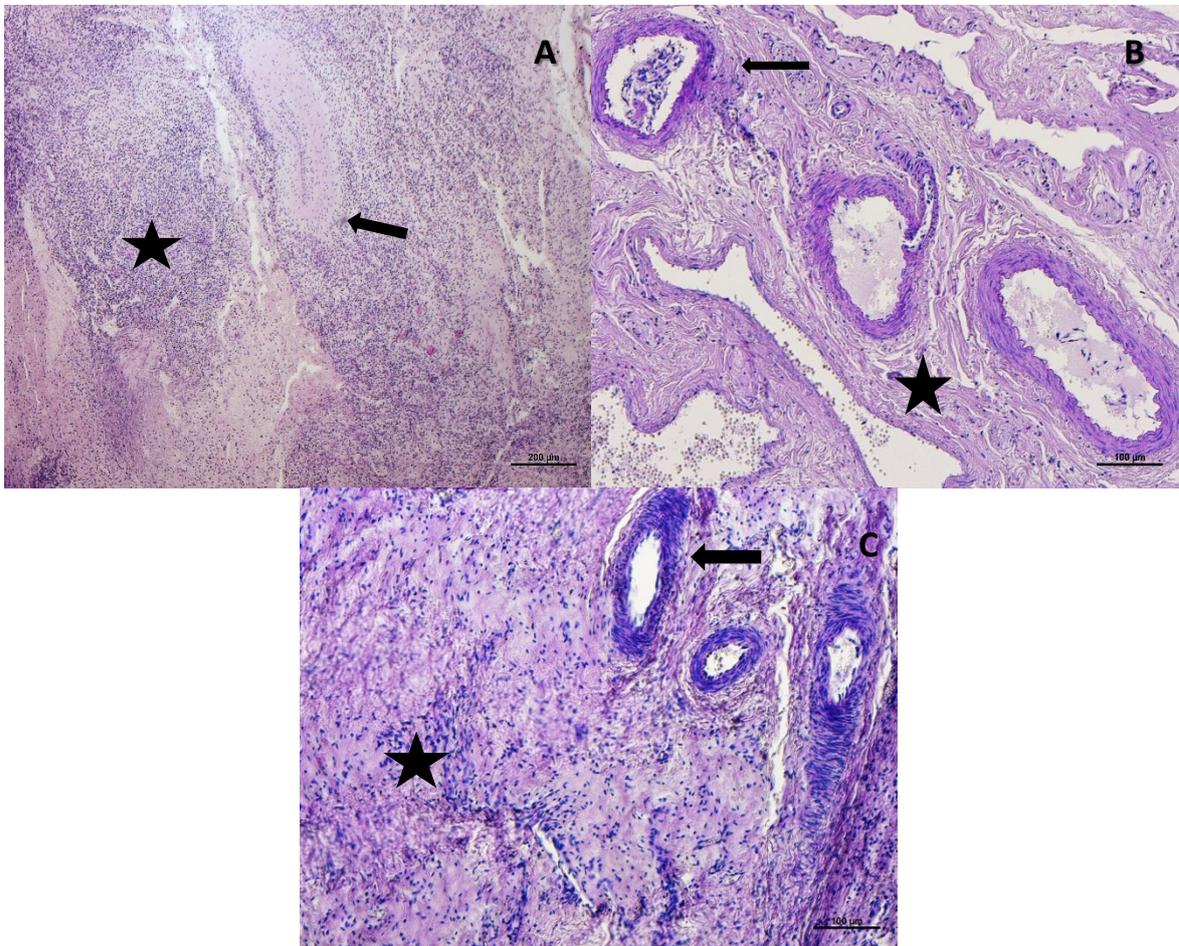


Figura 31: esempi di sezioni istologiche di ovaio in *Tursiops truncatus*. (A) Femmina

adulta, la ★ indica una massiccia infiltrazione tissutale di globuli bianchi, la freccia nera indica la presenza di infiltrati anche nella parete di un vaso sanguigno. Scala: 200 μm . Colorazione H-E. (B) Femmina adulta, la ★ indica un'infiltrazione tissutale di globuli bianchi, la freccia nera indica un'infiltrazione di globuli bianchi nella parete di un vaso sanguigno. Scala: 100 μm . Colorazione P.A.S.-A. (C) Femmina lattante immatura, la ★

indica una massiccia infiltrazione tissutale di globuli bianchi, la freccia nera indica un'infiltrazione di globuli bianchi nella parete del vaso sanguigno. Scala: 100 μ m.

Colorazione P.A.S.-A.

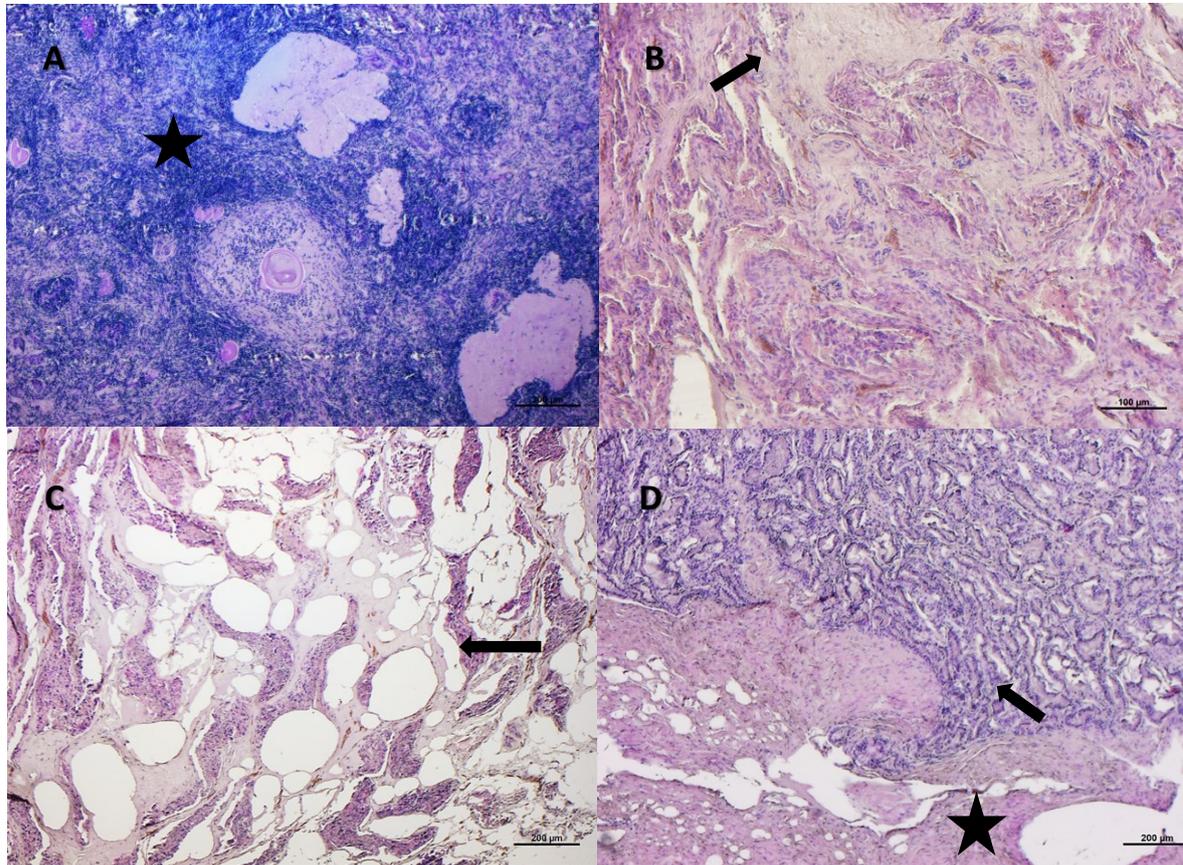


Figura 32: esempi di sezioni istologiche di ovaio e testicolo. **(A)** Stenella striata femmina

adulta, la \star indica un'abbondantissima infiltrazione tissutale di globuli bianchi. Scala:

200 μ m. Colorazione P.A.S.-A. **(B)** Tursiope maschio adulto, la freccia nera indica una

marcata necrosi. Scala: 100 μ m. Colorazione H-E. **(C)** Tursiope maschio adulto, la freccia

nera indica l'embolia gassosa intravascolare. Scala: 200 μ m. Colorazione H-E. **(D)** Stenella

striata maschio sub adulto maturo, la \star indica un'embolia gassosa e la freccia nera indica

un'infiltrazione tissutale di globuli bianchi. Scala: 200 μ m. Colorazione H-E.

Invece, le analisi istologiche nel fegato hanno messo in evidenza la presenza di: infiltrazione cronica di globuli bianchi (fig. 33A, B; 34A, B, D), necrosi epatica (fig. 33A, B, C; 34A, B, D), ispessimento della parete dei vasi sanguigni con infiltrazione di globuli bianchi (fig. 33A, C; 34B), emolisi (fig. 33A, B, C; 34B) ed embolia gassosa (fig. 34B, D). Inoltre, per ogni esemplare è stata valutata la presenza o assenza di riserva lipidica nel tessuto epatico.

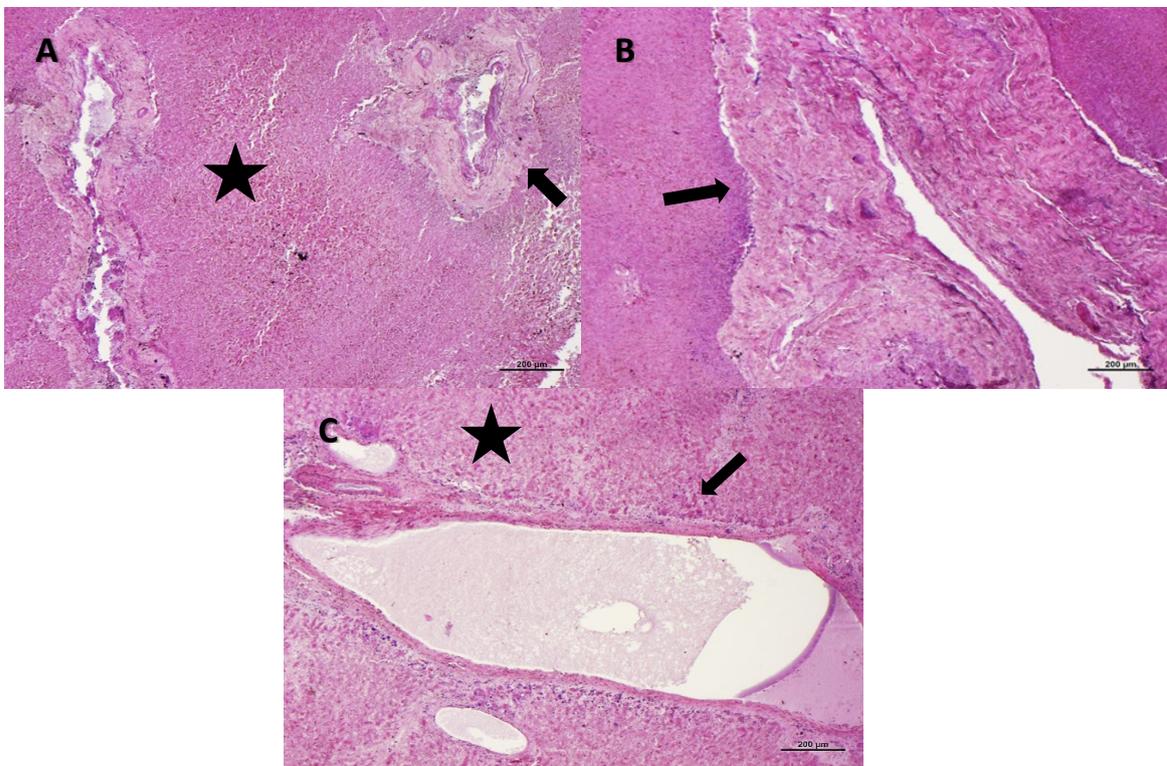


Figura 33: esempi di sezioni istologiche del fegato. (A) Tursiope maschio adulto, la ★ indica la necrosi ed infiltrazione di globuli bianchi, la freccia nera indica ispessimento della parete del vaso sanguigno e infiltrazione associata ed emolisi. (B) Tursiope maschio adulto, la freccia nera indica un'infiltrazione di globuli bianchi nella parete del vaso sanguigno ed

emolisi. (C) *Stenella striata* maschio sub adulto immaturo, la ★ indica la necrosi, la freccia nera indica un ispessimento della parete del vaso sanguigno con infiltrazione associata ed emolisi. Scala: 200 μm. Colorazione H-E.

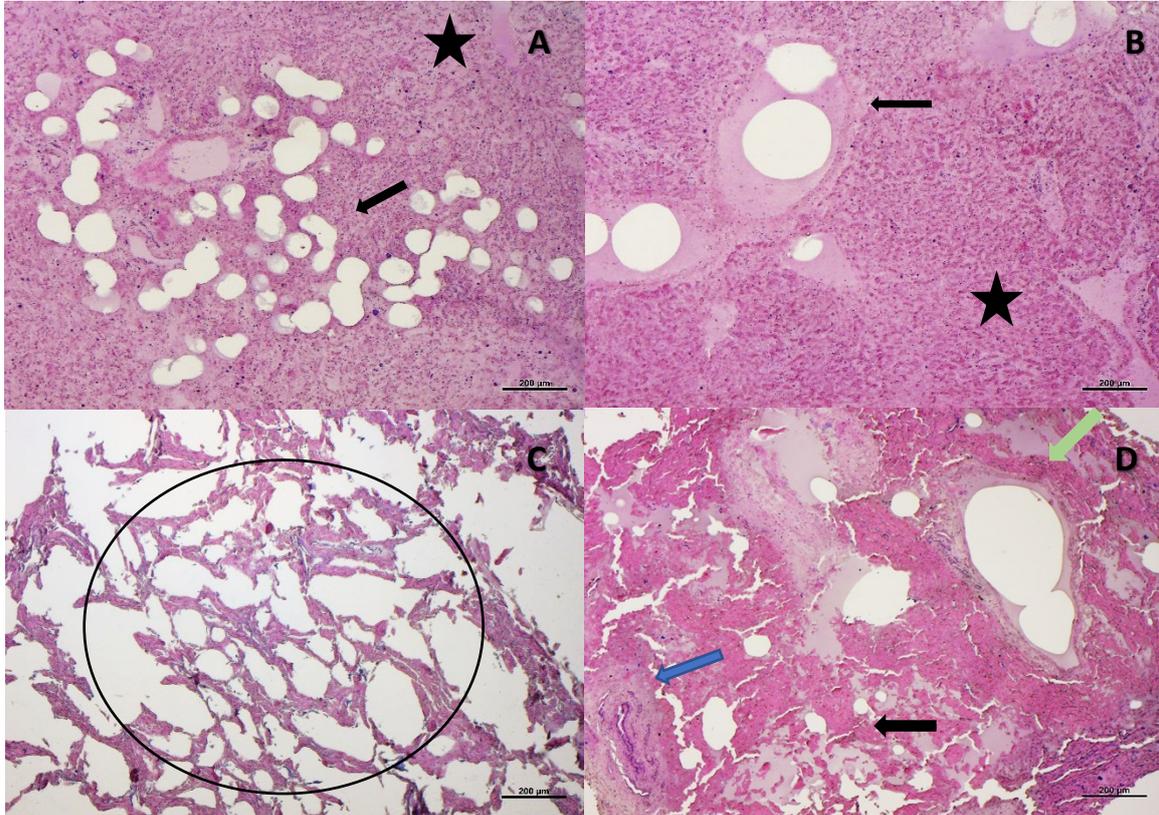


Figura 34: esempi di sezioni istologiche del fegato. (A) *Stenella* maschio sub adulto immaturo, la ★ indica necrosi epatica con infiltrazione cronica di globuli bianchi, la freccia nera indica abbondante riserva lipidica nel tessuto epatico. (B) *Stenella* maschio sub adulto immaturo, la ★ indica la necrosi epatica ed infiltrazione cronica di globuli bianchi, la freccia nera indica un vaso sanguigno con emolisi ed infiltrazione di globuli bianchi nella parete assieme ad embolia gassosa intravascolare. (C) *Tursiope* femmina lattante, il cerchio indica abbondantissima riserva lipidica. (D) *Stenella striata* femmina adulta, la freccia nera indica la necrosi epatica, la freccia blu indica l'ispessimento della parete dei vasi sanguigni

con infiltrazione ed emolisi dei vasi sanguigni, la freccia verde indica un'embolia gassosa.

Scala: 200 μ m. Colorazione H-E.

4.3 Analisi immunoistochimiche

Le analisi immunoistochimiche sono state effettuate in maniera preliminare sul fegato di 6 stenelle striate e 8 tursiopi (dataset 3) al fine di evidenziare, in maniera indiretta, la presenza o assenza dell'esposizione di questi animali spiaggiati ad inquinanti organici persistenti (POPs) e metalli pesanti attraverso l'espressione di biomarkers di risposta, rispettivamente citocromo-P450 (CYP1A1) e metallotioneine (MT).

| SPECIE | ID | MT | CYP1A1 | CTRLNEG |
|---------------|-----------|-----------|---------------|----------------|
| Tursiope | 3432 | 1 | 1 | 0 |
| Tursiope | 12841 | 0 | 1 | 1 |
| Tursiope | 20054 | 1 | 1 | 0 |
| Tursiope | 34232 | 1 | 1 | 0 |
| Tursiope | 95127 | 1 | 1 | 0 |
| Tursiope | 290553 | 1 | 0 | 0 |
| Tursiope | 309172 | 1 | 1 | 0 |
| Tursiope | 314057 | 1 | 1 | 0 |
| Stenella | 2785 | 1 | 1 | 0 |
| Stenella | 19323 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | |
|----------|--------|---|---|---|
| Stenella | 22885 | 1 | 1 | 0 |
| Stenella | 37368 | 0 | 1 | 0 |
| Stenella | 49999 | 1 | 1 | 1 |
| Stenella | 312318 | 1 | 1 | 0 |

Tabella 1: valori di MT-1 e CYP1A1 ottenuti dalle analisi immunocistochemiche su entrambe le specie.

Fra i tursiopi, 6 individui risultano positivi all'espressione di entrambi i biomarkers, mentre un esemplare esprime solo il CYP1A1 e un altro esprime solo le MT (Tab. 1).

Fra le stenelle striate, 4 individui risultano positivi all'espressione di entrambi i biomarkers, mentre un esemplare esprime solo il CYP1A1 (tab. 2).

Come esempio rappresentativo dell'esposizione a inquinanti organici persistenti (POPs) viene riportato un esemplare appartenente alla specie *Tursiops truncatus* (fig. 35).

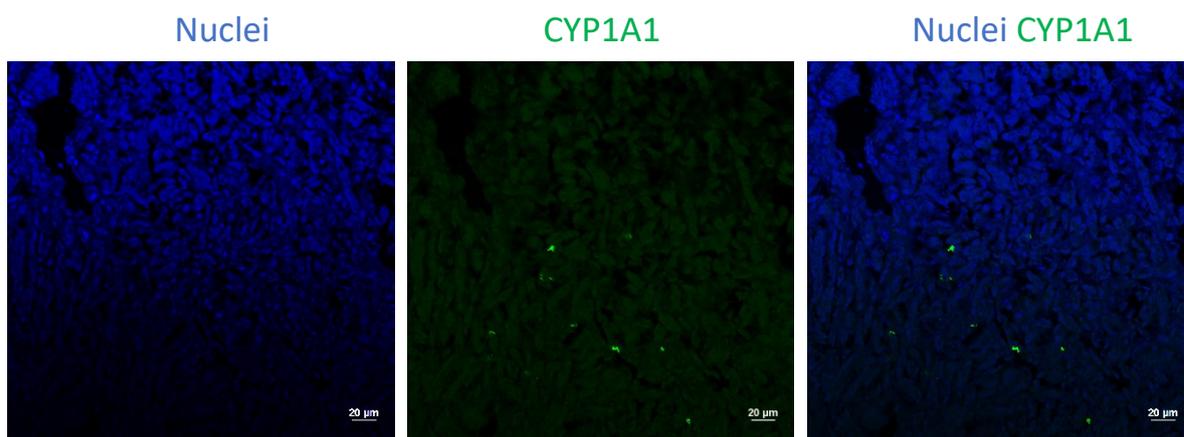


Figura 35: fotografie delle sezioni del fegato di *Tursiops truncatus* rappresentative dell'espressione di CYP1A1. Scala: 20 µm.

Come esempio rappresentativo dell'esposizione a metalli pesanti viene riportato un esemplare appartenente alla specie *Stenella coeruleoalba* (fig. 36).

