



**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA  
Y PLAQUETARIA EN MAMÍFEROS MARINOS Y SUS  
ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL ESTRÉS,  
PATOLOGÍAS O CONTAMINANTES  
MEDIOAMBIENTALES.**



FUNDACIÓN  
OCEANOGRÁFIC



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACIONES



**MAR FELIPO BENAVENT**

**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**JUNIO, 2021**

**DIRECTORES:**

JOSE ENRIQUE O'CONNOR BLASCO  
ALICIA MARTINEZ ROMERO  
CONSUELO RUBIO GUERRI

**TUTOR:**

ANTONIO IRADI CASAL



# **CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN INMUNITARIA Y PLAQUETARIA EN MAMÍFEROS MARINOS Y SUS ALTERACIONES INDUCIDAS POR EL ESTRÉS, PATOLOGÍAS O CONTAMINANTES MEDIOAMBIENTALES.**



FUNDACIÓN  
OCEANOGRÁFIC



**MAR FELIPO BENAVENT**

**TESIS DOCTORAL**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGÍA  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA**

**JUNIO, 2021**

**DIRECTORES:**

**JOSE ENRIQUE O'CONNOR BLASCO  
ALICIA MARTINEZ ROMERO  
CONSUELO RUBIO GUERRI**

**TUTOR:**

**ANTONIO IRADI CASAL**

D. José Enrique O'Connor Blasco, Catedrático del Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València,

Dña Alicia Martínez Romero, Responsable del Servicio de Citómica del Centro de Investigación Príncipe Felipe,

D/Dña Consuelo Rubio Guerri, Profesor Colaborador Doctor del Dpto. de Farmacia de la Universidad Cardenal Herrera CEU de València,

**CERTIFICA/N:**

Que la presente memoria, titulada "Caracterización de la función inmunitaria y plaquetaria en mamíferos marinos y sus alteraciones inducidas por el estrés, patologías o contaminantes medioambientales", corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D/Dña. Mar Felipe Benavent, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firma/n el presente certificado en Valencia, a 19 de mayo de 2021.

Firmado por JOSE ENRIQUE  
O'CONNOR BLASCO -  
NIF:18911328S el día 25/05/2021 con  
un certificado emitido por ACCVCA-  
120



CONSUEL  
O|RUBIO|  
GUERRI

Firmado digitalmente por  
CONSUELO|  
RUBIO|GUERRI  
Fecha: 2021.05.19  
16:34:24 +02'00'