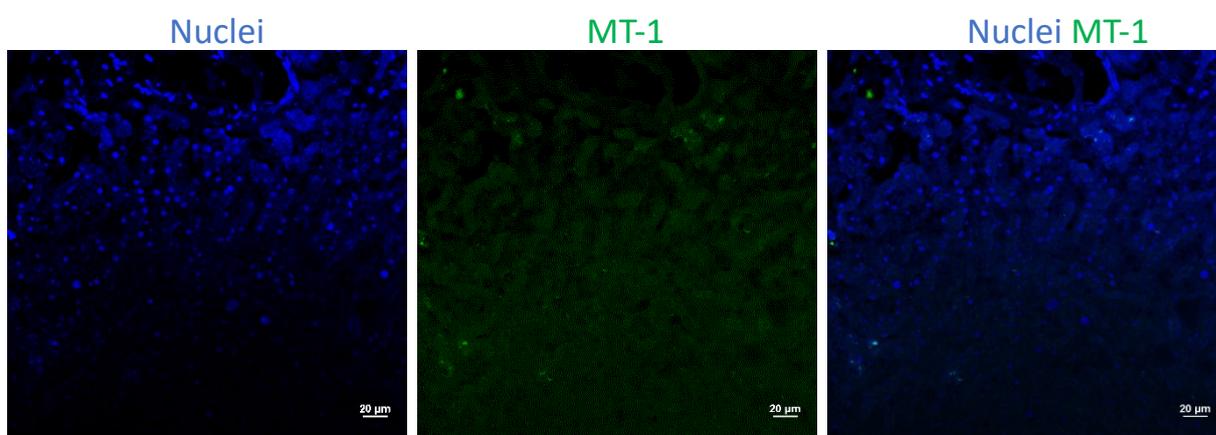


Figura 36: fotografie delle sezioni del fegato di *Stenella coeruleoalba* rappresentative dell'espressione di MT-1. Scala: 20 µm.

Come esempio rappresentativo della non esposizione a inquinanti organici persistenti (POPs) viene riportato un esemplare appartenente alla specie *Stenella coeruleoalba* (fig. 37).

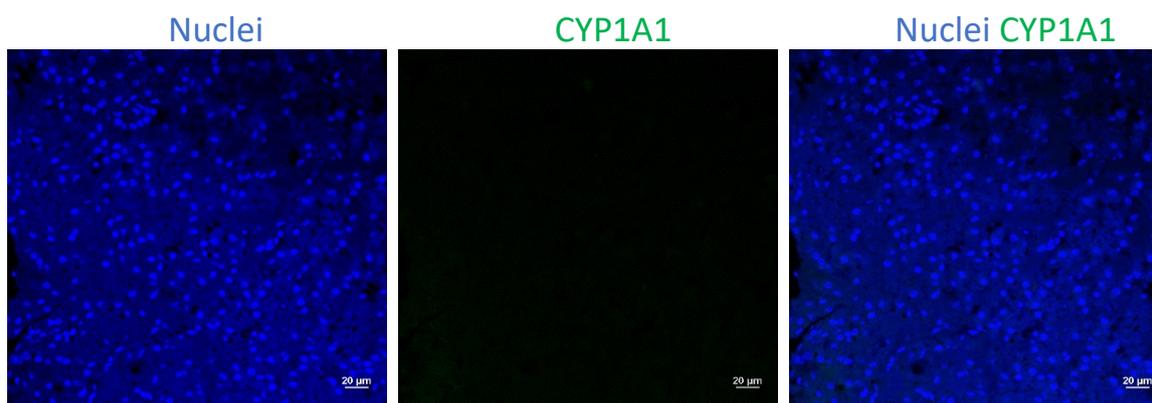


Figura 37: foto delle sezioni del fegato di *Stenella coeruleoalba* rappresentative dell'assenza d'espressione di CYP1A1. Scala: 20 µm.

Come esempio rappresentativo della non esposizione a metalli pesanti viene riportato un esemplare appartenente alla specie *Stenella coeruleoalba* (fig. 38).

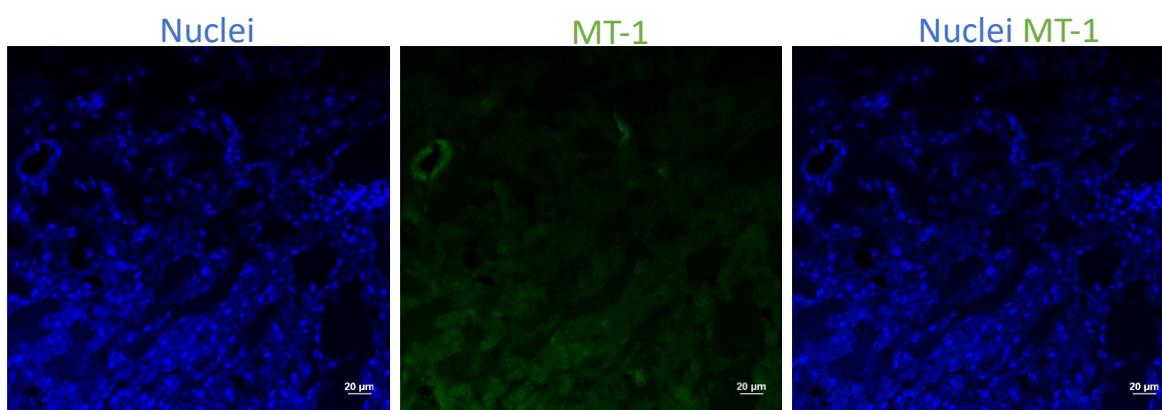


Figura 38: foto delle sezioni del fegato di *Stenella coeruleoalba* rappresentative dell'assenza d'espressione di MT-1. Scala: 20 µm.

4.4. Indice di correlazione lineare di Pearson

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 1, emerge che:

- gli esemplari spiaggiati più di recente sono maggiormente affetti da Brucella: infatti c'è una bassa correlazione positiva statisticamente significativa ($r=0.322$, $p=0.035$) tra anni di spiaggiamento e Brucella e questo risultato potrebbe essere la conseguenza della successiva espansione e diffusione dell'agente patogeno *Brucella ceti* nel Mar Mediterraneo ed in particolare nel Mar Adriatico come già evidenziato in *S. coeruleoalba* da Garofalo et al. nel 2020.
- Le stenelle striate, femmine in particolare, sono le più colpite da Brucella in quanto c'è un'elevata correlazione statisticamente positiva tra specie e Brucella ($r=0.652$, $p=<.001$) e bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra sesso e Brucella ($r=0.325$, $p=0.033$): infatti, ad oggi la brucellosi sembrerebbe essere una malattia infettiva tipica di questa specie come precedentemente dimostrato da Di francesco et al. nel 2019.
- Le stenelle striate prese in considerazione in questo studio sono le uniche, tra le due specie, ad essere infettate dal DMV fatto confermato dall'indice di correlazione di Pearson sottolinea un'elevata correlazione positiva statisticamente significativa tra specie e DMV ($r=0.732$, $p=<.001$).

Ad oggi, sono poche le segnalazioni d'infezione da DMV per la specie *T. truncatus* in Mediterraneo, tuttavia un caso di esemplare spiaggiato e colpito da questo virus è stato recentemente Crespo-Picazo et al. nel 2021.

- In entrambe le specie, le femmine mostrano una vulnerabilità maggiore all'attacco di batteri e parassiti poiché vi è una leggera correlazione positiva statisticamente significativa ($r=0.349$, $p=0.022$ e $r=0.348$, $p=0.022$, rispettivamente): i parassiti, nonostante provochino gravi danni tissutali, non rappresentano direttamente una minaccia per la sopravvivenza dell'individuo, tuttavia agendo sinergicamente potrebbero scatenare una immunosoppressione provocando effetti avversi come già affermato da Cornaglia et al. nel 2000 , Mazzariol et al. nel 2007 e Dawson et al. nel 2008.
- Data la bassa correlazione negativa statisticamente significativa tra specie e batteri ($r= -0.379$, $p=0.012$) e la moderata correlazione positiva statisticamente significativa tra specie e parassiti ($r=0.453$, $p=0.002$) le stenelle striate sembrerebbero essere soggette ad un minor numero di batteri ma, al contrario, mostrerebbero una marcata presenza di parassiti i quali potrebbero favorire l'insorgenza di malattie infettive come già precedentemente dimostrato da (Guardo et al., 2010).

- Gli individui con un miglior stato nutrizionale sono anche i meno soggetti a Brucella e parassitosi: infatti, emerge una leggera correlazione negativa statisticamente significativa tra Brucella, parassiti e stato nutrizionale ($r=-0.310$, $p=0.043$ e $r=-0.357$, $p=0.019$, rispettivamente).

Il motivo di tale correlazione potrebbe essere dato dal fatto che un buon stato nutrizionale è indicatore di un buono stato di salute, il quale rende gli esemplari meno vulnerabili e suscettibili a questa infezione. Inoltre, la maggior parte dei casi studio presenti in letteratura sottolinea come gli individui affetti da Brucella mostrino principalmente uno scarso stato nutrizionale (Garofolo et al., 2020).

- All'aumentare dello stato nutrizionale aumenta l'infezione da Toxoplasma vista la bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra stato nutrizionale e Toxoplasma ($r=0.328$, $p=0.032$), questo sottolinea come all'aumentare dello stato nutrizionale degli individui aumenti anche l'infezione da parte di Toxoplasma. Associando lo stato nutrizionale al quantitativo di grasso in possesso degli esemplari, è stato riportato da Williams et al. nel 2020 come la condizione nutrizionale fosse il più grande predittore di morte a causa di malattie infettive per cui non è da escludere che questo fenomeno si riscontri anche nei cetacei odontoceti.

- Una bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra DMV e Brucella ($r=0.368$, $p=0.015$) suggerisce che in questi esemplari spiaggiati l'infezione da DMV aumenta all'aumentare di Brucella e viceversa; casi di esemplari spiaggiati positivi ad entrambi gli agenti eziologici sono già stati descritti precedentemente da Garofalo et al. nel 2020.
- Una moderata correlazione positiva statisticamente significativa tra DMV, Brucella e presenza di parassiti ($r=0.412$, $p=0.006$ e $r=0.451$, $p=0.002$, rispettivamente) sottolinea che sia la brucellosi che il DMV aumentano all'aumentare della parassitosi e viceversa come precedentemente riportato da Díaz-Delgado et al. nel 2019 per individui spiaggiatisi in mediterraneo occidentale.
- I tursiopi possiedono uno stato di nutrizione migliore rispetto alle stenelle striate a spiegazione della moderata correlazione negativa statisticamente significativa ($r=-0.411$, $p=0.006$) tra stato nutrizionale e specie; infatti, nella specie *T. truncatus* sono presenti anche le classi d'età "lattante" e "sub adulto" alle quali potrebbero appartenere esemplari che non hanno ancora attraversato il periodo di svezzamento e quindi fanno parte del gruppo di nascita in cui vengono allattati e sottoposti a cure parentali mentre nella specie *S. coeruleoalba*

predominano gli adulti che, oltre ad essere i più affetti da EIDs, batteri e parassiti, potrebbero anche trovarsi ostacolati nella ricerca della preda (overfishing) come già sottolineato da Gómez-Campos et al., 2011(fig. 25A,B).

- Distinguendo i sessi, la moderata correlazione negativa statisticamente significativa tra stato nutrizionale e sesso ($r=-0.405$, $p=0.007$), mostra come i maschi di entrambe le specie sembrerebbero avere uno stato nutrizionale migliore rispetto alle femmine, molto probabilmente in relazione al fatto che le femmine impiegano molte riserve energetiche, per un lungo periodo di tempo, nell'allattamento e crescita dei nascituri(Miller, 2007). (Fig. 39).

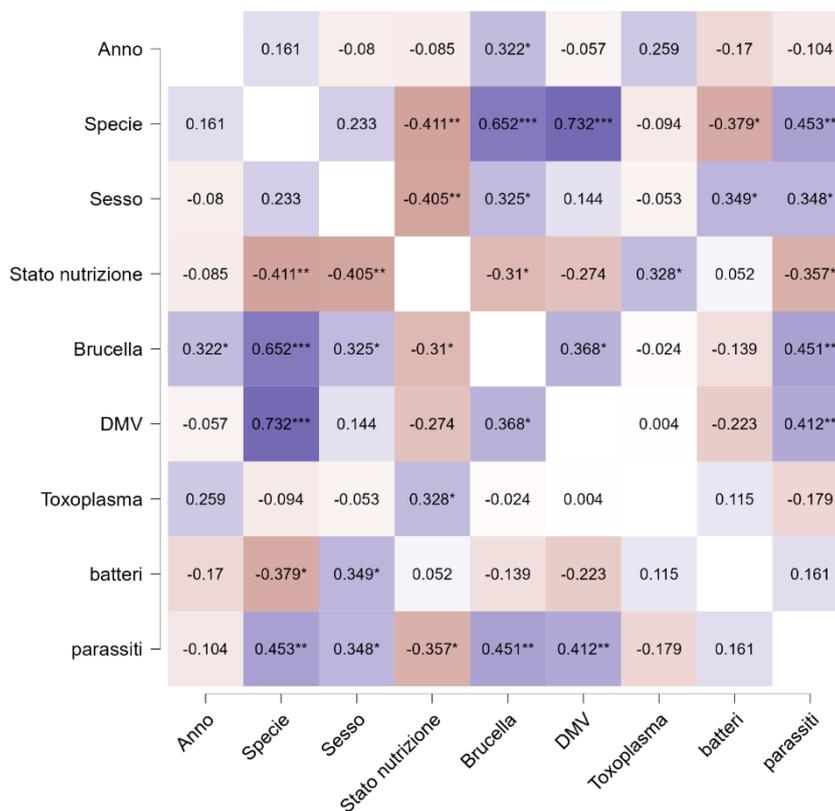


Figura 39: Pearson's heatmap, valori del dataset 1 sul trend degli spiaggiamenti di *Tursiops truncatus* e *Stenella coeruleoalba* in relazione alle malattie infettive emergenti, batteri e parassiti. **Anno:** anni in cui si sono registrati gli spiaggiamenti; **Specie:** *Tursiops truncatus* o *Stenella coeruleoalba*; **Sesso:** maschio o femmina; **Stato nutrizione:** scarso, discreto, buono, ottimo; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV:** dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 1, specifico per il l'analisi macroscopica degli spiaggiamenti di *Tursiops truncatus*, emerge (fig.40A):

- Il *Toxoplasma*, parassita che colpisce maggiormente la specie *T. truncatus*, con il passare degli anni è aumentato in frequenza come dimostrato dalla correlazione positiva statisticamente significativa tra anni dello spiaggiamento e *Toxoplasma* ($r=0.363$, $p=0.038$): questo risultato potrebbe essere correlato alle caratteristiche ecologiche e biologiche della specie (ecotipo prevalentemente costiero), alla sua dominanza in termini numerici nel medio-alto Mar Adriatico e ad un maggior input di acque reflue e scarichi fognari lungo costa proveniente dalla terraferma che potrebbe aver veicolato le oocisti del parassita in mare come è già stato precedentemente riportato da Dubey et al. nel 2005.
- gli esemplari che mostrano presenza di batteri spesso sono soggetti anche all'attacco da parte di parassiti poiché vi è una bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra batteri e parassiti ($r=0.362$, $p=0.038$). Casi di co-infezioni batteriche e parassitarie in associazione a toxoplasmosi per *T. truncatus* sono già stati descritti nel Mar Mediterraneo Orientale da (Bigal et al., 2018)

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 1, specifico per l'analisi macroscopica degli spiaggiamenti di *Stenella coeruleoalba*, emerge (fig.40B):

- Un'elevata correlazione positiva statisticamente significativa tra toxoplasma e batteri ($r=1.000$, $p=<.001$), per cui la Toxoplasmosi è agevolata in presenza di batteri e viceversa. Infatti, questa co-infezione è già stata dimostrata precedentemente in esemplari di stenella striata nel Mar Ligure da (Giorda et al., 2021). Inoltre, (Angelucci et al., 2022) hanno riportato nei loro studi la co-presenza dell'agente patogeno Toxoplasma ed il batterio *Clostridium perfringens* in esemplari di stenella striata spiaggiati lungo le coste italiane.
- Inoltre, anche se in maniera non statisticamente significativa emerge che negli ultimi anni il DMV abbia infettato in misura minore gli esemplari di stenella striata come suggerito dalla correlazione negativa tra DMV e anni di spiaggiamento ($r=-0.612$, $p=0.060$). La non significatività statistica è in linea anche con questo presente in letteratura: infatti, negli ultimi anni sono stati riportati casi di nuove epidemie di stenelle striate in Mediterraneo da Pautasso et al., 2019 assieme alla circolazione di un nuovo ceppo di DMV come riportato da Mira et al., 2019.

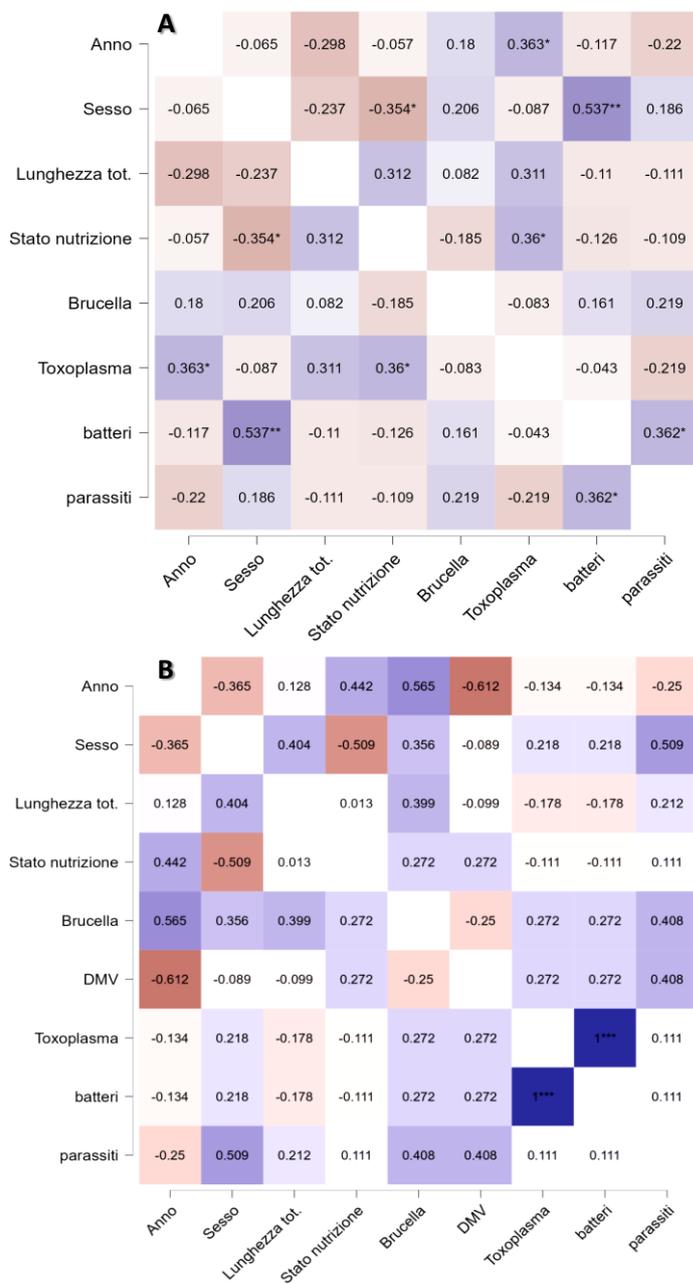


Figura 40: Pearson's heatmaps, valori del dataset 1. **(A)** trend degli spiaggiamenti di *Tursiops truncatus* in relazione alle malattie infettive emergenti, batteri e parassiti. **(B)** trend degli spiaggiamenti di *Stenella coeruleoalba* in relazione alle malattie infettive emergenti, batteri e parassiti. **Anno:** anni in cui si sono registrati gli spiaggiamenti; **Sesso:** maschio o femmina; **Lunghezza tot:** lunghezza del corpo dell'animale; **Stato nutrizione:** scarso,

discreto, buono, ottimo; **Brucella**: agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV**: dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma**: agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri**: presenza o assenza; **parassiti**: presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 2, specifico per *Stenella coeruleoalba*, non emerge nessuna correlazione statisticamente significativa tra maturità sessuale, agenti patogeni e parametri biometrici.

Tuttavia, sono degne di nota alcune correlazioni negative, anche se non statisticamente significative: una correlazione negativa tra maturità sessuale e DMV ($r=-0.478$, $p=0.193$), Toxoplasma ($r=-0.661$, $p=0.052$) e batteri ($r=-0.661$, $p=0.052$): questo risultato potrebbe sottolineare che gli esemplari immaturi in questa specie siano più vulnerabili alle malattie infettive. Non è stata trovata in letteratura una spiegazione plausibile per queste correlazioni; tuttavia potrebbe essere presa in considerazione la probabile via di trasmissione verticale di questi agenti patogeni. Da studi precedenti condotti sul tursiope emerge, invece, che siano gli individui maturi sessualmente ad essere maggiormente colpiti poiché le loro caratteristiche vitali prevedono che, raggiunta la maturità sessuale, gli individui si discostino dal gruppo stabile di nascita per intraprendere altre attività che facilitano la trasmissione di patogeni tra cui migrazione, alimentazione e riproduzione (Gazda et al., 2005; Rehtanz et al., 2010)(Fig. 41).