Fdo. José Enrique O'Connor Blasco

Fdo. Alicia Martínez Romero

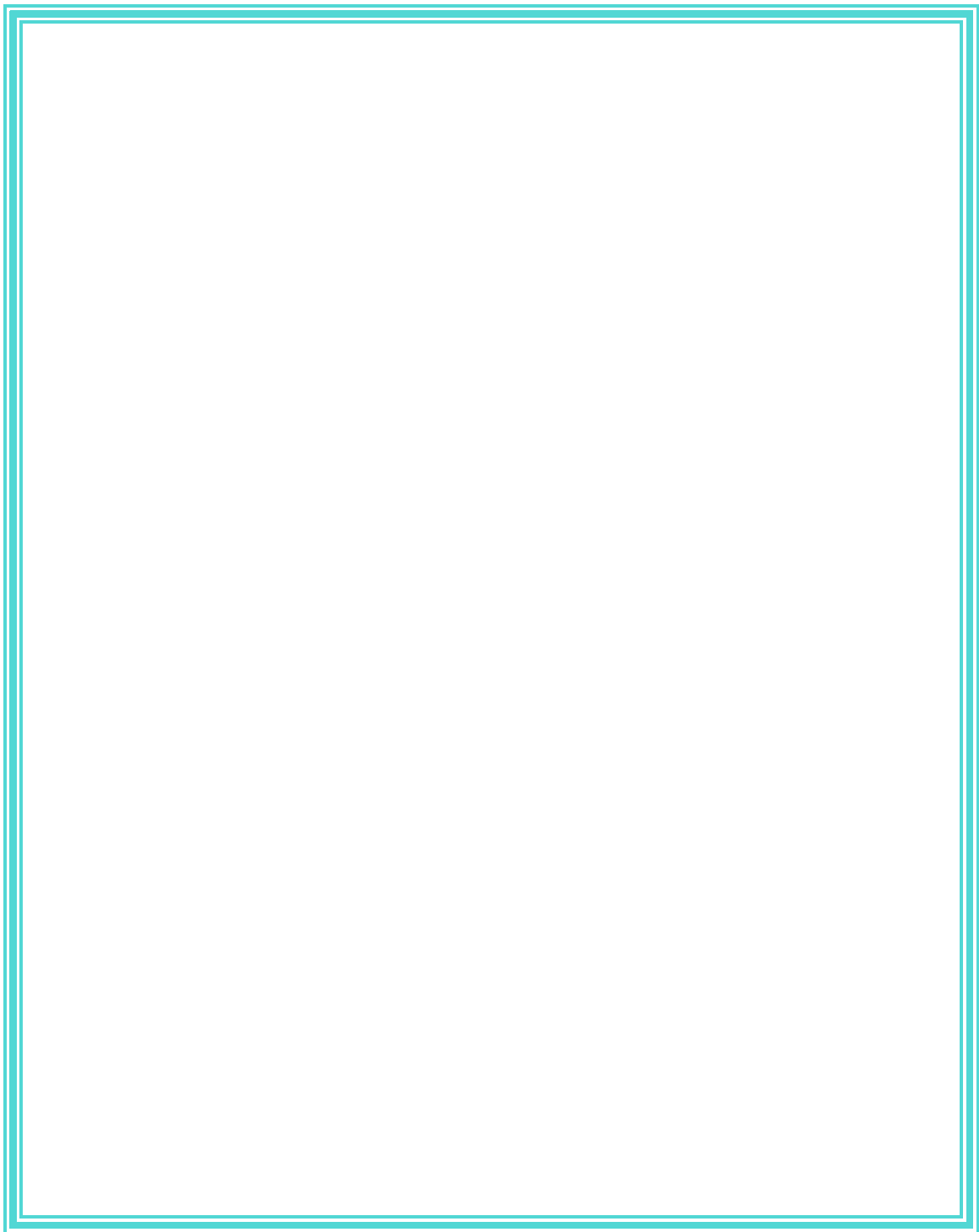
Fdo. Consuelo Rubio Guerri





# Agradecimientos

*A mi familia,*



No cabe duda de que estos años han sido intensos e inolvidables. Mi tesis, que ya parece ser un ente con vida propia, me ha obsequiado con experiencias imborrables, pero no ha dejado de lado su tarea principal, impulsar mi aprendizaje, ya no solo académico, sino vital. Mi tesis es muy considerada, realmente se ha preocupado de que yo aprenda cosas con ella durante nuestro no corto periodo de convivencia. Sí, tesis, lo has conseguido, y por eso tienes este rincón en tu propio apartado de agradecimientos.

Las dificultades no han sido pocas, las propias de una tesis normal y algunas añadidas...una pandemia mundial por nombrar alguna... Pero las recompensas han sido muchas. Quería hacer un doctorado especial y sin duda lo he tenido. Me siento afortunada por haber dedicado mi trabajo estos años a un tema tan bonito y que a mí personalmente me ha llegado tanto. No sé si este trabajo concienciará o no a quien lo lea, pero desde luego, investigando cada día y participando en los eventos de la Fundación, la que más se ha concienciado estos años he sido yo.

No puedo más que agradecer a mis directores de tesis su labor conmigo durante estos años.