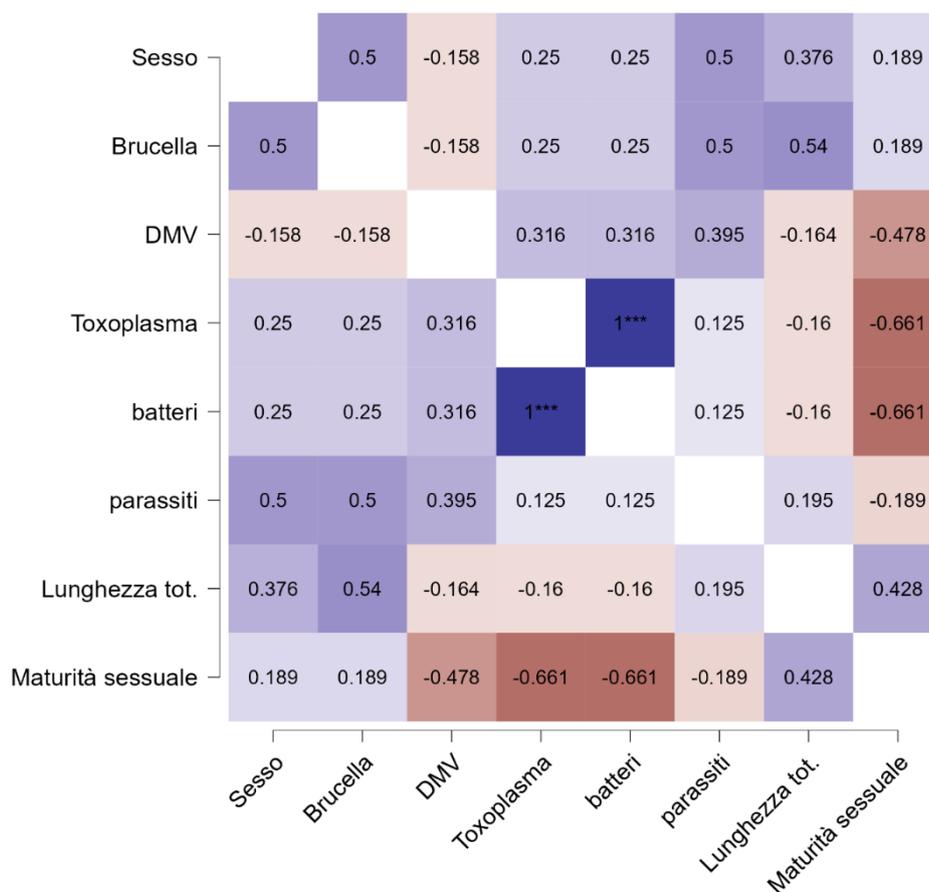


Figura 41: Pearson's heatmap, valori del dataset istologico specifico per *Stenella coeruleoalba*; correlazioni tra maturità sessuale, agenti patogeni e parametri biometrici. **Anno:** anni in cui si sono registrati gli spiaggiamenti; **Sesso:** maschio o femmina; **Stato nutrizione:** scarso, discreto, buono, ottimo; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV:** dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza; **lunghezza tot:** lunghezza del corpo dell'animale; **maturità sessuale:** immaturo o maturo. ***= $p \leq 0.001$.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 2, specifico per *Tursiops truncatus*, emerge un'elevata correlazione positiva statisticamente

significativa tra maturità sessuale e lunghezza totale del corpo ($p=0.607$, $p=0.002$) indicando un raggiungimento della maturità sessuale più frequente in individui con lunghezze del corpo maggiori come già precedentemente affermato da Bearzi et al. nel 2009. (Fig. 42).

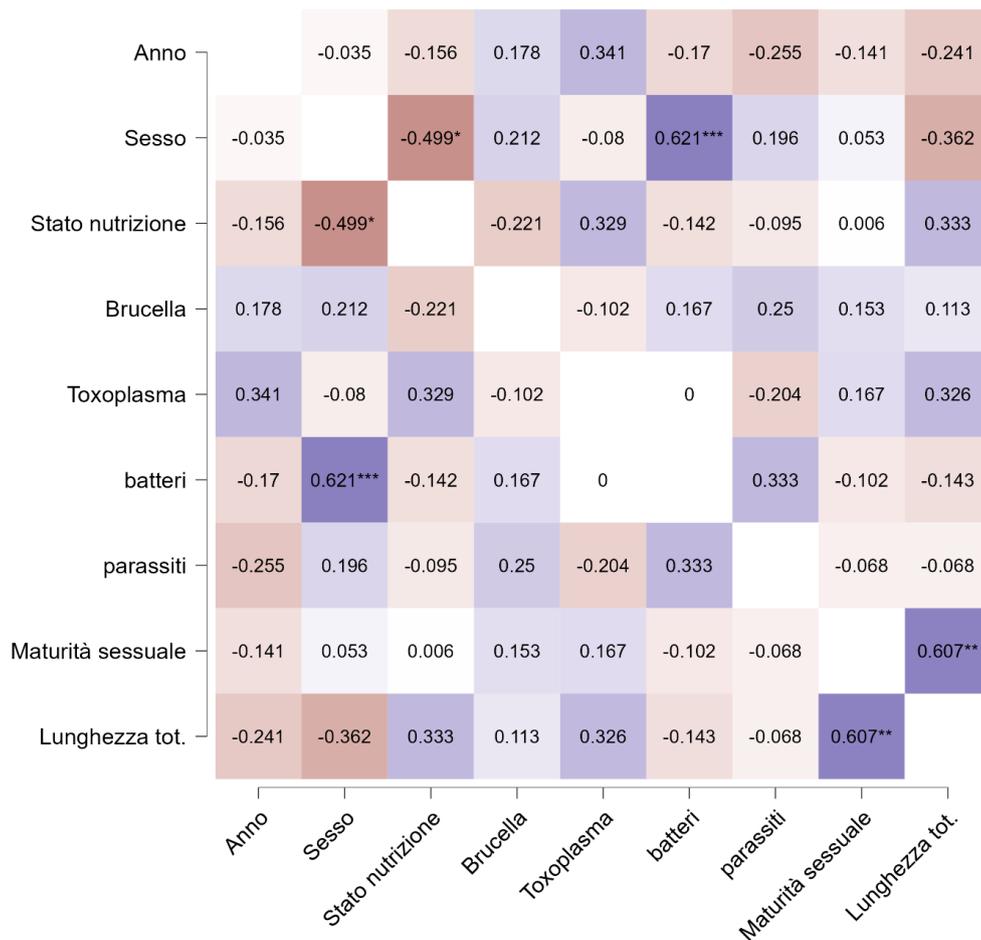


Figura 42: Pearson's heatmap, valori del dataset istologico specifico per *Tursiops truncatus*; correlazioni tra maturità sessuale, agenti patogeni e parametri biometrici. **Anno:** anni in cui si sono registrati gli spiaggiamenti; **sesso:** maschio o femmina; **stato nutrizione:** scarso, discreto, buono, ottimo; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:**

presenza o assenza; **parassiti**: presenza o assenza; **lunghezza tot**: lunghezza del corpo dell'animale; **maturità sessuale**: immaturo o maturo. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$.

Andando a correlare le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello della gonade negli esemplari di stenella striata con gli altri parametri (dataset 2), l'indice di correlazione di Pearson sottolinea:

- Una bassa correlazione negativa statisticamente significativa tra sesso ed embolia gassosa ($r=-0.756$, $p=0.018$); da questo emerge che le femmine siano più soggette ad alla formazione di lesioni cistiche di gas (bolle) nella gonade, le cui cause sono ancora spesso messe in discussione. Sicuramente come fattore predominante nello scatenare questa patologia, in questa specie ed in questo studio, va tenuta in considerazione la presenza di batteri come *C. perfringes*, in quanto batterio produttore di bolle di gas e quindi potrebbe esserne un agente eziologico come già sottolineato da (Danil et al., 2014). Inoltre, altre cause scatenanti la formazione di bolle di gas sono il cambiamento di pressione dei gas intratissutali (barotrauma), la fuoriuscita di gas post-mortem da tessuti e sangue supersaturi e l'assorbimento di gas intestinali (Jepson et al., 2005; Moon et al., 2006). Non emergono altre correlazioni statisticamente significative ma, alcune correlazioni positive degne di nota, anche se non statisticamente significative sono:

- Una correlazione positiva tra vacuolizzazione e il DMV ($r=0.632$, $p=0.068$)
- Una correlazione positiva tra vacuolizzazione e Toxoplasma ($r=0.500$, $p=0.170$)
- Una correlazione positiva tra vacuolizzazione e presenza di batteri ($r=0.500$, $p=0.170$).

Queste tre correlazioni positive potrebbero agevolare la formazione di vacuolizzazione citoplasmatica in presenza di agenti patogeni o viceversa. Non sono state trovate spiegazioni plausibili in letteratura ma sarebbe interessante approfondire questa correlazione per capire meglio quali possano essere le conseguenze nello sviluppo delle cellule germinali.

- Una correlazione positiva tra infiltrazione tissutale di globuli bianchi e parassiti ($r=0.666$, $p=0.050$), quindi l'infiltrazione tissutale di globuli bianchi potrebbe rappresentare una risposta di difesa dall'attacco da parte di parassiti, come già dimostrato in altri studi condotti da Guardo et al., 2007 lungo le coste del Mar Ligure.
- Una correlazione negativa tra embolia gassosa e presenza di parassiti ($r=-0.661$, $p=0.052$), per cui l'embolia gassosa potrebbe diminuire all'aumentare della presenza di parassiti o viceversa. Seppur non statisticamente significativa, questa correlazione non è in accordo con

quanto riportato in letteratura poiché sono noti casi di esemplari spiaggiati di delfini di Risso in possesso sia di patologia da decompressione che presenza di parassiti ma questi due agenti eziologici sembrerebbero non correlare tra di loro come riportato da Fernández et al. nel 2017.

- Una correlazione negativa tra infiltrazione di globuli bianchi nella parete dei vasi sanguigni e maturità sessuale ($r=-0.478$, $p=0.193$) quindi gli esemplari maturi potrebbero mostrare meno infiammazione in corso rispetto agli immaturi sessualmente. Questo risultato potrebbe evidenziare come la vulnerabilità ai fattori di minaccia, come EDIs e contaminanti ambientale in questo caso, sia maggiore per gli individui appartenenti alle classi d'età "lattante e "sub adulto". E' plausibile pensare che, nel caso delle EIDs gli agenti patogeni possano essere trasmessi verticalmente (madre-feto) o acquisiti durante l'allattamento come precedentemente affermato da Guzmán-Verri et al. nel 2012 per brucellosi, da Conrad et al. nel 2005 per la Toxoplasmosi o da van Bresse et al. nel 2014 per il DMV; mentre nel caso dei contaminanti ambientali è ampiamente documentato in letteratura come l'esposizione dipenda anche dall'età dell'animale (Aguilar et al., 1999). Inoltre, anche

in questo caso, il parto e l'allattamento possono contribuire ai pattern di intossicazione come riportato da Boon et al., 1997.

- Una correlazione negativa è riportata tra infiltrazione tissutale di globuli bianchi e necrosi ($r=-0.426$, $p=0.252$)
- Ed una correlazione negativa è presente anche tra vasi sanguigni con infiltrazione di globuli bianchi nella parete e necrosi ($r=-0.395$, $p=0.292$).

(Fig.43)

Queste ultime due correlazioni evidenziano un risultato contrastante con quanto emerge da studi precedenti poiché queste alterazioni istopatologiche spesso sono rilevate entrambe senza correlazione negativa nei soggetti presi in esame, come quanto riportato per la stenella striata affetta da Brucella nei mari italiani (Garofolo et al., 2020).

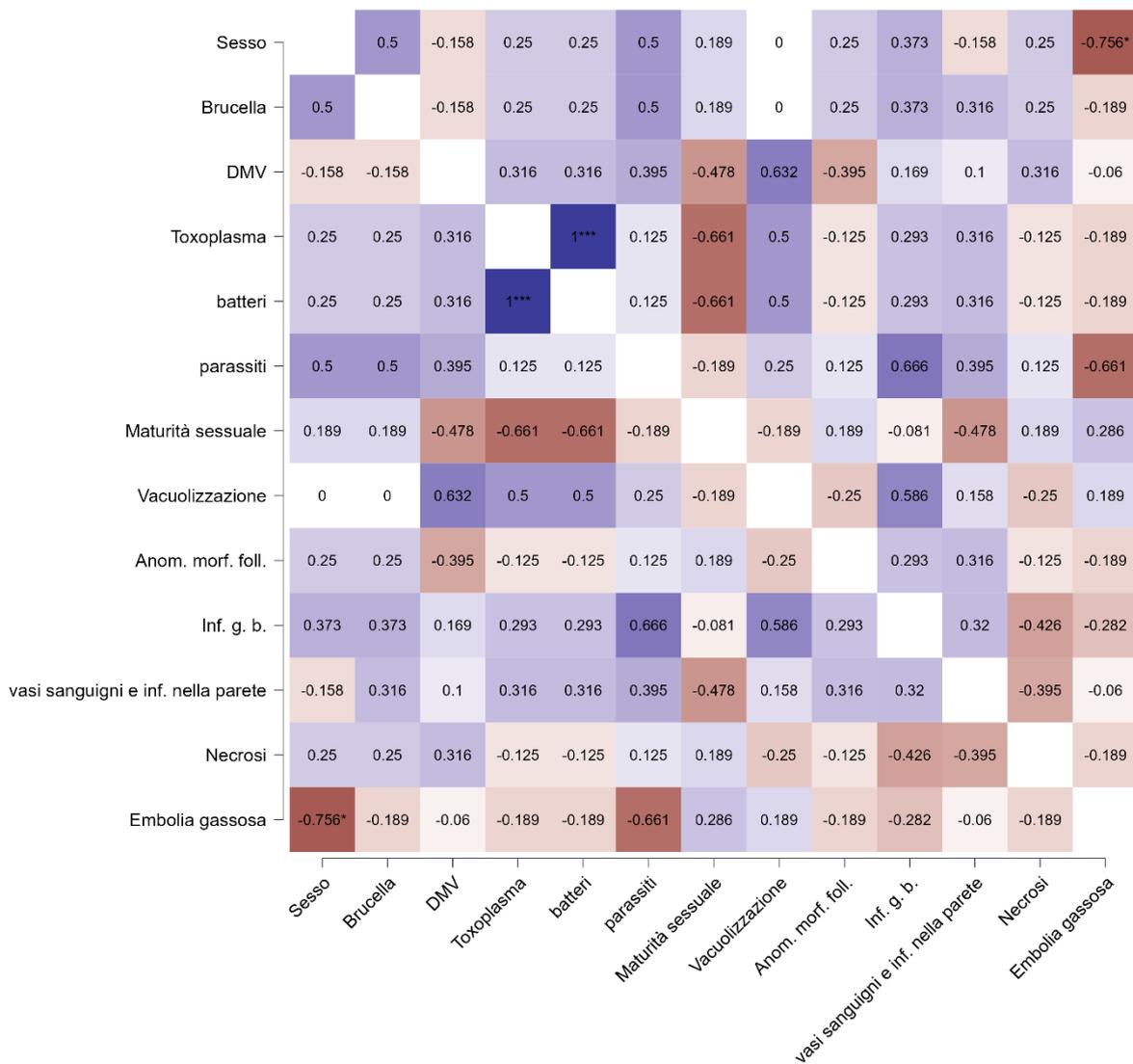


Figura 43: Pearson's heatmap, valori del dataset istologico specifico per *Stenella coeruleoalba*; correlazioni tra alterazioni istopatologiche a livello della gonade, maturità sessuale e agenti patogeni. **Sesso:** maschio o femmina; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV:** dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza; **maturità sessuale:** immaturo o maturo; **vacuolizzazione:** presenza o assenza; **Anom. Morf. Foll:** anomalia morfologia del follicolo,

presenza o assenza; **inf.g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **vasi sanguigni e inf. nella parete:** vasi sanguigni con infiltrati di globuli bianchi nella parete, presenza o assenza; **necrosi:** presenza o assenza; **Embolia gassosa:** presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; ***= $p \leq 0.001$.

Andando a correlare le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello della gonade negli esemplari di tursiope con gli altri parametri (dataset 2), l'indice di correlazione di Pearson sottolinea:

- Una bassa correlazione negativa statisticamente significativa tra vacuolizzazione citoplasmatica e sesso ($r=-0.419$, $p=0.037$) suggerendo che questa alterazione viene maggiormente riscontrata nei testicoli dei maschi piuttosto che nelle ovaie delle femmine come già su riportato da Van Bressem et al. nel 2000.
- Una bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra sesso e necrosi ($r=0.436$, $p=0.029$): le femmine, che risultano essere il sesso più vulnerabile secondo i risultati di questo studio, mostrano anche una presenza maggiore di necrosi a livello della gonade. In generale, è importante sottolineare che anche dalla letteratura emerge come, per la maggior parte degli esemplari spiaggiati e sottoposti a rilevamenti istopatologici mediante opportune analisi ed esami, la necrosi sia riscontrata quasi sempre in percentuali elevate.

- Una moderata correlazione positiva statisticamente significativa tra infiltrazione di globuli bianchi e batteri ($r=0.537$, $p=0.006$) come già stato dimostrato da Bossart et al., 2019 per i tursiopi dell'Atlantico.
- Una elevata correlazione positiva statisticamente significativa tra vasi sanguigni con infiltrazione di globuli bianchi nella parete e batteri ($r=0.621$, $p=<.001$), quindi all'aumentare dell'attacco da parte dei batteri aumenta l'infiltrazione dei globuli bianchi nella parete dei vasi sanguigni come precedentemente dimostrato da Díaz-Delgado et al., 2015 per due specie di stenella e *Tursiops truncatus* in Atlantico.
- Una elevata correlazione positiva statisticamente significativa tra vasi sanguigni con infiltrazione di globuli bianchi nella parete ed infiltrazione tissutale di globuli bianchi ($r=0.772$, $p=<0.001$), quindi queste due alterazioni istopatologiche aumentano l'una all'aumentare dell'altra o viceversa. Questa correlazione è già stata precedentemente dimostrata per esemplari spiaggiati lungo le coste del Mar Ligure appartenenti alla specie *Stenella coeruleoalba* da Di Guardo et al. nel 2011.