Gracias, Enrique, en primer lugar, por introducirme tan amigablemente en el mundo de la citometría y por permitirme involucrarme en cada jornada, curso o congreso... Gracias por tu entusiasmo con el proyecto, por tus consejos y tus ideas originales y novedosas. Alicia, gracias por enseñarme a manejarme con esta técnica y por estar presente en el trabajo diario del proyecto. Ambos me habéis abierto los brazos al mundo de la citometría de flujo, antes desconocido para mí. A ti, Chelo, te tengo que agradecer el darme la gran oportunidad de entrar en el campo de la investigación en mamíferos marinos y otorgarme un tema de estudio tan bonito. Gracias por todas las grandes oportunidades que me has brindado (jamás pensé que trabajaría con delfines salvajes...), por tus consejos y ánimos estos años. Gracias también a mi tutor, Antonio Iradi, por su colaboración y disponibilidad siempre que lo he necesitado.

Debo agradecer a la Generalitat Valenciana el concederme la beca que me ha permitido realizar esta tesis. Por otro lado, quiero agradecer a la Fundación Oceanográfica el haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto y su inestimable apoyo. A Dani por aceptarme en vuestra gran familia oceanográfica y por ayudarnos siempre que lo hemos necesitado. A Andreas, por su amabilidad infinita conmigo y por darme la gran oportunidad de participar en el proyecto de Sarasota. A Teresa, Mónica, Carlos Rojo y Carlos Barros por vuestra valiosísima colaboración con el estudio. Esta tesis no existiría sin vosotros. De igual modo, quiero dar las gracias a todos los entrenadores que han participado en el proyecto porque habéis sido, como es evidente, esenciales. Muchas gracias a todos, veterinarios y entrenadores, por la paciencia y la ayuda todos estos años, y aún más por la comprensión y el esfuerzo que habéis hecho durante los últimos meses del proyecto.

A todas las personas con las que me he cruzado en el Oce, en la UV, o el CIPF, porque cada una me ha regalado algún momento bonito o me ha tendido la mano si lo he necesitado (Silvia, Elena, José Luís, Vicente, Bea, Pepa, Adri, Jose, Salva, Ana, Julieta, Javi, Albert y un largo etc...). Quiero darte las gracias especialmente, Ali, por ser mi hermanita doctoranda en el Oce, con la que he compartido mis frustraciones, mis alegrías, viajes estupendos... Qué bien me han hecho nuestras charlas y qué bien me lo paso contigo. También quiero hacer una mención especial a dos personas con las que no he trabajado a diario, pero a las que he cogido muchísimo cariño: Manuel Toharia, gracias por ser tan cariñoso siempre conmigo, me encantan nuestras charlas y aprender de ti. Ya sabes que este solo ha sido el principio de una gran amistad. Y Susana, gracias por regalarme tantísimas aventuras y por tu carácter alegre y maravilloso. Me hiciste sentir muy arropada a mi llegada ¡me lo pasaba pipa contigo! Tú también debes saber el cariño que te tengo y que algunos de los mejores momentos en mi periodo en el Oce han sido contigo. Gracias especiales también a Yaiza, por tu amistad, nuestras charlas y tu apoyo en los momentos difíciles.

Por otra parte, tengo que agradecer muchísimas cosas a mi familia, porque son el mayor apoyo y alegría de mi vida.

Quiero dar las gracias especialmente a mi padre, que ha estado conmigo durante todo el proceso, durante cada bache y cada satisfacción, animándome a seguir, a ser constante, a no rendirme y enseñándome a enfrentar todos los obstáculos que se me han ido presentando, tanto a nivel personal como profesional. Aparentemente siempre hemos tenido personalidades muy distintas, pero estos últimos años me he dado cuenta de todo lo que hay de ti en mí. Gracias por tus consejos y ayuda siempre, en la tesis y fuera de ella.

A mi madre, por tu increíble fortaleza durante estos años, que no están siendo nada fáciles. Gracias porque, aunque algunos días llegaras cansada a casa, siempre me has escuchado, aconsejado, abrazado o besado cuando lo he necesitado. Gracias por tu inmensa paciencia conmigo y por darme todo tu amor siempre.

A Ame, por ayudarme siempre que has podido y por darme tantos buenos consejos sobre la tesis basados en tu experiencia. Gracias por preocuparte por mí, por intentarme animar en los malos momentos y por cuidarme.