- Una bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra batteri e necrosi ($r=0.480$, $p=0.015$) come precedentemente dimostrato da Díaz-Santana et al., 2022 in esemplari di tursiopi atlantici e Mediterranei.
- Una bassa correlazione positiva statisticamente significativa è presente anche tra vasi sanguigni con infiltrati nella parete e necrosi ($r=0.436$, $p=0.029$) come già precedentemente dimostrato da Davison et al., 2013 per un esemplare di delfino comune spiaggiatosi lungo le coste del Regno unito. (Fig. 44)

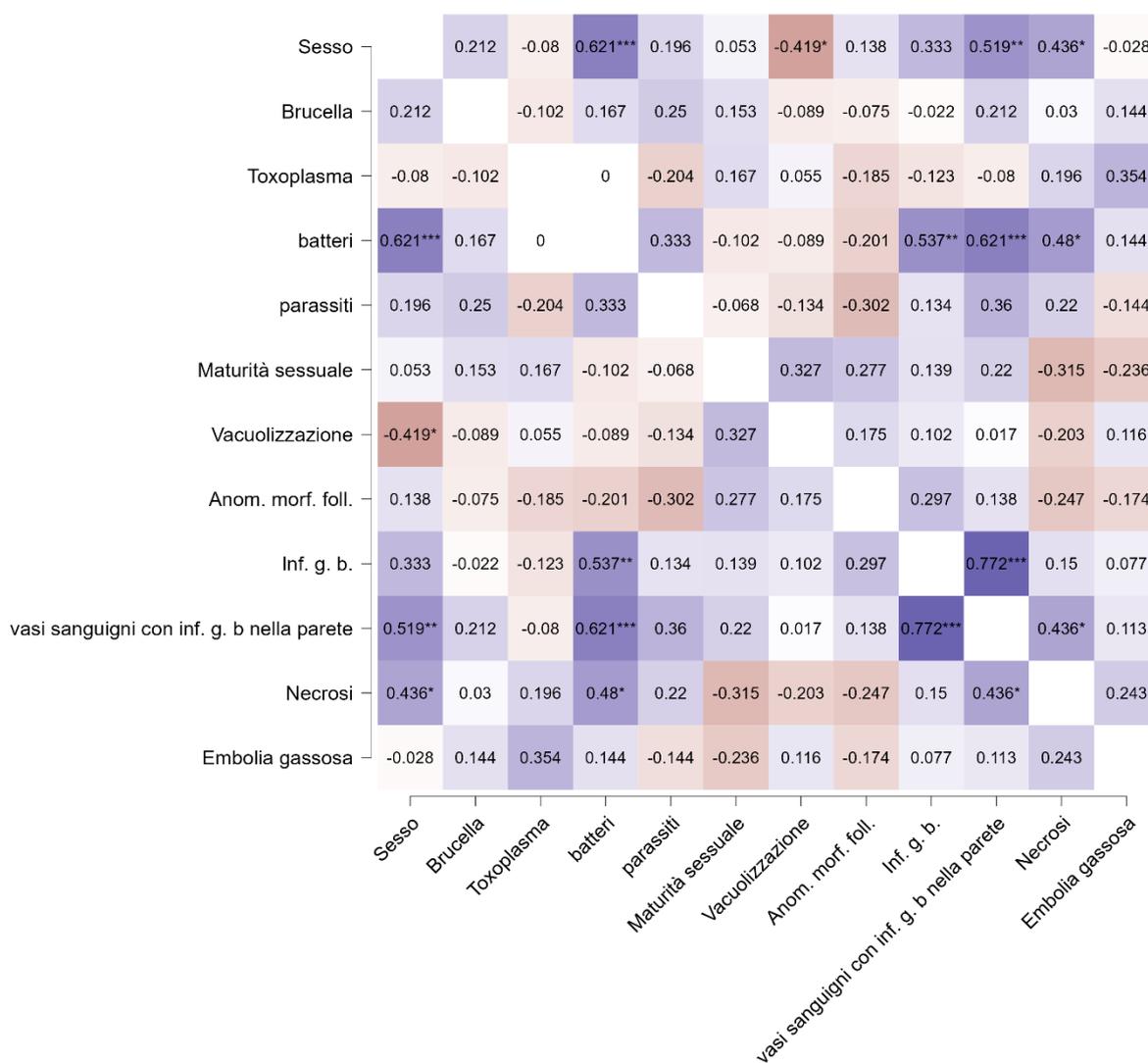


Figura 44: valori del dataset istologico specifico per *Tursiops truncatus*; correlazioni tra alterazioni istopatologiche a livello della gonade, agenti patogeni e maturità sessuale. **Sesso:** maschio o femmina; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza; **maturità sessuale:** immaturo o maturo; **vacuolizzazione:** presenza o assenza; **Anom. Morf. Foll.:** anomalia morfologia del follicolo, presenza o assenza; **inf.g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **vasi**

sanguigni con inf. nella parete: vasi sanguigni con infiltrati di globuli bianchi nella parete, presenza o assenza; **necrosi:** presenza o assenza; **Embolia gassosa:** presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$.

Andando a correlare le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello del fegato negli esemplari di stenella striata con gli altri parametri, l'indice di correlazione di Pearson non sottolinea nessuna correlazione statisticamente significativa.

Tuttavia, sono degne di nota alcune correlazioni negative, anche se non statisticamente significative: Una correlazione negativa tra infiltrazione di globuli bianchi, ispessimento della parete dei vasi sanguigni con infiltrazione associata e *Toxoplasma* ($r=-0.661$, $p=0.052$ e $r=-0.500$, $p=0.170$, rispettivamente) suggerendo che all'aumentare dell'infezione da parte di *Toxoplasma* potrebbe diminuire l'infiltrazione di globuli bianchi e l'ispessimento della parete dei vasi sanguigni con infiltrazione associata o viceversa. A queste correlazioni non è stato possibile trovare una spiegazione plausibile in letteratura. Inoltre, è già stato sottolineato da come in diverse specie di cetacei odontoceti, tra cui la stenella striata e il tursiope, affetti da Costa-Silva et al., 2019 toxoplasmosi siano rilevanti i cambiamenti istologici in veste di focolai necro-infiammatori multiorgano, fegato compreso. (Fig. 45)

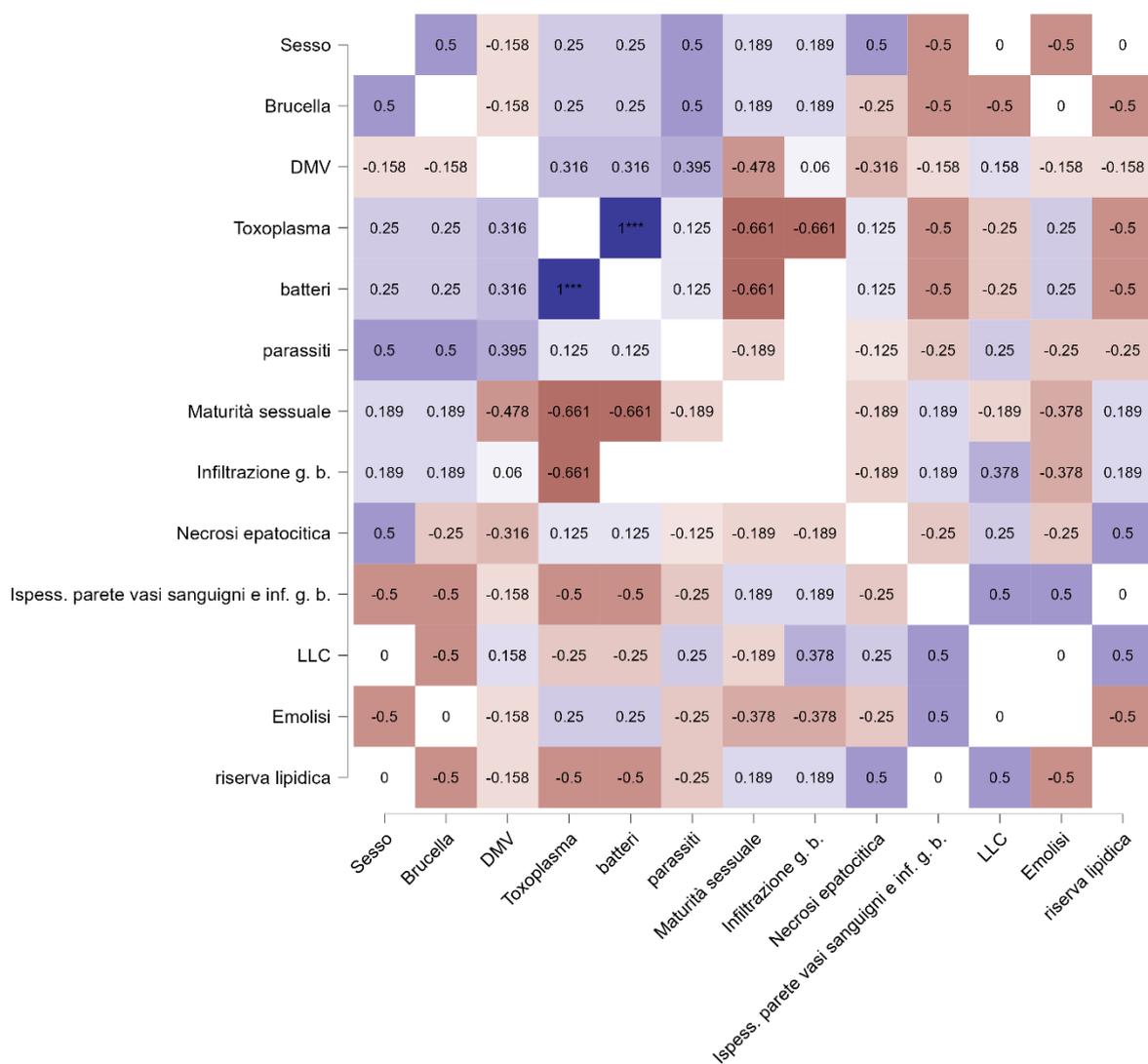


Figura 45: Pearson's heatmap, valori del dataset istologico specifico per *Stenella coeruleoalba*; correlazioni alterazioni istopatologiche a livello fegato, agenti patogeni e maturità sessuale. **Sesso:** maschio o femmina; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV:** dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza; **maturità sessuale:** immaturo o maturo; **infiltrazione g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **necrosi epatica:** presenza o assenza;

ispess. parete vasi sanguigni e inf.g.b.: ispessimento della parete dei vasi sanguigni con associata infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **LLC:** “liver lesion cystic”, lesioni cistiche epatiche, presenza o assenza; **emolisi:** presenza o assenza; **riserva lipica:** grasso, presenza o assenza. ***= $p \leq 0.001$.

Andando a correlare le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello del fegato negli esemplari di tursiope con gli altri parametri, l'indice di correlazione di Pearson sottolinea:

- Una moderata correlazione negativa statisticamente significativa tra Brucella ed emolisi ($r=-0.553$, $p=0.004$), quindi nei tursiopi l'emolisi non è un biomarker di risposta specifico per la brucellosi; infatti, in nessun altro studio precedente condotto su esemplari di tursiope colpiti da brucellosi nel Mar Adriatico è stata riscontrata questa alterazione istopatologica nel fegato (Cvetnić et al., 2016)
- Una moderata correlazione positiva statisticamente significativa emerge tra infiltrazione tissutale di globuli bianchi ed ispessimento della parete dei vasi sanguigni con infiltrazione associata ($r=0.533$, $p=0.006$), quindi spesso sono due alterazioni istopatologiche riscontrabili contemporaneamente e che aumentano l'una all'aumentare dell'altra come precedentemente riportato da Guzmán-Verri et al., 2012b.
- una bassa correlazione positiva statisticamente significativa tra emolisi e riserva lipidica ($r=0.402$, $p=0.046$), quindi all'aumentare dell'emolisi

può aumentare anche il quantitativo di deposito lipidico nel fegato. È un dato che non è mai stato riscontrato in nessun'altra pubblicazione per cui potrebbe essere interessante approfondirne i motivi di questa correlazione.

Altre correlazioni non statisticamente significative, ma degne di nota, sono:

- una correlazione positiva tra infiltrazione di globuli bianchi, ispessimento della parete dei vasi con infiltrazione associata, necrosi e maturità sessuale ($r=0.338$, $p=0.099$; $r=0.342$, $p=0.094$; $r=0.393$, $p=0.052$, rispettivamente) per cui sembrerebbe che gli esemplari adulti di tursiope mostrino più di frequente queste alterazioni istopatologiche. Un'ipotesi potrebbe essere fatta in merito alla loro biologia ed ecologia: essi occupano acque neritiche in cui l'impatto antropico è predominante impattando maggiormente sulle popolazioni selvatiche che vi abitano e facilitando la trasmissione e diffusione delle malattie tra la stessa specie o specie differenti. Infatti, vengono spesso compromesse le fonti di cibo di cui sono soliti nutrirsi i cetacei, inoltre può essere favorito il raggruppamento di specie differenti in aree ristrette dove c'è maggiore disponibilità di cibo aumentando esponenzialmente la competizione che porta per alcuni animali a uno stato di denutrizione con conseguente aumento della vulnerabilità. (Guzmán-Verri *et al.*, 2012).

- Una correlazione positiva tra necrosi epatica, emolisi e grasso ($r=0.321$, $p=0.118$; $r=0.281$, $p=0.174$, rispettivamente) ed una correlazione positiva tra embolia gassosa e grasso ($r=0.281$, $p=0.174$). (fig. 45)

Sembrerebbe che la percentuale lipidica correli positivamente con le alterazioni istopatologiche trovate a livello del fegato negli esemplari di tursiope come se ci fosse un'associazione che potrebbe essere spiegata dalla steatosi. Esempari di tursiope affetti da steatosi sono già stati analizzati e studiati negli anni passati. Ad oggi in letteratura è stata riportata solamente l'associazione tra steatosi e necrosi epatica (Gomer et al., 2000) (Fig. 46)

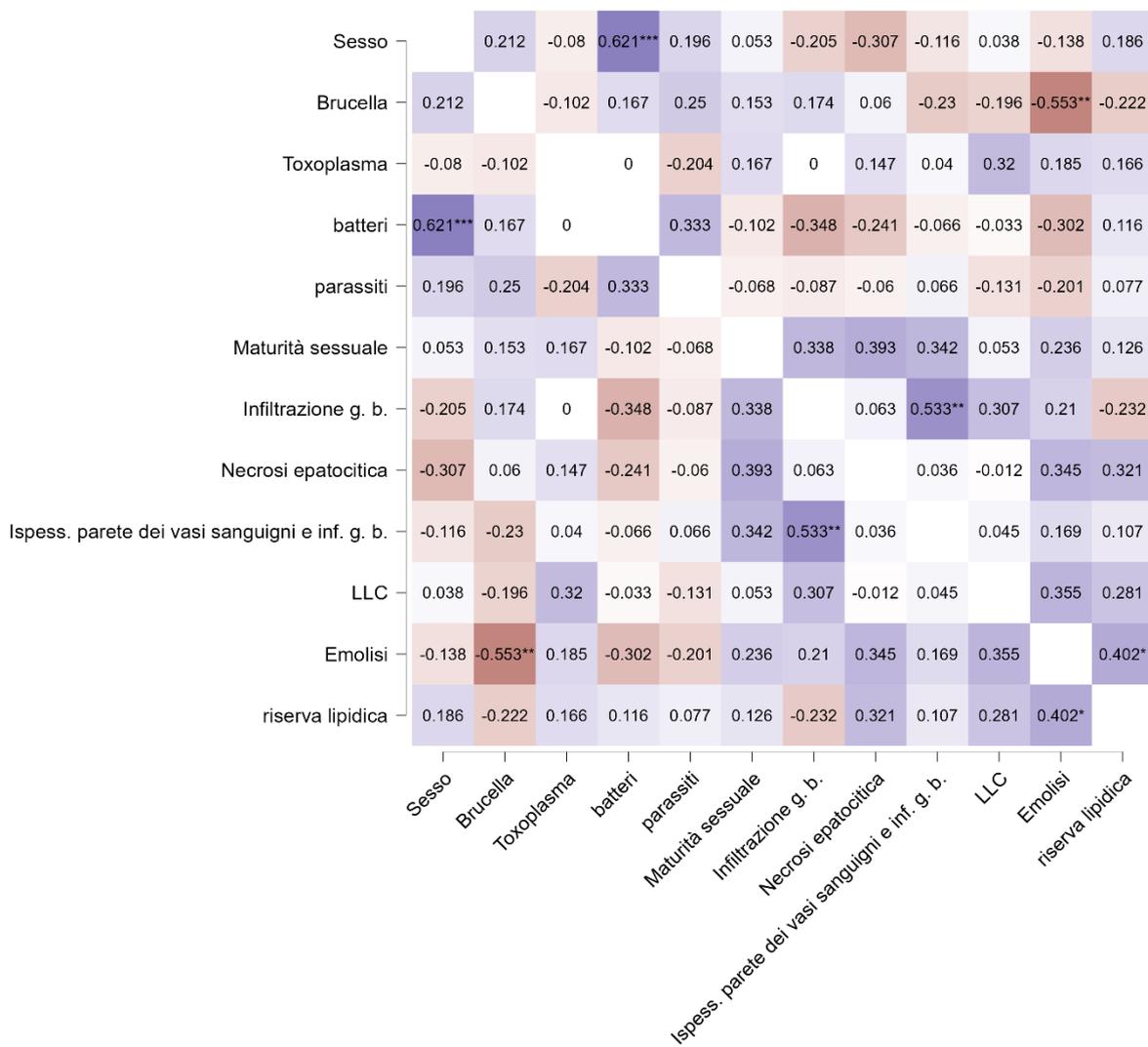


Figura 46: Pearson's heatmap, valori del dataset istologico specifico per *Tursiops truncatus*; correlazioni tra agenti patogeni e alterazioni istopatologiche a livello del fegato. **Sesso:** maschio o femmina; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o assenza; **maturità sessuale:** immaturo o maturo; **infiltrazione g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **necrosi epatica:** presenza o assenza; **ispezz. parete vasi sanguigni e inf.g.b.:** ispessimento della parete dei

vasi sanguigni con associata infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **LLC**: “liver lesion cystic”, lesioni cistiche epatiche, presenza o assenza; **emolisi**: presenza o assenza; **riserva lipica**: grasso, presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$; ***= $p \leq 0.001$.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 3, specifico per *S. coeruleoalba*, non emerge nessuna correlazione statisticamente significativa.

Tuttavia, osservando i fattori limitanti quali MT e il CYP1A1, tra le correlazioni statisticamente non significative degne di nota emerge:

- una correlazione negativa tra MT, anni di spiaggiamento e sesso ($r = -0.542$, $p = 0.266$; $r = -0.447$, $p = 0.347$, rispettivamente) quindi recentemente questi esemplari sarebbero meno soggetti all'inquinamento da metalli pesanti ed in particolare, le femmine sarebbero meno vulnerabili.
- Una correlazione positiva è presente tra il DMV e MT ($r = 0.632$, $p = 0.178$): il virus ed i metalli pesanti, in questo caso, potrebbero agire sinergicamente impattando sulla sopravvivenza delle popolazioni selvatiche. Ad oggi ancora non è riportato con esattezza se l'esposizione cronica a metalli pesanti contribuisca a modulare l'attività patogena e patogenetica principalmente mostrata dai morbillivirus dei mammiferi marini (Lauriano et al., 2014b). Di conseguenza, questo potrebbe essere

un ottimo campanello d'allarme per approfondire le ricerche e gli studi a riguardo (Fig. 47).

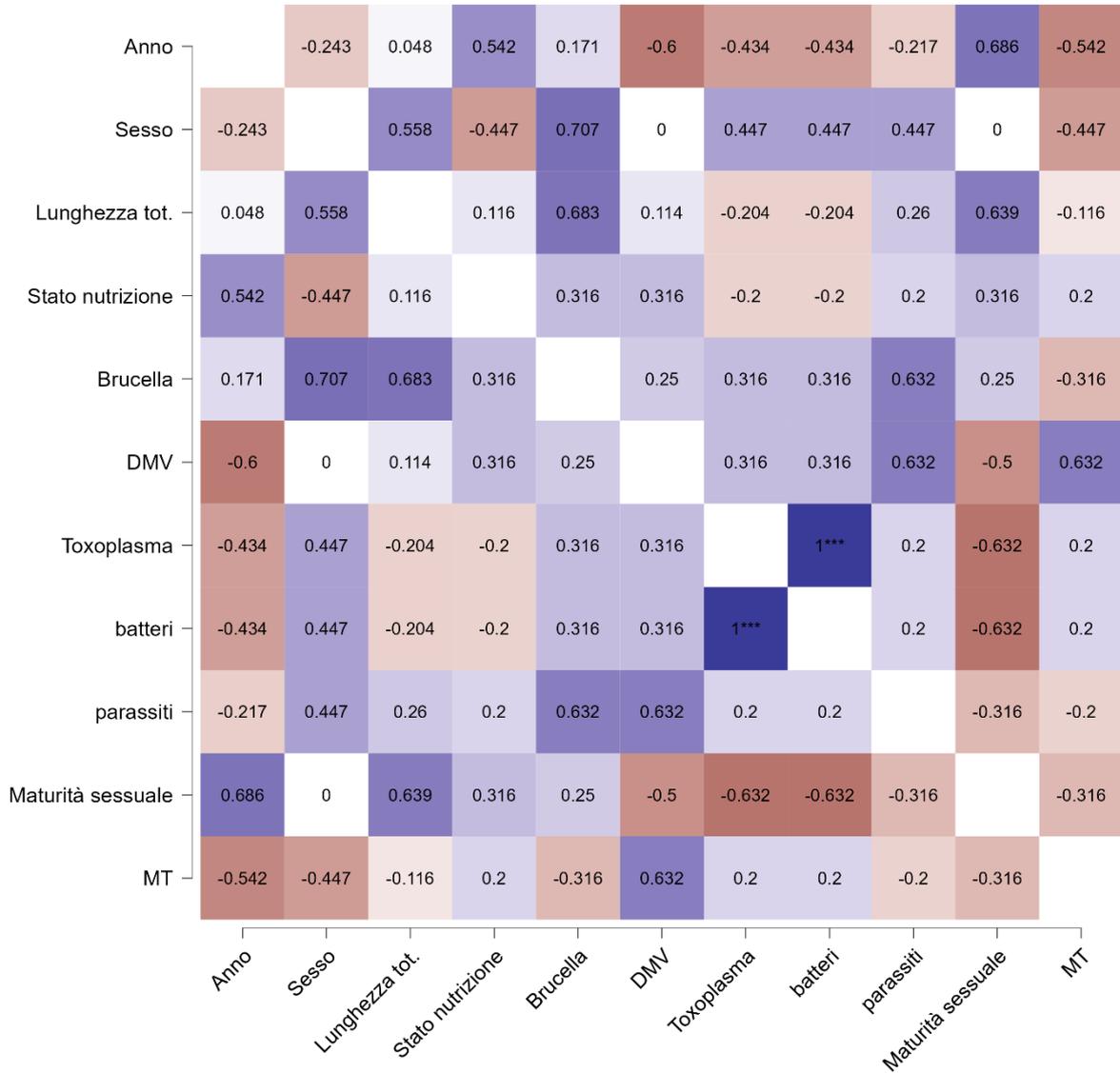


Figura 47: Pearson's heatmap, valori del dataset immunostochimico specifico per *Stenella coeruleoalba*. Correlazione tra biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali, parametri biometrici, maturità sessuale e agenti patogeni. **Anno:** anni in cui si sono registrati

gli spiaggiamenti; **sexo**: maschio o femmina; **lunghezza tot.**: lunghezza del corpo dell'animale; **stato nutrizione**: scarso, discreto, buono, ottimo; **Brucella**: agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **DMV**: dolphin morbillivirus, positivo o negativo; **Toxoplasma**: agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri**: presenza o assenza; **parassiti**: presenza o assenza; **maturità sessuale**: immaturo o maturo; **MT**: metallotioneina, presenza o assenza; **CYP1A1**: citocromo- P450, NaN la varianza è uguale a 0. ***= $p \leq 0.001$.

In questo caso l'espressione del CYP1A1 è presente in tutti gli esemplari (la varianza è uguale a 0) quindi non viene considerato nell'indice di correlazione lineare di Pearson. Nonostante non sia stato inserito nell'analisi di correlazione questo risultato denota che tutti gli animali esaminati sono stati contaminati da POPs e inquinanti simili.

Applicando l'indice di correlazione di Pearson al dataset 3, specifico per *T. truncatus* emerge una moderata correlazione statisticamente significativa tra anno di spiaggiamento e parassitosi ($r=-0.874$, $p=0.005$), suggerendo una presenza inferiore di parassiti negli individui spiaggiati più recentemente.

Non emergono altre correlazioni statisticamente significative ma, osservando i fattori limitanti quali MT e il CYP1A1, tra le correlazioni statisticamente non significative degne di nota emerge:

- Una correlazione positiva tra la lunghezza totale del corpo e CYP1A1($r=0.688$, $p=0.059$); quindi, probabilmente, gli adulti di tursiope

potrebbero essere maggiormente esposti agli inquinanti organici persistenti. Il livello d'esposizione ai contaminanti può variare da individuo a individuo ed in relazione anche all'età ed al sesso che ne guidano le differenze individuali come riportato da Aguilar et al., 1999; in particolare, è stato effettuato uno studio sulla popolazione di tursiopi residenti a Sarasota bay (Florida) che sottolinea come i coefficienti di ripartizione grasso/latte specifici del congenere abbiano indicato che i POPs a basso contenuto di alogenati sono stati allocati nel latte e le modifiche nei profili di contaminanti delle femmine adulte sono probabilmente il risultato del trasporto di questi composti durante il primo evento riproduttivo e del loro graduale riaccumulo successivo (Yordy et al., 2010).

- correlazione negativa tra stato di nutrizione e MT ($r=-0.571$, $p=0.139$) che potrebbe sottolineare come gli individui ben nutriti siano meno suscettibili all'inquinamento da metalli pesanti. E' noto che l'accumulo dei metalli pesanti possa essere correlato con una serie di parametri quali l'età, il sesso, la specie e la variabilità dei livelli di metalli in traccia tra le specie di cetacei e gli habitat marini è dovuta alle fonti di cibo, allo stato fisiologico dell'individuo (Shoham-Frider et al., 2003). (Fig. 48).

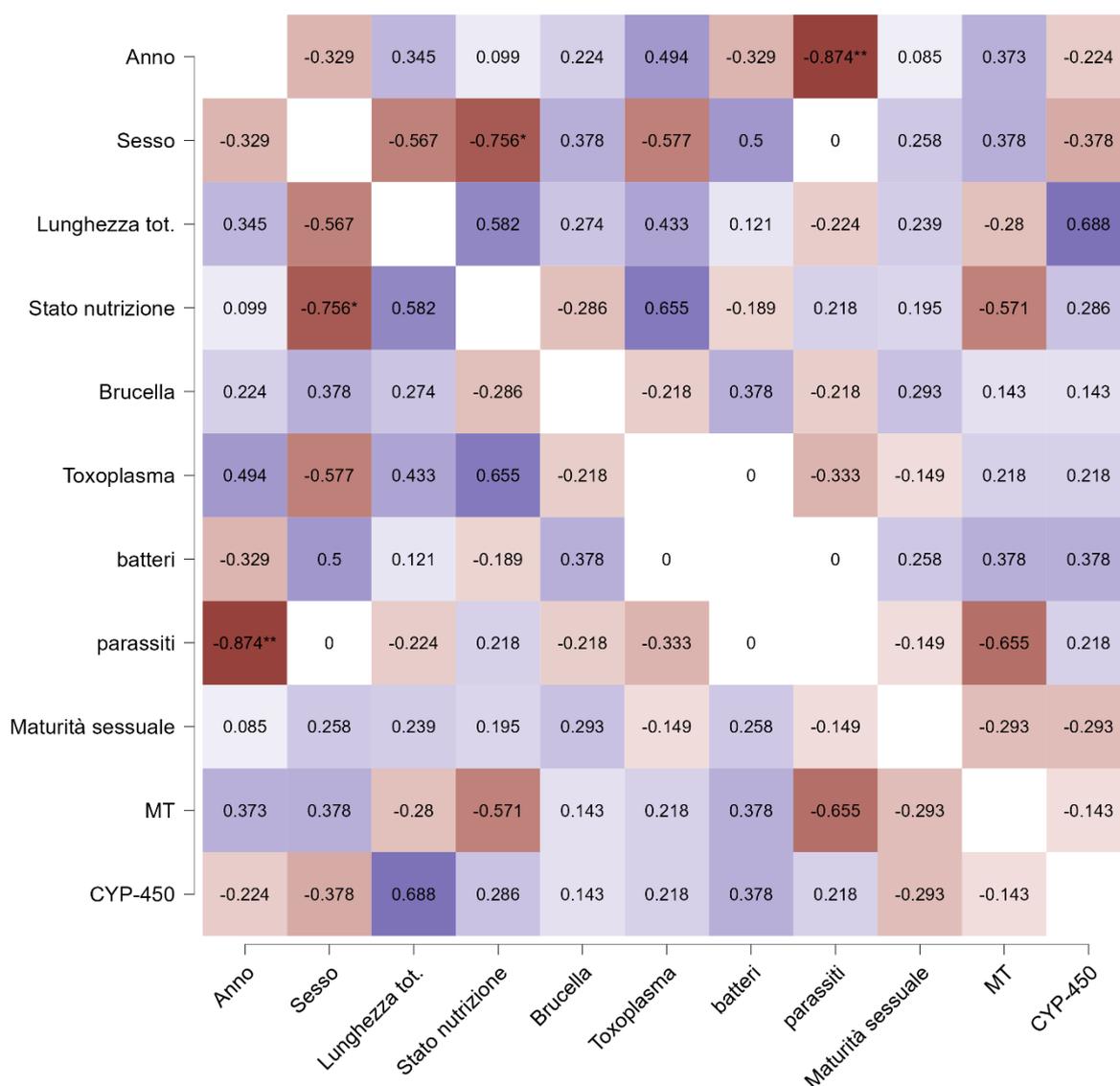


Figura 48: Pearson's heatmap, valori del dataset immunoistochimico specifico per *Tursiops truncatus*. Correlazione tra biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali, maturità sessuale ed agenti patogeni e parametri biometrici. **Anno:** anni in cui si sono registrati gli spiaggiamenti; **sesso:** maschio o femmina; **lunghezza tot.:** lunghezza del corpo dell'animale; **stato nutrizione:** scarso, discreto, buono, ottimo; **Brucella:** agente patogeno della brucellosi, positivo o negativo; **Toxoplasma:** agente patogeno parassita della toxoplasmosi, positivo o negativo; **batteri:** presenza o assenza; **parassiti:** presenza o

assenza; **maturità sessuale:** immaturo o maturo; **MT:** metallotioneina, presenza o assenza; **CYP1A1:** citocromo- P450, presenza o assenza. *= $p \leq 0.05$; **= $p \leq 0.01$.

Andando a correlare i biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali con le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello della gonade negli esemplari di stenella striata, l'indice di correlazione di Pearson non sottolinea nessuna correlazione statisticamente significativa. (Fig. 49)

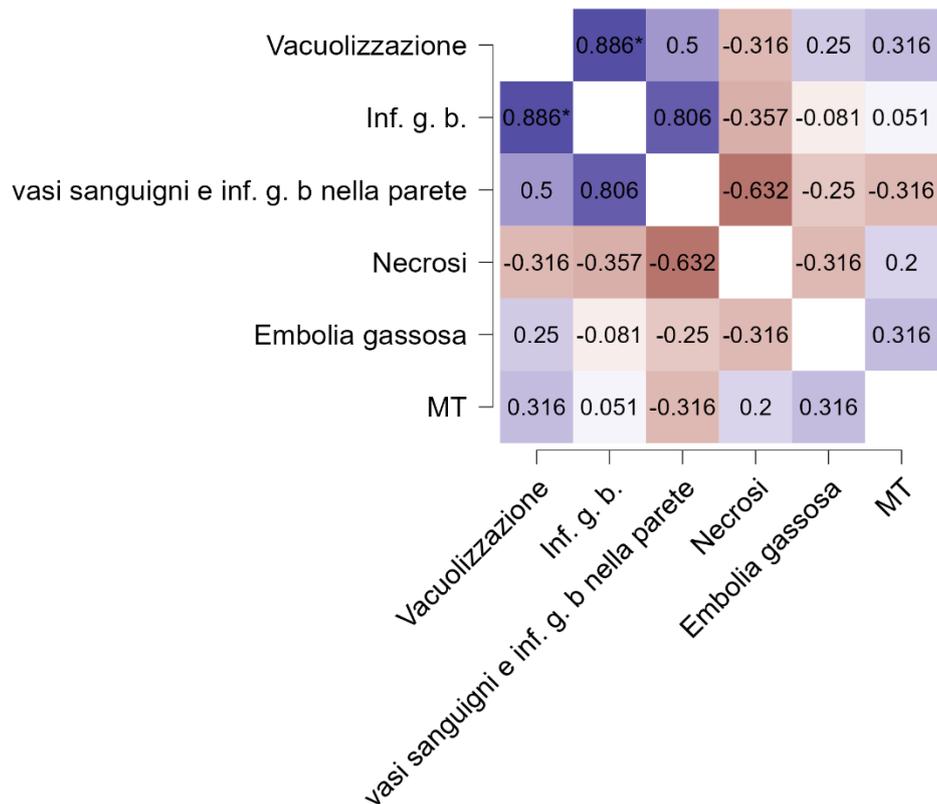


Figura 49: Pearson's heatmap, valori del dataset immunohistochemico specifico per *Stenella coeruleoalba*. Correlazioni tra biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali ed alterazioni istopatologiche a livello della gonade. **vacuolizzazione:** presenza o assenza;

inf.g.b.: infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **vasi sanguigni e inf. nella parete:** vasi sanguigni con infiltrati di globuli bianchi nella parete, presenza o assenza; **necrosi:** presenza o assenza; **embolia gassosa:** presenza o assenza. **MT:** metallotioneina, presenza o assenza; **CYP1A1:** citocromo- P450, NaN la varianza è uguale a 0. *= $p \leq 0.05$. In questo caso l'espressione del CYP1A1 è presente in tutti gli esemplari, quindi non viene considerato nell'indice di correlazione lineare di Pearson.

Andando a correlare i biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali con le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello della gonade negli esemplari di tursiope, l'indice di correlazione di Pearson sottolinea un'elevata correlazione positiva statisticamente significativa tra MT e necrosi ($r=1.000$, $p<.001$), evidenziando come la contaminazione da metalli pesanti porti all'insorgenza di questo tipo di alterazione come già dimostrato attraverso esperimenti in vitro su questa specie da Pellisso et al., 2008.

Inoltre, in maniera non statisticamente significativa l'MT correla positivamente con vasi sanguigni in possesso di infiltrati di globuli bianchi nella parete ed embolia ($r=0.488$, $p=0.220$; $r=0.552$, $p=0.156$) per cui a livello della gonade sembrerebbe che i metalli pesanti abbiano un effetto avverso maggiore. (fig. 49). Ad oggi, studi volti a valutare le concentrazioni di metalli organo-specifici e specie-specifici sono molti, tuttavia non sono ancora stati effettuati studi microscopici istopatologici mirati a valutare una possibile correlazione tra i

cambiamenti morfologici gonadi e l'effetto avverso di questi contaminanti.

(Fig. 50)

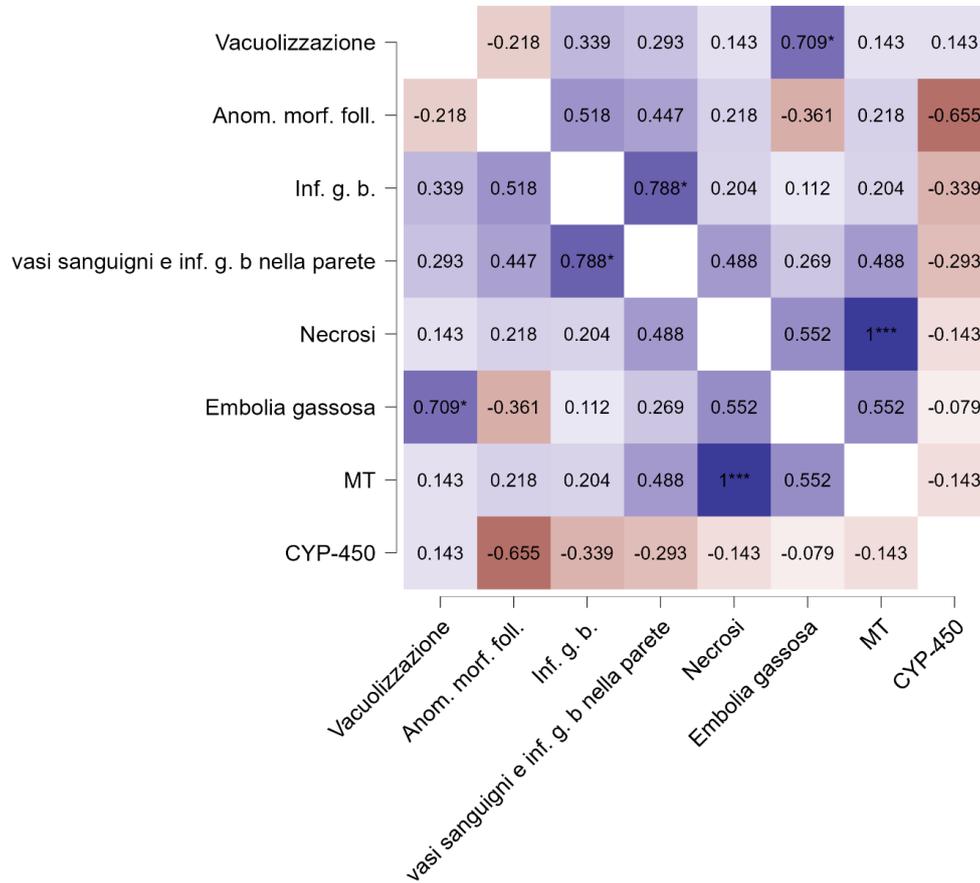


Figura 50: Pearson's heatmap, valori del dataset immunoistochimico specifico per *Tursiops truncatus*. Correlazioni tra biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali ed alterazioni istopatologiche a livello della gonade. **vacuolizzazione:** presenza o assenza; **anom. Morf. Foll:** anomalia morfologia del follicolo, presenza o assenza; **inf.g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **vasi sanguigni e inf. nella parete:** vasi sanguigni con infiltrati di globuli bianchi nella parete, presenza o assenza; **necrosi:** presenza

o assenza; **embolia gassosa**: presenza o assenza. **MT**: metallotioneina, presenza o assenza; **CYP-450**: citocromo- P450, presenza (1) o assenza (0). *= $p \leq 0.05$; ***= $p \leq 0.001$.

Andando a correlare i biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali con le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello del fegato negli esemplari di stenella striata, l'indice di correlazione di Pearson non sottolinea nessuna correlazione statisticamente significativa.

In questo caso l'espressione del CYP1A1 è presente in tutti gli esemplari, quindi non viene considerato nell'indice di correlazione lineare di Pearson.

Osservando il fattori limitante (MT), tra le correlazioni statisticamente non significative degne di nota emerge: una correlazione positiva tra MT, l'ispessimento della parete dei vasi con infiltrazione associata ed emolisi ($r=0.447$, $p=0.347$; $r=0.632$, $p=0.178$, rispettivamente) suggerendo che la contaminazione da metalli pesanti potrebbe portare a questi due tipi di alterazione istopatologica a livello del fegato. Quindi, da questi risultati sembrerebbe che i metalli pesanti abbiano effetti più deleteri sul fegato di *Stenella coeruleoalba*. (Fig.51)

Ad oggi, studi volti a valutare le concentrazioni di metalli organo-specifici e specie-specifici sono molti, tuttavia non sono ancora stati effettuati studi microscopici istopatologici mirati a valutare una possibile correlazione tra i cambiamenti morfologici epatici e l'effetto avverso di questi contaminanti.

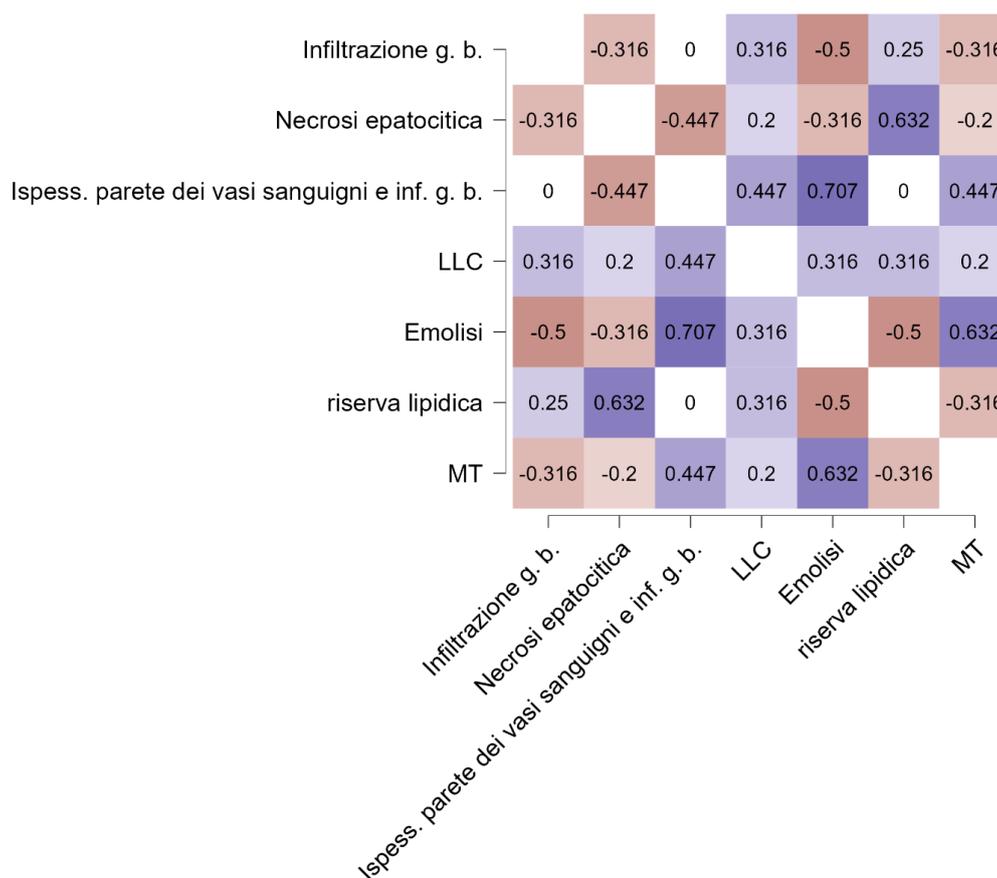


Figura 51: Pearson's heatmap, valori del dataset immunohistochemico specifico per *Stenella coeruleoalba*. Correlazioni tra i biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali e le alterazioni istopatologiche a livello del fegato. **Infiltrazione g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **necrosi epatica:** presenza o assenza; **ispess. parete vasi sanguigni e inf.g.b.:** ispessimento della parete dei vasi sanguigni con associata infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **LLC:** "liver lesion cystic", lesioni cistiche epatiche, presenza o assenza; **emolisi:** presenza o assenza; **riserva lipica:** grasso, presenza o assenza. **MT:** metallotioneina, presenza o assenza.