A mis cuatro yayos. Todo lo que haga siempre también os pertenecerá en parte a vosotros. Gracias por cuidarme, criarme y quererme con vuestro infinito amor, ya sea desde aquí o desde el cielo. Os quiero mucho.

A mis tetes, ata, tíos y tías, primas y primos, sobris de los que espero poder disfrutar bien pronto de nuevo... Simplemente gracias por estar conmigo siempre y por alegrarme tanto la vida.

Estos años también ha sido importantísimo el apoyo y cariño de grandes amigas.

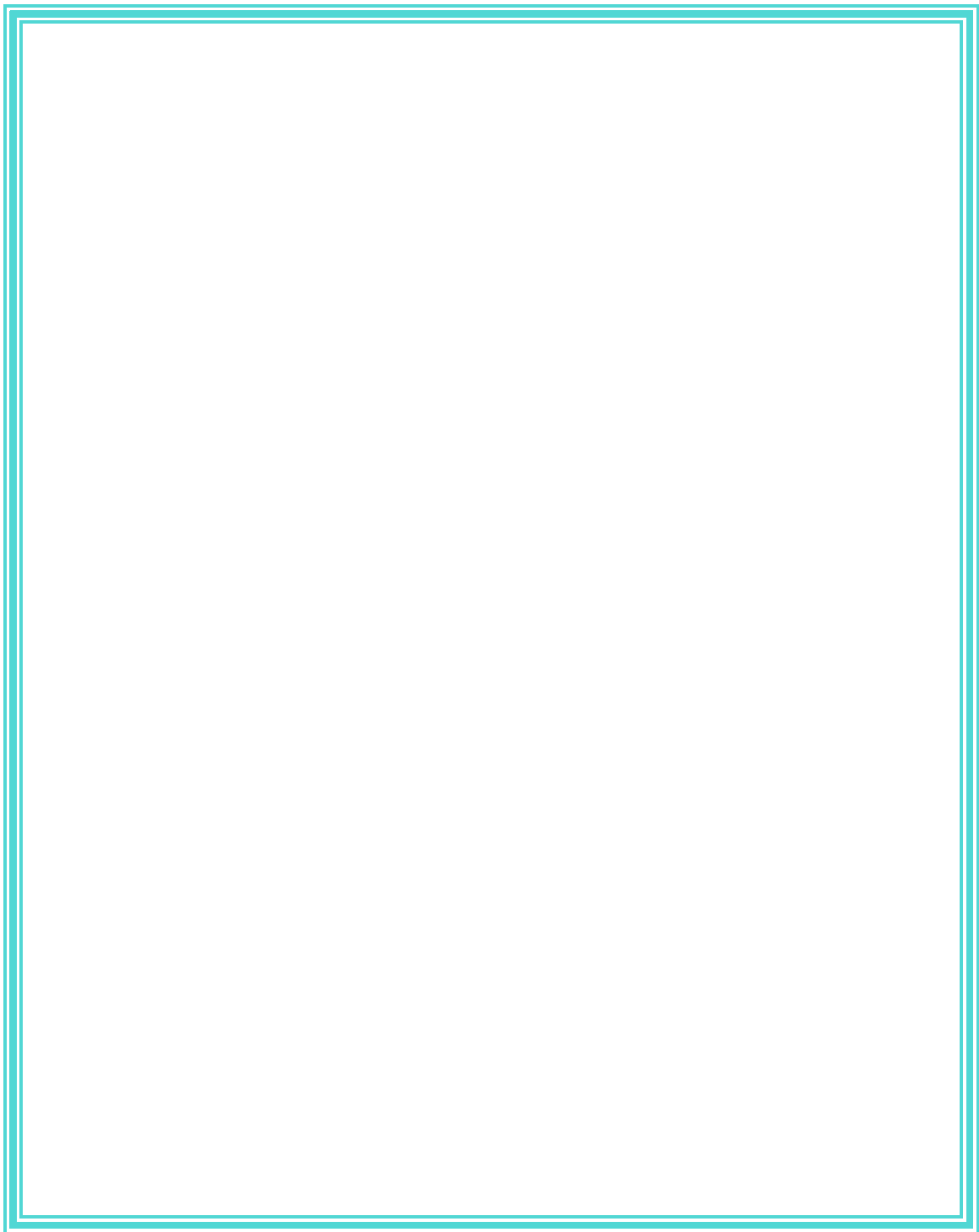
A María y Luisa, por vuestro infinito apoyo desde niñas, ya me siento vuestra trilliza. A Ángeles, mil gracias por estar presente y apoyando en cada bache y alegría de esta tesis sin excepción (¡los rollos que te has tragado, amiga!). Sonia, por tu paciencia y apoyo incondicional siempre. Roci, Eva (no sabes cuán sanadores eran nuestros miércoles), Sami, Jenny, Celia y Ele, por animarme y ayudarme en todo lo posible siempre. Gracias a todas por estar siempre ahí, en las duras y en las maduras. No puedo dejarme a las dos personas con las que comenzó (sin saberlo) esta aventura oceanográfica: Sara y Marta, porque vosotras fuisteis el primer capítulo de esta experiencia, antes de que pensara si quiera en hacer un doctorado. Vivan las risas, el acetato y la tortuga número 12.