Andando a correlare i biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali con le alterazioni istopatologiche riscontrate a livello del fegato negli esemplari di tursiope, l'indice di correlazione di Pearson non sottolinea nessuna correlazione statisticamente significativa.

In questo caso, l'infiltrazione tissutale epatica di globuli bianchi è presente in maniera abbondante in tutti gli esemplari, quindi non viene tenuta in considerazione nell'indice di correlazione lineare di Pearson.

Andando ad osservare i fattori limitanti quali MT e il CYP1A1, è presente una correlazione positiva, anche se non statisticamente significativa, tra MT ed embolia gassosa ($r=0.488$, $p=0.220$); tale correlazione è stata riscontrata anche a livello della gonade quindi, probabilmente, conferma l'agevolazione nell'insorgenza di questa patologia con l'esposizione ai metalli pesanti (Fig. 52). Tuttavia, tale correlazione rimane solo un'ipotesi da poter approfondire con ulteriori ricerche poiché, ad oggi, in letteratura non è stato ancora riportato nessun caso studio che sottolinei questa correlazione a cui poter fare riferimento.

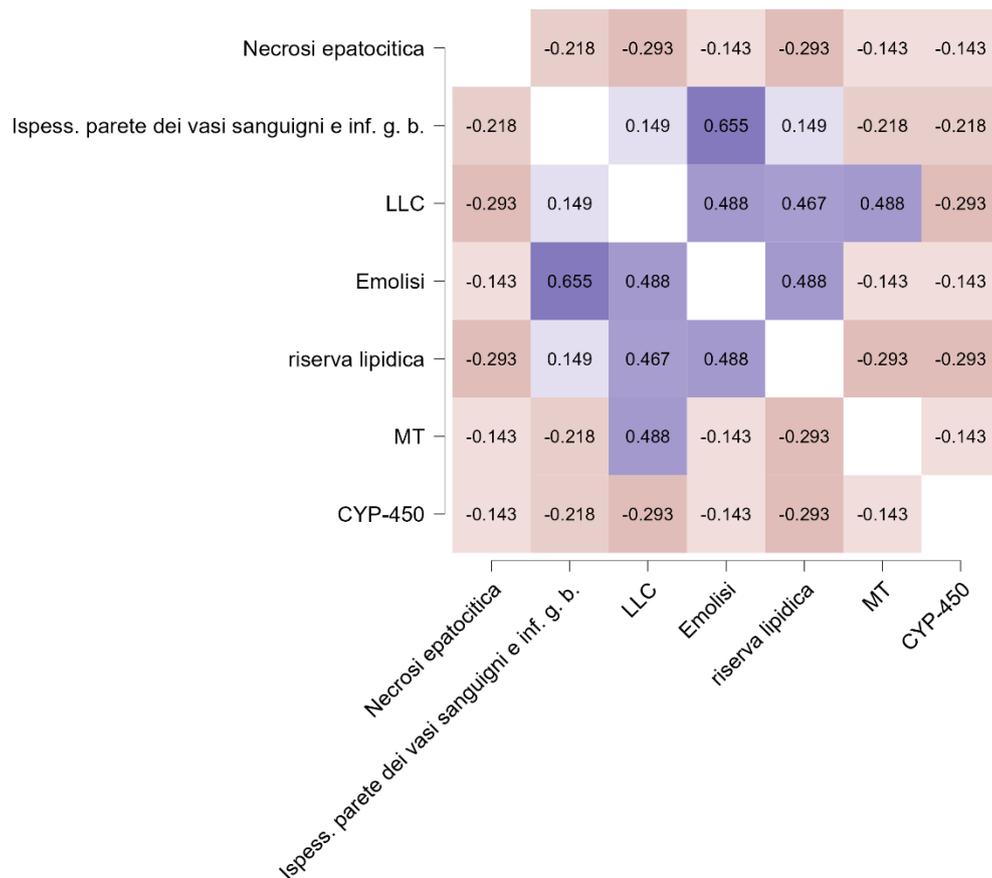


Figura 52: Pearson's heatmap, valori del dataset immunoistochimico specifico per *Tursiops truncatus*. Correlazioni tra biomarkers d'esposizione a contaminanti ambientali ed alterazioni istopatologiche a livello del fegato. **Infiltrazione g.b.:** infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **necrosi epatica:** presenza o assenza; **ispess. parete vasi sanguigni e inf.g.b.:** ispessimento della parete dei vasi sanguigni con associata infiltrazione di globuli bianchi, presenza o assenza; **LLC:** "liver lesion cystic", lesioni cistiche epatiche, presenza o assenza; **emolisi:** presenza o assenza; **riserva lipica:** grasso, presenza o assenza. **MT:** metallotioneina, presenza o assenza; **CYP1A1:** citocromo- P450, presenza o assenza.

5. CONCLUSIONI

Nonostante i cetacei siano molto comuni nei nostri mari, mancano ancora molte informazioni sulla loro biologia, soprattutto dal punto di vista della riproduzione. Il principale limite delle ricerche per gli animali in libertà è dato dall'ambiente naturale in cui essi vivono che rende difficile la cattura, il contenimento in sicurezza dell'animale, la misurazione dei diversi parametri ed il prelievo di campioni da utilizzare per le analisi; inoltre, nel Mediterraneo è proibita la manipolazione di animali in libertà per qualsiasi scopo. Invece, il principale limite delle analisi condotte su animali spiaggiati è il loro cattivo stato di conservazione che rende difficile la diagnosi anatomico-patologica ed il prelievo di campioni significativi. Ad oggi, questo è il primo studio preliminare focalizzato nel tratto di costa italiana, compreso tra l'Abruzzo ed il Molise, che tenta di indagare i possibili effetti delle malattie infettive emergenti sulla capacità riproduttiva di delfini odontoceti spiaggiati appartenenti alle specie *Tursiops truncatus* e *Stenella coeruleoalba*, cercando di evidenziarne indirettamente una possibile correlazione con contaminanti ambientali come gli inquinanti organici persistenti (POPs) ed i metalli pesanti. Queste sostanze inquinanti contribuiscono alla scomparsa dei cetacei dai nostri mari, non solo arrecando danni al singolo individuo che entra in contatto con essi, ma anche alle generazioni future, in quanto la loro

attività di distruttori endocrini diminuisce la capacità di riprodursi degli esemplari esposti.

Concludendo, le alterazioni istopatologiche rilevate sembrerebbero essere associate alla presenza delle malattie infettive emergenti e all'attacco da parte di batteri e parassiti in generale mentre, le malattie infettive emergenti non sembrerebbero essere indotte dagli inquinanti. Anche se è solo un piccolo inizio, non è escluso che verranno effettuate ulteriori analisi prendendo in considerazione un maggior numero di animali, con l'obiettivo di ottenere una migliore caratterizzazione e quantificazione delle alterazioni istopatologiche riscontrate sia nella gonade come biomarcatori validi per valutarne lo stato riproduttivo che nel fegato per valutare lo stato di salute. Inoltre, verrà eseguita la quantificazione dell'espressione del CYP1A1 e di MT al fine di ottenere una conferma diagnostica dell'esposizione agli inquinanti ambientali più attendibile.

In ogni caso è nostro dovere monitorare lo stato di salute delle acque e tutelarle per preservare la salute e la continuità delle specie nei nostri mari che poco a poco si stanno ritirando dai loro habitat naturali e tendono a diminuire pericolosamente.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, A. (2018). *Population biology, conservation threats and status of Mediterranean striped dolphins (Stenella coeruleoalba)*.
<https://www.researchgate.net/publication/285767442>
- Aguilar, A., Borrell, A., & Pastor, T. (1999). Biological factors affecting variability of persistent pollutant levels in cetaceans. *J. Cetacean Res. Manage.*, *1*, 83–116. <https://doi.org/10.47536/JCRM.V1I1.264>
- Alba, P., Terracciano, G., Franco, A., Lorenzetti, S., Cocumelli, C., Fichi, G., Eleni, C., Zygmunt, M. S., Cloeckert, A., & Battisti, A. (2013). The presence of *Brucella ceti* ST26 in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) with meningoencephalitis from the Mediterranean Sea. *Veterinary Microbiology*, *164*(1–2), 158–163.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.01.023>
- Alstrup, A. K. O., Jensen, L. F., Hansen, M. S., Kinze, C. C., & Jensen, T. H. (2016). *Aquatic Mammals*. *42*(3), 292–299.
<https://doi.org/10.1578/AM.42.3.2016.292>

- Amaral, A. R., Gretchen, L., Maria M, C., George, A., & Howard C, R. (2014). Hybrid speciation in a marine mammal: The clymene dolphin (*Stenella clymene*). *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083645>
- Angelucci, C. B., Giacomini-Stuffler, R., Baffoni, M., di Francesco, C. E., di Francesco, G., di Renzo, L., Tittarelli, M., Petrella, A., Grattarola, C., Mazzariol, S., Sierra, E., Fernández, A., & di Guardo, G. (2022). Cellular Prion Protein Expression in the Brain Tissue from *Brucella ceti*-Infected Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Animals*, *12*(10), 1304. <https://doi.org/10.3390/ANI12101304/S1>
- Ansmann, I. C., Parra, G. J., Chilvers, B. L., & Lanyon, J. M. (2012). Dolphins restructure social system after reduction of commercial fisheries. *Animal Behaviour*, *84*(3), 575–581. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.06.009>
- Archer, F. I. (2018). Striped Dolphin. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 954–956). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00251-x>
- Arrigoni, M., Manfredi, P., Panigada, S., Bramanti, L., & Santangelo, G. (2011). Life-history tables of the Mediterranean fin whale from stranding data. *Marine Ecology*, *32*(SUPPL. 1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0485.2011.00437.X>

- Barco, S. G., Swingle, W. M., McLellan, W. A., Harris, R. N., & Pabst, D. A. (1999). Local abundance and distribution of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the nearshore waters of Virginia Beach, Virginia. *Marine Mammal Science*, 15(2), 394–408. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00809.x>
- Bearzi, G., Fortuna, C. M., & Reeves, R. R. (2009). Ecology and conservation of common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in the Mediterranean Sea. In *Mammal Review* (Vol. 39, Issue 2, pp. 92–123). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.2008.00133.x>
- Bearzi, G., Holcer, D., & di Sciara, G. N. (2004). The role of historical dolphin takes and habitat degradation in shaping the present status of northern Adriatic cetaceans. In *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* (Vol. 14, Issue 4, pp. 363–379). <https://doi.org/10.1002/aqc.626>
- Berta, A. (2009). Pinnipedia, Overview. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 878–885. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00202-9>
- Bianchi, C. N., & Morrià, C. (2007). *Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research*.

- Bigal, E., Morick, D., Scheinin, A. P., Salant, H., Berkowitz, A., King, R., Levy, Y., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Goffman, O., Hadar, N., Roditi-Elasar, M., & Tchernov, D. (2018). Detection of *Toxoplasma gondii* in three common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*); A first description from the Eastern Mediterranean Sea. *Veterinary Parasitology*, 258, 74–78. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2018.06.009>
- Bilandžić, N., Sedak, M., Dokić, M., Gomerčić, M. D., Gomerčić, T., Zadavec, M., Benić, M., & Crnić, A. P. (2012). Toxic element concentrations in the bottlenose (*Tursiops truncatus*), striped (*Stenella coeruleoalba*) and Risso's (*Grampus griseus*) dolphins stranded in eastern Adriatic Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(3), 467–473. <https://doi.org/10.1007/S00128-012-0716-6/TABLES/4>
- Blasi, M. F., Bruno, C., & Boitani, L. (2020). Female reproductive output in a Mediterranean bottlenose dolphin *Tursiops truncatus* population. *Aquatic Biology*, 29, 123–136. <https://doi.org/10.3354/AB00732>
- Bonizzoni, S., Furey, N. B., & Bearzi, G. (2021). Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the north-western Adriatic Sea: Spatial distribution and effects of trawling. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(3), 635–650. <https://doi.org/10.1002/aqc.3433>

- Boon, J. P., van der Meer, J., Allchin, C. R., Law, R. J., Klungsøyr, J., Leonards, P. E. G., Spliid, H., Storr-Hansen, E., McKenzie, C., & Wells, D. E. (1997). Concentration-dependent changes of PCB patterns in fish-eating mammals: Structural evidence for induction of cytochrome P450. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *33*(3), 298–311. <https://doi.org/10.1007/S002449900257/METRICS>
- Borrell, A., & Aguilar, A. (2005). Differences in DDT and PCB residues between common and striped dolphins from the southwestern Mediterranean. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *48*(4), 501–508. <https://doi.org/10.1007/S00244-004-0039-7/FIGURES/3>
- Bossart, G. D., Corresponding, F., Bossart, G. D., Aquarium, G., & St, B. N. W. (2011). *Wildlife and Marine Animals Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health*. <https://doi.org/10.1177/0300985810388525>
- Bossart, G. D., Romano, T. A., Peden-Adams, M. M., Schaefer, A. M., Rice, C. D., Fair, P. A., & Reif, J. S. (2019). Comparative innate and adaptive immune responses in atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with viral, bacterial, and fungal infections. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAY), 1125. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01125/BIBTEX>

- Brook, F. M., Kinoshita, R., & Benirschke, K. (2002). Histology of the ovaries of a bottlenose dolphin, *Tursiops aduncus*, of known reproductive history. *Marine Mammal Science*, *18*(2), 540–544. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2002.tb01054.x>
- Calzada, N., Aguilar, A., Sørensen, T. B., & Lockyer, C. (1996). Reproductive biology of female striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. *Journal of Zoology*, *240*(3), 581–591. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1996.TB05308.X>
- Casalone, C., Mazzariol, S., Pautasso, A., Guardo, G. di, Nocera, F. di, Lucifora, G., Ligios, C., Franco, A., Fichi, G., Cocumelli, C., Cersini, A., Guercio, A., Puleio, R., Gorla, M., Podestà, M., Marsili, L., Pavan, G., Pintore, A., de Carlo, E., ... Caracappa, S. (2014). Cetacean strandings in Italy: an unusual mortality event along the Tyrrhenian Sea coast in 2013. *Diseases of Aquatic Organisms*, *109*(1), 81–86. <https://doi.org/10.3354/DAO02726>
- Centelleghè, C., da Dalt, L., Marsili, L., Zanetti, R., Fernandez, A., Arbelo, M., Sierra, E., Castagnaro, M., di Guardo, G., & Mazzariol, S. (2019). Insights into dolphins' immunology: Immuno-phenotypic study on mediterranean and atlantic stranded cetaceans. *Frontiers in Immunology*, *10*(APR), 888. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00888/BIBTEX>

- Chivers, S. J. (2018). Cetacean Life History. In *Encyclopedia of Marine Mammals* (pp. 186–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00089-3>
- CIBRA - Banca Dati Spiaggiamenti. Retrieved January 15, 2023, from <http://www-9.unipv.it/cibra/spiaggiamenti.html>
- Conrad, P. A., Miller, M. A., Kreuder, C., James, E. R., Mazet, J., Dabritz, H., Jessup, D. A., Gulland, F., & Grigg, M. E. (2005). Transmission of *Toxoplasma*: Clues from the study of sea otters as sentinels of *Toxoplasma gondii* flow into the marine environment. *International Journal for Parasitology*, 35(11–12), 1155–1168. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2005.07.002>
- Cornaglia, E., Rebora, L., Gili, C., & di Guardo, G. (2000). Histopathological and Immunohistochemical Studies on Cetaceans Found Stranded on the Coast of Italy between 1990 and 1997. In *J. Vet. Med. A* (Vol. 47).
- Costa-Silva, S., Sacristán, C., Gonzales-Viera, O., Díaz-Delgado, J., Sánchez-Sarmiento, A. M., Marigo, J., Groch, K. R., Carvalho, V. L., Ewbank, A. C., Colosio, A. C., Marcondes, M. C. C., Meirelles, A. C. O. de, Bertozzi, C. P., Lailson-Brito, J., Azevedo, A. D. F., Ruoppolo, V., Oliveira, L., Ott, P. H., & Catão-Dias, J. L. (2019). *Toxoplasma gondii* in cetaceans of

Brazil: a histopathological and immunohistochemical survey. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(3), 395–402.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612019051>

Cozzi, B., Huggenberger, S., Oelschläger, H. A., Demma, M., Gorter, U., & Oelschläger, J. (2010). *Anatomy of dolphins : insights into body structure and function*.

Crespo-Picazo, J. L., Rubio-Guerri, C., Jiménez, M. A., Aznar, F. J., Marco-Cabedo, V., Melero, M., Sánchez-Vizcaíno, J. M., Gozalbes, P., & García-Párraga, D. (2021). Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) aggressive behavior towards other cetacean species in the western Mediterranean. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00867-6>

Cunningham, Andrew A. (2005). A walk on the wild side—emerging wildlife diseases. *BMJ*, 331(7527), 1214–1215.
<https://doi.org/10.1136/BMJ.331.7527.1214>

Cvetnić, Ž., Duvnjak, S., Đuras, M., Gomerčić, T., Reil, I., Zdelar-Tuk, M., & Špičić, S. (2016). Evidence of *Brucella* strain ST27 in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Europe. *Veterinary Microbiology*, 196, 93–97.
<https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2016.10.013>

- D.S, P., & R, T. (2013). Cetaceans Value and Conservation in the Mediterranean Sea. *Journal of Biodiversity & Endangered Species*, 01(s1).
<https://doi.org/10.4172/2332-2543.s1-004>
- Dagleish, M. P., Barley, J., Finlayson, J., Reid, R. J., & Foster, G. (2008). *Brucella ceti* Associated Pathology in the Testicle of a Harbour Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Journal of Comparative Pathology*, 139(1), 54–59.
<https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2008.03.004>
- Danil, K., st. Leger, J. A., Dennison, S., de Quirós, Y. B., Scadeng, M., Nilson, E., & Beaulieu, N. (2014). *Clostridium perfringens* septicemia in a long-beaked common dolphin *Delphinus capensis*: An etiology of gas bubble accumulation in cetaceans. *Diseases of Aquatic Organisms*, 111(3), 183–190. <https://doi.org/10.3354/dao02783>
- Davison, N. J., Barnett, J. E. F., Perrett, L. L., Dawson, C. E., Perkins, M. W., Deaville, R. C., & Jepson, P. D. (2013). Meningoencephalitis and Arthritis Associated with *Brucella ceti* in a Short-beaked Common Dolphin (*Delphinus delphis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 49(3), 632–636.
<https://doi.org/10.7589/2012-06-165>
- Dawson, C. E., Stubberfield, E. J., Perrett, L. L., King, A. C., Whatmore, A. M., Bashiruddin, J. B., Stack, J. A., & MacMillan, A. P. (2008). Phenotypic

- Desforges, J. P. W., Ross, P. S., & Loseto, L. L. (2012). Transplacental transfer of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in arctic beluga whales (*Delphinapterus leucas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *31*(2), 296–300. <https://doi.org/10.1002/ETC.750>
- Desforges, J. P., Hall, A., McConnell, B., Rosing-Asvid, A., Barber, J. L., Brownlow, A., de Guise, S., Eulaers, I., Jepson, P. D., Letcher, R. J., Levin, M., Ross, P. S., Samarra, F., Víkingsson, G., Sonne, C., & Dietz, R. (2018). Predicting global killer whale population collapse from PCB pollution. *Science*, *361*(6409), 1373–1376. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAT1953/SUPPL_FILE/AAT1953_DESFORGES_SM_V2.PDF
- Desportes, G., Saboureau, M., & Lacroix, A. (1993). *Growth-related changes in testicular mass and plasma testosterone concentrations in long-finned pilot whales, Globicephala melas*.
- Di Guardo, G., Cocumelli, C., Scholl, F., di Francesco, C. E., Speranza, R., Pennelli, M., & Eleni, C. (2011). Morbilliviral encephalitis in a striped dolphin *Stenella coeruleoalba* calf from Italy. *Diseases of Aquatic Organisms*, *95*(3), 247–251. <https://doi.org/10.3354/DAO02355>