Por último, y aunque ellos no me entiendan, no puedo terminar sin nombrar a los delfines, belugas, morsas, leones y foquitas, que desinteresadamente (bueno, a cambio de unos pescaditos a veces) ¡han ayudado y dado tanto sin darse cuenta!

Gracias a todos,

Mar





## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

3-4

Objetivos

4-5

## INTRODUCCIÓN

**1. Problemática de la influencia humana, el estrés o las patologías sobre el Sistema Inmunitario de los mamíferos marinos.**

9-30

**1.1 Influencia humana sobre los ecosistemas.**

9-11

**1.2 Monitorización del ecosistema marino mediante el estudio de especies centinela.**

11

**1.3 Los mamíferos marinos: Características biológicas, distribución y riesgos de las especies bajo estudio.**

11-18

1.3.1 Cetáceos odontocetos

13-15

1.3.1.1 Delfín mular (*Tursiops truncatus*)

13-14

1.3.1.2 Beluga (*Delphinapterus leucas*)

14-15

1.3.2 Pinnípedos

15-18

1.3.2.1 Morsa (*Odobenus rosmarus*)

15-16

1.3.2.2 Foca común (*Phoca vitulina*)

16-17

1.3.2.3 León marino sudamericano (*Otaria flavescens*).

17-18

**1.4. Principales amenazas antropogénicas a las que se enfrentan los mamíferos marinos y sus consecuencias sobre el bienestar animal**

19-30

1.4.1 Exposición a contaminantes ambientales.

19-23

1.4.2 Bycatch.

23-25

1.4.3 Contaminación acústica.

25-27

1.4.4 Calentamiento global.

27-30

**2. El sistema inmunitario y la homeostasia en mamíferos marinos: Relevancia en estudios de toxicidad y en el control sanitario de animales en cautividad.**

31-61

**2.1. El sistema inmunitario y sus respuestas.**

31-47

2.1.1. Respuesta inmunitaria innata

31-40

2.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida.