- Díaz López, B. (2011). Whistle characteristics in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Mediterranean Sea: Influence of behaviour. *Mammalian Biology*, 76(2), 180–189.
<https://doi.org/10.1016/J.MAMBIO.2010.06.006/METRICS>
- Díaz-Aguirre, F., Parra, G. J., Passadore, C., & Möller, L. (2020). Kinship and reproductive condition correlate with affiliation patterns in female southern Australian bottlenose dolphins. *Scientific Reports* |, 10, 1891.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58800-2>
- Díaz-Delgado, J., Arbelo, M., Sierra, E., Vela, A., Domínguez, M., Paz, Y., Andrada, M., Domínguez, L., & Fernández, A. (2015). Fatal *Erysipelothrix rhusiopathiae* septicemia in two Atlantic dolphins (*Stenella frontalis* and *Tursiops truncatus*). *Diseases of Aquatic Organisms*, 116(1), 75–81.
<https://doi.org/10.3354/DAO02900>
- Díaz-Delgado, J., Groch, K. R., Sierra, E., Sacchini, S., Zucca, D., Quesada-Canales, Ó., Arbelo, M., Fernández, A., Santos, E., Ikeda, J., Carvalho, R., Azevedo, A. F., Lailson-Brito, J., Flach, L., Ressio, R., Kanamura, C. T., Sansone, M., Favero, C., Porter, B. F., ... Catão-Dias, J. L. (2019). Comparative histopathologic and viral immunohistochemical studies on CeMV infection among Western Mediterranean, Northeast-Central, and

Southwestern Atlantic cetaceans. *PLoS ONE*, 14(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213363>

Díaz-Santana, P., Fernández, A., Díaz-Delgado, J., Vela, A. I., Domínguez, L., Suárez-Santana, C., Puig-Lozano, R., Fernández-Maldonado, C., Sierra, E., & Arbelo, M. (2022). Nocardiosis in Free-Ranging Cetaceans from the Central-Eastern Atlantic Ocean and Contiguous Mediterranean Sea. *Animals* 2022, Vol. 12, Page 434, 12(4), 434. <https://doi.org/10.3390/ANI12040434>

Dubey, J. P., Fair, P. A., Bossart, G. D., Hill, D., Fayer, R., Sreekumar, C., Kwok, O. C. H., & Thulliez, P. (2005). “A comparison of several serologic tests to detect antibodies to toxoplasma gondii in naturally exposed bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)”. *Journal of Parasitology*, 91(5), 1074–1081. <https://doi.org/10.1645/GE-582R.1>

Dubey, J. P., Navarro, I. T., Graham, D. H., Dahl, E., Freire, R. L., Prudencio, L. B., Sreekumar, C., Vianna, M. C., & Lehmann, T. (2003). Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Paraná, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117(3), 229–234. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2003.09.003>

- Ecol, M., Ser, P., & Bowen, W. D. (1997). *MARINE ECOLOGY PROGRESS SERIES Role of marine mammals in aquatic ecosystems* (Vol. 158).
- Edwards, E. F., Kellar, N. M., & Perrin, W. F. (2013). *Form, function and pathology in the pantropical spotted dolphin (Stenella attenuata)*.
<https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/4597>
- Endo, T., Kimura, O., Hisamichi, Y., Minoshima, Y., & Haraguchi, K. (2007). Age-dependent accumulation of heavy metals in a pod of killer whales (*Orcinus orca*) stranded in the northern area of Japan. *Chemosphere*, *67*(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.09.086>
- Ewalt, D. R., Payeur, J. B., Martin, B. M., Cummins, D. R., & Miller, W. G. (1994). Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Vet Diagn Invest*, *6*, 448–452.
- 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), e0176202.
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0176202>
- Fernandez, A., Jepson, P. D., Diaz-Delgado, J., de Quiros, Y. B., Sierra, E., Mompeo, B., Vela, A. I., di Guardo, G., Suarez-Santana, C., de los

- Monteros, A. E., Herraéz, P., Andrada, M., Caballero, M. J., Rivero, M., Consoli, F., Castro-Alonso, A., Quesada-Canales, O., & Arbelo, M. (2022). Budd-Chiari-like pathology in dolphins. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16947-0>
- Fernández, A., Sierra, E., Díaz-Delgado, J., Sacchini, S., Sánchez-Paz, Y., Suárez-Santana, C., Arregui, M., Arbelo, M., & Bernaldo De Quirós, Y. (2017). Deadly acute Decompression Sickness in Risso's dolphins. *Scientific Reports* *2017 7:1*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14038-z>
- Fernandez, S., & Hohn, A. A. (1998). *Age, growth, and calving season of bottlenose dolphins, Tursiops truncatus, off coastal Texas.*
- Forcada (2004). *Abundance Tursiops truncatus.*
- Fossi, M. C., & Marsili, L. (1997). *The use of non-destructive biomarkers in the study of marine mammals.*
- Foster, G., MacMillan, A. P., Godfroid, J., Howie, F., Ross, H. M., Cloeckert, A., Reid, R. J., Brew, S., & Patterson, I. A. P. (2002). A review of *Brucella* sp. infection of sea mammals with particular emphasis on isolates from Scotland. *Veterinary Microbiology*, *90*(1–4), 563–580. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00236-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00236-5)

- Frodello, J. P., & Marchand, B. (2001). *Cadmium, Copper, Lead, and Zinc in Five Toothed Whale Species of the Mediterranean Sea*.
- Galligan, T. M., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Bolton, J. L., Quigley, B. M., Rosel, P. E., Ylitalo, G. M., & 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. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.03.083>
- García-Alvarez, N., Martín, V., Fernández, A., Almunia, J., Xuriach, A., Arbelo, M., Tejedor, M., Boada, L. D., Zumbado, M., & Luzardo, O. P. (2014). Levels and profiles of POPs (organochlorine pesticides, PCBs, and PAHs) in free-ranging common bottlenose dolphins of the Canary Islands, Spain. *Science of The Total Environment*, 493, 22–31. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.05.125>
- Gardner, R. L. (2001). The initial phase of embryonic patterning in mammals. *International Review of Cytology*, 203, 233–290. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)03009-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)03009-1)
- Garofolo, G., Petrella, A., Lucifora, G., di Francesco, G., di Guardo, G., Pautasso, A., Iulini, B., Varello, K., Giorda, F., Gorla, M., Dondo, A., Zoppi, S., di Francesco, C. E., Giglio, S., Ferringo, F., Serrecchia, L.,

- Ferrantino, M. A. R., Zilli, K., Janowicz, A., ... Grattarola, C. (2020). Occurrence of *Brucella ceti* in striped dolphins from Italian Seas. *PLoS ONE*, *15*(10 October). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240178>
- Garofolo, G., Zilli, K., Troiano, P., Petrella, A., Marotta, F., di Serafino, G., Ancora, M., & di Giannatale, E. (2014). *Brucella ceti* from two striped dolphins stranded on the Apulia coastline, Italy. *Journal of Medical Microbiology*, *63*(PART 2), 325–329. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.065672-0/CITE/REFWORKS>
- Gaspari, S., Holcer, D., Mackelworth, P., Fortuna, C., Frantzis, A., Genov, T., Vighi, M., Natali, C., Rako, N., Banchi, E., Chelazzi, G., & Ciofi, C. (2015). Population genetic structure of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Adriatic Sea and contiguous regions: Implications for international conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *25*(2), 212–222. <https://doi.org/10.1002/aqc.2415>
- Gazda, S. K., Connor, R. C., Edgar, R. K., & Cox, F. (2005). A division of labour with role specialization in group-hunting bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) off Cedar Key, Florida. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *272*(1559), 135–140. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2004.2937>

- Genov, T., Jepson, P. D., Barber, J. L., Hace, A., Gaspari, S., Centrih, T., Lesjak, J., & Kotnjek, P. (2019). Linking organochlorine contaminants with demographic parameters in free-ranging common bottlenose dolphins from the northern Adriatic Sea. *Science of The Total Environment*, 657, 200–212. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.025>
- Gibson, A. K., Raverty, S., Lambourn, D. M., Huggins, J., Magargal, S. L., & Grigg, M. E. (2011). Polyparasitism Is Associated with Increased Disease Severity in *Toxoplasma gondii*-Infected Marine Sentinel Species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(5), e1142. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0001142>
- Giorda, F., Romani-Cremaschi, U., Marsh, A. E., Grattarola, C., Iulini, B., Pautasso, A., Varello, K., Berio, E., Gazzuola, P., Marsili, L., di Francesco, C. E., Gorla, M., Verna, F., Audino, T., Peletto, S., Caramelli, M., Fernández-Escobar, M., Sierra, E., Fernández, A., ... Casalone, C. (2021). Evidence for unknown sarcocystis-like infection in stranded striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the ligurian sea, Italy. *Animals*, 11(5), 1201. <https://doi.org/10.3390/ANI11051201/S1>
- Gnone, G., Bellingeri, M., Dhermain, F., Dupraz, F., Nuti, S., Bedocchi, D., Moulins, A., Rosso, M., Alessi, J., Mccrea, R. S., Azzellino, A., Airoidi, S., Fortunato, N., Laran, S., David, L., di Meglio, N., Bonelli, P., Montesi,

G., Trucchi, R., ... Wurtz, M. (2011). Distribution, abundance, and movements of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the Pelagos Sanctuary MPA (north-west Mediterranean Sea). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(4), 372–388. <https://doi.org/10.1002/AQC.1191>

Godard, C. A. J., Leaver, M. J., Said, M. R., Dickerson, R. L., George, S., & Stegeman, J. J. (2000). Identification of cytochrome P450 1B-like sequences in two teleost fish species (scup, *Stenotomus chrysops* and plaice, *Pleuronectes platessa*) and in a cetacean (striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*). *Marine Environmental Research*, 50(1–5), 7–10. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00052-0](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00052-0)

Gomer, H., Huber, uro, Gomer, V., Vukovi, S., krti, D., Gomer, T., Dobrani, V., Luci, H., urkovi, S., Gomer, A., & Kardo, L. (2000). Fatty liver and subcutaneous edema in a free-living bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) from the Adriatic Sea; light-and electron-microscopical study. *VETERINARSKI ARHIV*, 70(5), 259–277.

Gomerčić, H., Huber, Đ., Gomerčić, V., Vuković, S., Škrtić, D., Gomerčić, T., Dobranić, V., Lucić, H., Đuras, M., Čurković, S., Gomerčić, A., & Kardoš, L. (2000). Fatty liver and subcutaneous edema in a free-living bottlenose

- dolphin (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821) from the Adriatic Sea; light- and electron-microscopical study. *Veterinarski Arhiv*, 70(5), 259–277.
- Gómez-Campos, E., Borrell, A., Cardona, L., Forcada, J., & Aguilar, A. (2011). Overfishing of Small Pelagic Fishes Increases Trophic Overlap between Immature and Mature Striped Dolphins in the Mediterranean Sea. *PLOS ONE*, 6(9), e24554. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024554>
- González-Barrientos, R., Morales, J. A., Hernández-Mora, G., Barquero-Calvo, E., Guzmán-Verri, C., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. (2010). Pathology of Striped Dolphins (*Stenella coeruleoalba*) Infected with *Brucella ceti*. *Journal of Comparative Pathology*, 142(4), 347–352. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2009.10.017>
- Gonzalvo, J., Lauriano, G., Hammond, P. S., Viaud-Martinez, K. A., Fossi, M. C., Natoli, A., & Marsili, L. (2016). The Gulf of Ambracia's Common Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*: A Highly Dense and yet Threatened Population. *Advances in Marine Biology*, 75, 259–296. <https://doi.org/10.1016/BS.AMB.2016.07.002>
- Grellier, K., Hammond, P. S., Wilson, B., Sanders-Reed, C. A., & Thompson, P. M. (2011). Use of photo-identification data to quantify mother–calf

association patterns in bottlenose dolphins. *Https://Doi.Org/10.1139/Z03-132*, 81(8), 1421–1427. <https://doi.org/10.1139/Z03-132>

Guardo, G. di, Proietto, U., di Francesco, C. E., Marsilio, F., Zaccaroni, A., Scaravelli, D., Mignone, W., Garibaldi, F., Kennedy, S., Forster, F., Bozzetta, E., & Casalone, C. (2010). *Cerebral Toxoplasmosis in Striped Dolphins (Stenella coeruleoalba) Stranded Along the Ligurian Sea Coast of Italy*. <https://doi.org/10.1177/0300985809358036>

Guo, W., Pan, B., Sakkiah, S., Yavas, G., Ge, W., Zou, W., Tong, W., & Hong, H. (2019). Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2019, Vol. 16, Page 4361, 16(22), 4361. <https://doi.org/10.3390/IJERPH16224361>

Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J. A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. (2012a). *Brucella ceti* and brucellosis in cetaceans. In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 3). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00003>

Guzmán-Verri, C., González-Barrientos, R., Hernández-Mora, G., Morales, J. A., Baquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., & Moreno, E. (2012b). *Brucella*

- ceti and brucellosis in cetaceans. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 3. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2012.00003/BIBTEX>
- Harrison, R. J. (1971). Gonadal activity in some Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). In *J. Zool., Lond* (Vol. 165).
- Harrison, R. J., & Ridgway, S. H. (1971). Gonadal activity in some Bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoology*, 165(3), 355–366. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.1971.TB02193.X>
- Das, K., Debacker, V., Pillet, S., & Bouquegneau, J. M. (2002). Heavy metals in marine mammals. In *Toxicology of marine mammals* (pp. 147-179). <https://doi.org/10.1201/9780203165577-11>
- Hernández-Mora, G., González-Barrientos, R., Morales, J. A., Chaves-Olarte, E., Guzmán-Verri, C., Baquero-Calvo, E., De-Miguel, M. J., Marín, C. M., Blasco, J. M., & Moreno, E. (2008). Neurobrucellosis in Stranded Dolphins, Costa Rica. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1430. <https://doi.org/10.3201/EID1409.071056>
- Hohn, A. A., Chivers, S. J., & Barlow, J. (1985). Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins, *Stenella attenuata*, in the eastern tropical pacific. *Marine Mammal Science*, 1(4), 273–293. <https://doi.org/10.1111/J.1748-7692.1985.TB00016.X>

- Honma, Y., Ushiki, T., Hashizume, H., Takeda, M., Matsuishi, T., & Honno, Y. (2004). Histological observations on the reproductive organs of harbor porpoises *Phocoena phocoena* incidentally caught in a set net installed off Usujiri, southern Hokkaido. *Fisheries Science*, *70*(1), 94–99. <https://doi.org/10.1111/J.1444-2906.2003.00776.X>
- Hoydal, K. S., Jenssen, B. M., Letcher, R. J., Dam, M., & Arukwe, A. (2018). Hepatic phase I and II biotransformation responses and contaminant exposure in long-finned pilot whales from the Northeastern Atlantic. *Marine Environmental Research*, *134*, 44–54. <https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2017.12.010>
- Isidoro-Ayza, M., Ruiz-Villalobos, N., Pérez, L., Guzmán-Verri, C., Muñoz, P. M., Alegre, F., Barberán, M., Chacón-Díaz, C., Chaves-Olarte, E., González-Barrientos, R., Moreno, E., Blasco, J. M., & Domingo, M. (2014). *Brucella ceti* infection in dolphins from the Western Mediterranean sea. *BMC Veterinary Research*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12917-014-0206-7/FIGURES/7>
- ISPRA), G. L. (Italian I. for E. P. and R. –. (2020). IUCN Red List of Threatened Species: *Stenella coeruleoalba* Mediterranean subpopulation. *IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/en>

- ITO, H., & MIYAZAKI, N. (1990). Skeletal Development of the Striped Dolphin (*Stenella coeruleoalba*) in Japanese Waters. *Journal of the Mammalogical Society of Japan*, 14(2), 79–96. <https://doi.org/10.11238/JMAMMSOCJAPAN1987.14.79>
- Jaber, J. R., Pérez, J., Rotstein, D., Zafra, R., Herráez, P., Carrascosa, C., & Fernández, A. (2013). Biliary cirrhosis caused by *Campylobacter* spp. in a dolphin and four porpoises. *Diseases of Aquatic Organisms*, 106(1), 79–84. <https://doi.org/10.3354/DAO02630>
- Jahans, K. L., Foster, G., & Broughton, E. S. (1997). The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. *Veterinary Microbiology*, 57(4), 373–382. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00118-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00118-1)
- Jauniaux, T. P., Brenez, C., Fretin, D., Godfroid, J., Haelters, J., Jacques, T., Kerckhof, F., Mast, J., Sarlet, M., & Coignoul, F. L. (2010). *Brucella ceti* Infection in Harbor Porpoise (*Phocoena phocoena*). *Emerging Infectious Diseases*, 16(12), 1966. <https://doi.org/10.3201/EID1612.101008>
- 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/ASSET/06A63BB5-73F8-4E8B-829B-552CDA4E31C4/ASSETS/GRAPHIC/352_1388_F1.JPEG

Jepson, P. D., Deaville, R., Patterson, I. A. P., Pocknell, A. M., Ross, H. M., Baker, J. R., Howie, F. E., Reid, R. J., Colloff, A., & Cunningham, A. A. (2005). Acute and Chronic Gas Bubble Lesions in Cetaceans Stranded in the United Kingdom. In *Vet Pathol* (Vol. 42).

Jessup, D. A., Miller, M., Ames, J., Harris, M., Kreuder, C., Conrad, P. A., & Mazet, J. A. K. (2004). Southern Sea Otter as a Sentinel of Marine Ecosystem Health. *EcoHealth* 2004 1:3, 1(3), 239–245. <https://doi.org/10.1007/S10393-004-0093-7>

Johnson, W. R., Torralba, M., Fair, P. A., Bossart, G. D., Nelson, K. E., & Morris, P. J. (2009). Novel diversity of bacterial communities associated with bottlenose dolphin upper respiratory tracts. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 555–562. <https://doi.org/10.1111/J.1758-2229.2009.00080.X>

Kasuya, T. (1972). “*Effect of exploitation on reproductive parameters of the spotted and striped dolphins off the pacific coast of Japan*”.

Kehrig, H. A., Hauser-Davis, R. A., Seixas, T. G., Pinheiro, A. B., & di Benedetto, A. P. M. (2016). Mercury species, selenium, metallothioneins

and glutathione in two dolphins from the southeastern Brazilian coast: Mercury detoxification and physiological differences in diving capacity. *Environmental Pollution*, 213, 785–792.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2016.03.041>

Kemper, C. M., Trentin, E., & Tomo, I. (2014). Sexual maturity in male Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*): Evidence for regressed/pathological adults. *Journal of Mammalogy*, 95(2), 357–368.
<https://doi.org/10.1644/13-MAMM-A-007.1/2/JMAMMAL-95-2-357-FIG6.JPEG>

Kemper, C., Talamonti, M., Bossley, M., & Steiner, A. (2019). Sexual maturity and estimated fecundity in female Indo-Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*) from South Australia: Combining field observations and postmortem results. *Marine Mammal Science*, 35(1), 40–57.
<https://doi.org/10.1111/MMS.12509/SUPPINFO>

Kesselring, T., Viquerat, S., IJsseldijk, L. L., Langeheine, M., Wohlsein, P., Gröne, A., Bergmann, M., Siebert, U., & Brehm, R. (2019). Testicular morphology and spermatogenesis in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Theriogenology*, 126, 177–186.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.11.031>

- Kirschvink, J. L., Dizon, A. E., & Westphal, J. A. (1986). Evidence From Strandings for Geomagnetic Sensitivity in Cetaceans. *Journal of Experimental Biology*, 120(1), 1–24. <https://doi.org/10.1242/JEB.120.1.1>
- Kjeld, M., Alfredsson, Á., Ólafsson, Ö., Tryland, M., Christensen, I., Stuen, S., & Árnason, A. (2011). Changes in blood testosterone and progesterone concentrations of the North Atlantic minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) during the feeding season. *Https://Doi.Org/10.1139/F03-159*, 61(2), 230–237. <https://doi.org/10.1139/F03-159>
- Klatsky, L. J., Wells, R. S., & Sweeney, J. C. (2007). Offshore Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*): Movement and Dive Behavior Near the Bermuda Pedestal. *Journal of Mammalogy*, 88(1), 59–66. <https://doi.org/10.1644/05-MAMM-A-365R1.1>
- Korzh, V. (2005). Boris Balinsky: transition from embryology to developmental biology. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 27(9), 970–977. <https://doi.org/10.1002/bies.20253>
- Lahaye, V., Bustamante, P., Dabin, W., Churlaud, C., & Caurant, F. (2007). Trace element levels in foetus–mother pairs of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded along the French coasts.

Environment International, 33(8), 1021–1028.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2007.05.008>

Lauriano, G., di Guardo, G., Marsili, L., Maltese, S., & Fossi, M. C. (2014a).

Biological threats and environmental pollutants, a lethal mixture for mediterranean cetaceans? *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(6), 1221–1225.

<https://doi.org/10.1017/S0025315413000714>

Law, R. J. (2014). An overview of time trends in organic contaminant

concentrations in marine mammals: Going up or down? *Marine Pollution Bulletin*, 82(1–2), 7–10.

<https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2014.03.024>

Leduc, R. G., Perrin, W. F., & Dizon, A. E. (1999). Phylogenetic relationships

among the delphinid cetaceans based on full cytochrome B sequences. *Marine Mammal Science*, 15(3), 619–648. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.1999.tb00833.x>

Linares, V., Bellés, M., & Domingo, J. L. (2015). Human exposure to PBDE

and critical evaluation of health hazards. *Archives of Toxicology*, 89(3), 335–356. <https://doi.org/10.1007/S00204-015-1457-1/TABLES/3>

LISTA ROSSA IUCN DEI VERTEBRATI ITALIANI. (2013).

- Liwanag, H. E. M., Berta, A., Costa, D. P., Budge, S. M., & Williams, T. M. (2012). Morphological and thermal properties of mammalian insulation: the evolutionary transition to blubber in pinnipeds. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(4), 774–787. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.2012.01992.X>
- Marsili, L., Jiménez, B., & Borrell, A. (2018). Persistent Organic Pollutants in Cetaceans Living in a Hotspot Area: The Mediterranean Sea. *Marine Mammal Ecotoxicology: Impacts of Multiple Stressors on Population Health*, 185–212. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812144-3.00007-3>
- Mazzariol S., Cozzi B., Centelleghè C. (2013). “Spiaggiamento dei cetacei: Manuale di gestione”.
- Mazucca, L., Atkinson, S., Keating, B., & Nitta, E. (1999). *Aquatic Mammals*. 2, 105–114.
- McFee, W. E., & Lipscomb, T. P. (2009). Major pathologic findings and probable causes of mortality in bottlenose dolphins stranded in south carolina from 1993 to 2006. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 575–593. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.3.575>
- McFee, W. E., Wu, D., Colegrove, K., Terio, K., Balthis, L., & Young, R. (2020). Occurrence of *Brucella ceti* in stranded bottlenose dolphins

- Tursiops truncatus coincides with calving season. *Diseases of Aquatic Organisms*, 141, 185–193. <https://doi.org/10.3354/DAO03526>
- Mearns, A. J., Bissell, M., Morrison, A. M., Rempel-Hester, M. A., Arthur, C., & Rutherford, N. (2019a). Effects of pollution on marine organisms. *Water Environment Research*, 91(10), 1229–1252. <https://doi.org/10.1002/WER.1218>
- Mearns, A. J., Bissell, M., Morrison, A. M., Rempel-Hester, M. A., Arthur, C., & Rutherford, N. (2019b). Effects of pollution on marine organisms. In *Water Environment Research* (Vol. 91, Issue 10, pp. 1229–1252). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wer.1218>
- Mikaelian, I., Boisclair, J., Dubey, J. P., Kennedy, S., & Martineau, D. (2000). *Toxoplasmosis in beluga whales (Delphinapterus leucas) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey*. 122, 73–76. <http://www.idealibrary.comon>
- Miller, D. L. *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea Whales, Dolphins and Porpoises*. (2007).
- Miller, M. A., Miller, W. A., Conrad, P. A., James, E. R., Melli, A. C., Leutenegger, C. M., Dabritz, H. A., Packham, A. E., Paradies, D., Harris, M., Ames, J., Jessup, D. A., Worcester, K., & Grigg, M. E. (2008). Type

- X *Toxoplasma gondii* in a wild mussel and terrestrial carnivores from coastal California: New linkages between terrestrial mammals, runoff and toxoplasmosis of sea otters. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1319–1328. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2008.02.005>
- Minoia, L., Consales, G., Mazzariol, S., Mancusi, C., Terracciano, G., Ceciari, I., Capanni, F., Neri, A., D’Agostino, A., & Marsili, L. (2023). Preliminary assessment of persistent organic pollutants (POPs) in tissues of Risso’s dolphin (*Grampus griseus*) specimens stranded along the Italian coasts. *Marine Pollution Bulletin*, 186, 114470. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2022.114470>
- Mira, F., Rubio-Guerri, C., purpari, G., puleio, R., Caracappa, G., Gucciardi, F., Russotto, L., Ruggero Loria, G., & Guercio, A. (2019). *Circulation of a novel strain of dolphin morbillivirus (DMV) in stranded cetaceans in the Mediterranean sea*. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46096-w>
- Miyazaki, N. (1977). “*Growth and reproduction of stenella coeruleoalba off the pacific coast of Japan*”.
- Montie, E. W., Fair, P. A., Bossart, G. D., Mitchum, G. B., Houde, M., Muir, D. C. G., Letcher, R. J., McFee, W. E., Starczak, V. R., Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (2008). Cytochrome P4501A1 expression, polychlorinated

biphenyls and hydroxylated metabolites, and adipocyte size of bottlenose dolphins from the Southeast United States. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 397–412. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2007.12.004>

Moon, J. M., Chun, B. J., & Min, Y. il. (2006). Hemorrhagic gastritis and gas emboli after ingesting 3% hydrogen peroxide. *The Journal of Emergency Medicine*, 30(4), 403–406. <https://doi.org/10.1016/J.JEMERMED.2005.05.036>

Mori, C., Morsey, B., Levin, M., Gorton, T. S., & de Guise, S. (2008). Effects of Organochlorines, Individually and in Mixtures, on B-Cell Proliferation in Marine Mammals and Mice. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/15287390701612860>, 71(4), 266–275. <https://doi.org/10.1080/15287390701612860>

Murphy, S., Collet, A., & Rogan, E. (2005). Mating strategy in the male common dolphin (*Delphinus delphis*): what gonadal analysis tells us. In *Journal of Mammalogy* (Vol. 86, Issue 6). www.mammalogy.org

Murphy, S., Law, R. J., Deaville, R., Barnett, J., Perkins, M. W., Brownlow, A., Penrose, R., Davison, N. J., Barber, J. L., & Jepson, P. D. (2018). Organochlorine Contaminants and Reproductive Implication in Cetaceans: A Case Study of the Common Dolphin. *Marine Mammal Ecotoxicology*:

Impacts of Multiple Stressors on Population Health, 3–38.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812144-3.00001-2>

Murphy, S., Pierce, G. J., Law, R. J., Bersuder, P., Jepson, P. D., Learmonth, J. A., Addink, M., Dabin, W., Santos, M. B., Deaville, R., Zegers, B. N., Mets, A., Rogan, E., Ridoux, V., Reid, R. J., Smeenk, C., Jauniaux, T., López, A., Alonso Farré, J. M., ... Boon, J. P. (2010). Assessing the Effect of Persistent Organic Pollutants on Reproductive Activity in Common Dolphins and Harbour Porpoises. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 42, Pp. 153-173. (2010), 42, 153–173.
<https://doi.org/10.2960/J.V42.M658>

Neimanis, A. S., Read, A. J., Foster, R. A., & Gaskin, D. E. (2000). Seasonal regression in testicular size and histology in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*, L.) from the Bay of Fundy and Gulf of Maine. *Journal of Zoology*, 250(2), 221–229. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7998.2000.TB01072.X>

Nelson, D. R., & Strobel, H. W. (1987). Evolution of cytochrome P-450 proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 4(6), 572–593.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040471>

- Norris, K. S., & Schilt, C. R. (1988). Cooperative societies in three-dimensional space: On the origins of aggregations, flocks, and schools, with special reference to dolphins and fish. *Ethology and Sociobiology*, 9(2–4), 149–179. [https://doi.org/10.1016/0162-3095\(88\)90019-2](https://doi.org/10.1016/0162-3095(88)90019-2)
- Notarbartolo di Sciara, G. (2016). Marine Mammals in the Mediterranean Sea: An Overview. *Advances in Marine Biology*, 75, 1–36. <https://doi.org/10.1016/BS.AMB.2016.08.005>
- Ohishi, K., Zenitani, R., Bando, T., Goto, Y., Uchida, K., Maruyama, T., Yamamoto, S., Miyazaki, N., & Fujise, Y. (2003). Pathological and serological evidence of Brucella-infection in baleen whales (Mysticeti) in the western North Pacific. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26(2), 125–136. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(02\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(02)00036-X)
- Ohsumi Seiji (1964.). “Comparison of maturity and accumulation rate of corpora albicantia between the left and right ovaries in cetacea”. *Relazioni scientifiche del whales research institute*, n.18: 123-148
- Orbach, D. N. (2019). *Sexual Strategies: Male and Female Mating Tactics*. 75–93. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16663-2_4/COVER

Páez-Osuna, F., Álvarez-Borrego, S., Ruiz-Fernández, A. C., García-Hernández, J., Jara-Marini, M. E., Bergés-Tiznado, M. E., Piñón-Gimate, A., Alonso-Rodríguez, R., Soto-Jiménez, M. F., Frías-Espericueta, M. G., Ruelas-Inzunza, J. R., Green-Ruiz, C. R., Osuna-Martínez, C. C., & Sanchez-Cabeza, J. A. (2017). Environmental status of the Gulf of California: A pollution review. *Earth-Science Reviews*, *166*, 181–205. <https://doi.org/10.1016/J.EARSCIREV.2017.01.014>

Pautasso, A., Iulini, B., Grattarola, C., Giorda, F., Gorla, M., Peletto, S., Masoero, L., Mignone, W., Varello, K., Petrella, A., Carbone, A., Pintore, A., Denurra, D., Scholl, F., Cersini, A., Puleio, R., Purpari, G., Lucifora, G., Fusco, G., ... Casalone, C. (2019). Novel dolphin morbillivirus (DMV) outbreak among Mediterranean striped dolphins *Stenella coeruleoalba* in Italian waters. *Diseases of Aquatic Organisms*, *132*(3), 215–220. <https://doi.org/10.3354/DAO03323>

Peltier, H., Jepson, P. D., Dabin, W., Deaville, R., Daniel, P., van Canneyt, O., & Ridoux, V. (2014). The contribution of stranding data to monitoring and conservation strategies for cetaceans: Developing spatially explicit mortality indicators for common dolphins (*Delphinus delphis*) in the eastern North-Atlantic. *Ecological Indicators*, *39*, 203–214. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2013.12.019>

- Penzo-Mendez, A. I., & Stanger, B. Z. (2015). Organ-Size Regulation in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a019240. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019240>
- Perrin, W. F., & Geraci, J. R. (2009). Stranding. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 1118–1123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00256-X>
- Perrin, W. F., & Reilly, S. B. (1984). Reproductive Parameters of Dolphins and Small Whales of the Family Deiphinidae. In *REP. INT. WHAL. COMMN (SPECIAL ISSUE (Vol. 6))*.
- Perrin, W. F., Thieleking, J. L., Walker, W. A., Archer, F. I., & Robertson, K. M. (2011). Common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in California waters: Cranial differentiation of coastal and offshore ecotypes. *Marine Mammal Science*, 27(4), 769–792. <https://doi.org/10.1111/J.1748-7692.2010.00442.X>
- Peterson, S. H., Hassrick, J. L., Lafontaine, A., Thomé, J. P., Crocker, D. E., Debier, C., & Costa, D. P. (2014). Effects of Age, Adipose Percent, and Reproduction on PCB Concentrations and Profiles in an Extreme Fasting North Pacific Marine Mammal. *PLOS ONE*, 9(4), e96191. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0096191>

- Polizzi, P. S., Romero, M. B., Chiodi Boudet, L. N., Das, K., Denuncio, P. E., Rodríguez, D. H., & Gerpe, M. S. (2014b). Metallothioneins pattern during ontogeny of coastal dolphin, *Pontoporia blainvillei*, from Argentina. *Marine Pollution Bulletin*, 80(1–2), 275–281. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2013.10.037>
- Pompe-Gotal, J., Srebocan, E., Gomercic, H., & Crnic, A. P. (2009). Mercury concentrations in the tissues of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded on the Croatian Adriatic coast. *Original Paper Veterinarni Medicina*, 54(12), 598–604.
- Ponganis, P. J., van Dam, R. P., Levenson, D. H., Knower, T., Ponganis, K. v., & Marshall, G. (2003). Regional heterothermy and conservation of core temperature in emperor penguins diving under sea ice. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(3), 477–487. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00133-8)
- Rajni Arora, G. (2009). “*Developmental biology*”. Chapter III, “patterns of development”.
- Randa M. Alarousy, Mostafa. M. E. and D. K. (2018). Pollution. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 51(1)(24), 746–753. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00202-8>

- Rehtanz, M., Ghim, S. J., McFee, W., Doescher, B., Lacave, G., Fair, P. A., Reif, J. S., Bossart, G. D., & Jenson, A. B. (2010). Papillomavirus antibody prevalence in free-ranging and captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 46(1), 136–145. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.136>
- Reif, J. S. (2011). Animal Sentinels for Environmental and Public Health. *Public Health Reports*, 126.
- Revision, M., Análisis, Y., & Datos, D. E. (2019). *Influence of marine pollution on infectious diseases in marine mammals: review and data analysis*. <https://digibuo.uniovi.es/dspace/handle/10651/59422>
- Roca-Monge, K., González-Barrientos, R., Suárez-Esquivel, M., Palacios-Alfaro, J. D., Castro-Ramírez, L., Jiménez-Soto, M., Cordero-Chavarría, M., García-Párraga, D., Barratclough, A., Moreno, E., & Hernández-Mora, G. (2022). Age and Sexual Maturity Estimation of Stranded Striped Dolphins, *Stenella coeruleoalba*, Infected with *Brucella ceti*. *Oceans*, 3(4), 494–508. <https://doi.org/10.3390/oceans3040033>
- Rosel, P. E., Hansen, L., & Hohn, A. A. (2009). Restricted dispersal in a continuously distributed marine species: Common bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* in coastal waters of the western North Atlantic.

Molecular Ecology, 18(24), 5030–5045. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04413.x>

Ross, P. S. (2010). The Role of Immunotoxic Environmental Contaminants in Facilitating the Emergence of Infectious Diseases in Marine Mammals. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/20028091056917>, 8(2), 277–292. <https://doi.org/10.1080/20028091056917>

Schneider, P., Korolenko, T. A., & Busch, U. (1997). A Review of Drug-Induced Lysosomal Disorders of the Liver in Man and Laboratory Animals. *Microsc. Res. Tech*, 36, 253–275. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19970215\)36:4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970215)36:4)

Schroeder, J. P., & Keller, K. v. (1990). Artificial Insemination of Bottlenose Dolphins. *The Bottlenose Dolphin*, 447–460. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-440280-5.50030-5>

Sergeant, D. E. (1972). *Mass strandings of toothed whales (odontoceti) as a population phenomenon.*

Setchell, B. P. (1978). The mammalian testis. *The Mammalian Testis.*

Shoham-Frider, E., Kress, N., Wynne, D., Scheinin, A., Roditi-Elsar, M., & Kerem, D. (2009b). Persistent organochlorine pollutants and heavy metals in tissues of common bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from the

Levantine Basin of the Eastern Mediterranean. *Chemosphere*, 77(5), 621–627. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.08.048>

Silvia Pace, D. (2015). Cetaceans Value and Conservation in the Mediterranean Sea View project Cetaceans Value and Conservation in the Mediterranean Sea. *Article in Journal of Biodiversity & Endangered Species*. <https://doi.org/10.4172/2332-2543.S1-004>

Sinaie, M., Bastami, K. D., Ghorbanpour, M., Najafzadeh, H., Shekari, M., & Haghparast, S. (2010). Metallothionein biosynthesis as a detoxification mechanism in mercury exposure in fish, spotted scat (*Scatophagus argus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 36(4), 1235–1242. <https://doi.org/10.1007/S10695-010-9403-X/FIGURES/1>

Slijper. (1966).

Slooten, E. (2011). Age, growth, and reproduction in Hector's dolphins. <https://doi.org/10.1139/Z91-234>, 69(6), 1689–1700. <https://doi.org/10.1139/Z91-234>

Sonne, C., Jepson, P. D., Desforges, J. P., Alstrup, A. K. O., Olsen, M. T., Eulaers, I., Hansen, M., Letcher, R. J., McKinney, M. A., & Dietz, R. (2018). Pollution threatens toothed whales. *Science*, 361(6408), 1208.

https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAV2403/ASSET/0DD41A84-49EB-4715-9EA3-AD4186A79F36/ASSETS/GRAPHIC/361_1208A_F1.JPEG

Spinelli, L. G., Randi, C. B., Mari, R. B., Angrimani, D. S. R., Carvalho, V. L., de Meirelles, A. C. O., Vergara-Parente, J. E., & Guimarães, J. P. (2021). Morphological description of the male reproductive tract of the Clymene dolphin (*Stenella clymene*, Gray, 1850). *Acta Zoologica*, *102*(3), 275–284. <https://doi.org/10.1111/AZO.12334>

Steinman, K. J., & O'Brien, J. (2005). *Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus)* CORALZOO-Optimizing sustainable coral aquaculture View project Conservation of *Emys orbicularis ingauna* View project Todd R Robeck SeaWorld Parks and Entertainment. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00516>

Storelli, M. M., & Marcotrigiano, G. O. (2000). Environmental contamination in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): Relationship between levels of metals, methylmercury, and organochlorine compounds in an adult female, her neonate, and a calf. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *64*(3), 333–340. <https://doi.org/10.1007/S001280000004>

- Styer, E., Kita, S., & Menchaca, M. (2016). Ovary, Oogenesis, and Ovarian Cycle. *Reproductive Biology and Phylogeny of Cetacea*, 205–226. <https://doi.org/10.1201/B11001-10>
- Šuran, J., Đuras, M., Gomerčić, T., Bilandžić, N., & Prevendar Crnić, A. (2015). Cadmium and lead concentrations in the tissues of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded on the Croatian Adriatic coast. *Veterinarski Arhiv*, 85(6), 677–688.
- Thayer, V. G., Read, A. J., Friedlaender, A. S., Colby, D. R., Hohn, A. A., McLellan, W. A., Pabst, D. A., Dearolf, J. L., Bowles, N. I., Russell, J. R., & Rittmaster, K. A. (2003). Reproductive seasonality of western atlantic bottlenose dolphins off north carolina, u.s.a. *Marine Mammal Science*, 19(4), 617–629. <https://doi.org/10.1111/J.1748-7692.2003.TB01120.X>
- Urian, K. W., Duffield, D. A., Read, A. J., Wells, R. S., & Shell, E. D. (1996). Seasonality of Reproduction in Bottlenose Dolphins, *Tursiops truncatus*. *Journal of Mammalogy*, 77(2), 394–403. <https://doi.org/10.2307/1382814>
- van Bresse, M. F., Duignan, P. J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K. M., de Guise, S., di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K. R., Gulland, F.,

- Jensen, B. A., Jepson, P. D., Hall, A., Kuiken, T., ... Wellehan, J. F. X. (2014). Cetacean Morbillivirus: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses* 2014, Vol. 6, Pages 5145-5181, 6(12), 5145–5181. <https://doi.org/10.3390/V6125145>
- van Bresseem, M. F., Raga, J. A., di Guardo, G., Jepson, P. D., Duignan, P. J., Siebert, U., Barrett, T., de Oliveira Santos, M. C., Moreno, I. B., Siciliano, S., Aguilar, A., & van Waerebeek, K. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. In *Diseases of Aquatic Organisms* (Vol. 86, Issue 2, pp. 143–157). <https://doi.org/10.3354/dao02101>
- van Bresseem, M. F., Visser, I. K. G., de Swart, R. L., Örvell, C., Stanzani, L., Androukaki, E., Siakavara, K., & Osterhaus, A. D. M. E. (1993). Dolphin morbillivirus infection in different parts of the Mediterranean Sea. *Archives of Virology*, 129(1–4), 235–242. <https://doi.org/10.1007/BF01316898/METRICS>
- van Bresseem, M. F., Waerebeek, K. van, Jepson, P. D., Raga, J. A., Duignan, P. J., Nielsen, O., di Benedetto, A. P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P. S., López-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E., & Barrett, T. (2001). An insight into the epidemiology of

dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology*, 81(4), 287–304. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00368-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00368-6)

Walker. (1981). *T. truncatus*.

Waltzek, T. B., Cortés-Hinojosa, G., Wellehan, J. F. X., & Gray, G. C. (2012). Marine mammal zoonoses: A review of disease manifestations. In *Zoonoses and Public Health* (Vol. 59, Issue 8, pp. 521–535). <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01492.x>

Wells, R. S., & Scott, M. D. (2009). Common Bottlenose Dolphin: *Tursiops truncatus*. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 249–255. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00062-6>

Wells, R. S., & Scott, M. D. (2018). Bottlenose Dolphin, *Tursiops truncatus*, Common Bottlenose Dolphin. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 118–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804327-1.00072-8>

Wiley, D. N., Early, G., Mayo, C. A., & Moore, M. J. (2001). *Aquatic Mammals*. 27, 162–171.

Yordy, J. E., Wells, R. S., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Rowles, T. K., & Kucklick, J. R. (2010). Life history as a source of variation for persistent organic pollutant (POP) patterns in a community of common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) resident to Sarasota Bay, FL. *Science of The*

Total Environment, 408(9), 2163–2172.

<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.01.032>

Zhou, J. L., Salvador, S. M., Liu, Y. P., & Sequeira, M. (2001). Heavy metals in the tissues of common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded on the Portuguese coast. *Science of The Total Environment*, 273(1–3), 61–76.

[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00844-5](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00844-5)