40-44

2.1.3. Bioenergética de las células inmunitarias.

44-47

2.1.4. La apoptosis como mecanismo regulador de la función inmunitaria.

47

**2.2. La funcionalidad plaquetaria y su papel en la homeostasia.**

48-54

2.2.1. Adhesión de la plaqueta a la matriz subendotelial.

48

2.2.2 Activación plaquetaria.

48-54

2.2.2.1 Transducción de señales en la activación plaquetaria.

48-52

2.2.2.2 Cambio de forma de la plaqueta

52

2.2.2.3 Agregación plaquetaria

52-53

|   |               |
|---|---------------|
| 2.2.2.4. Secreción de sustancias almacenadas en los gránulos.   | 53            |
| 2.2.2.5. Expresión de actividad procoagulante y liberación de micropartículas.  | 53-54         |
| <b>2.3. Infección y estrés en mamíferos marinos: Consecuencias sobre la función inmunitaria y la hemostasia.</b>                                      | <b>54-58</b>  |
| 2.3.1 Principales patologías infecciosas en mamíferos marinos.  | 54-55         |
| 2.3.2. Estrés e inmunosupresión en mamíferos.   | 55-57         |
| 2.3.3. Medicina preventiva y nuevos bioindicadores de estrés crónico.   | 57-58         |
| <b>2.4. Conservación del medio marino: Efecto de contaminantes ambientales sobre la función inmunitaria y la hemostasia de los mamíferos marinos.</b> | <b>58-61</b>  |
| 2.4.1. Contaminantes modelo para estudios de toxicidad in vitro: Características y mecanismos   | 59-61         |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>   |               |
| <b>1. Sujetos incluidos en el estudio.</b>  | <b>65-72</b>  |
| <b>1.1 Delfín mular (<i>Tursiops truncatus</i>)</b>   | <b>65-69</b>  |
| 1.1.1 Delfines bajo cuidado humano.   | 65-66         |
| 1.1.2 Delfines salvajes sanos y 1.1.3 varados.  | 67-69         |
| <b>1.2 Beluga (<i>Delphinapterus Leucas</i>)</b>  | <b>70</b>     |
| <b>1.3 Morsa (<i>Odobenus Rosmarus</i>)</b>   | <b>70-71</b>  |
| <b>1.4 Foca común (<i>Phoca vitulina</i>)</b>   | <b>71</b>     |
| <b>1.5 León marino (<i>Otaria flavescens</i>)</b>   | <b>72</b>     |
| <b>2. Toma de muestras.</b>   | <b>73-77</b>  |
| <b>2.1 Extracción de sangre y obtención de plasma.</b>  | <b>73-76</b>  |
| 2.1.1 Extracción de sangre.   | 73-76         |
| 2.1.2 Obtención de plasma.  | 76            |
| <b>2.2 Obtención y procesamiento de tejidos de animales varados.</b>  | <b>76-77</b>  |
| <b>3. Reactivos, tóxicos, soluciones y medios de cultivo.</b>   | <b>77-81</b>  |
| <b>3.1 Fluorocromos.</b>  | <b>77-79</b>  |
| <b>3.2 Anticuerpos monoclonales y kits comerciales.</b>   | <b>79</b>     |
| <b>3.3 Reactivos.</b>   | <b>79-80</b>  |
| <b>3.4 Tóxicos</b>  | <b>80</b>     |
| <b>3.5 Tampones y soluciones</b>  | <b>80-81</b>  |
| <b>3.6 Medios de cultivo</b>  | <b>81</b>     |
| <b>4. Caracterización de la funcionalidad y viabilidad inmunitaria, estado redox basal y función mitocondrial en leucocitos de animales sanos.</b>    | <b>81-109</b> |
| <b>4.1 Citometría de flujo.</b>   | <b>82-83</b>  |
| <b>4.2 Análisis de la funcionalidad inmunitaria en animales sanos.</b>  | <b>84-108</b> |



|   |                |
|---|----------------|
| 4.2.1 Evaluación de la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.  | 84-97          |
| 4.2.1.1 Adaptación del Kit Ingoflow para la determinación de la capacidad de fagocitosis in vitro.  | 85-90          |
| 4.2.1.2 Adaptación del Kit Ingoflow para la determinación de la fagocitosis y el estallido respiratorio in vitro.   | 90-93          |
| 4.2.1.3 Adaptación del Kit Fagoflow para la determinación de la producción del estallido respiratorio in vitro.   | 94-97          |
| 4.2.2 Evaluación de la capacidad proliferativa de los linfocitos T.   | 98-100         |
| 4.2.3 Detección de citoquinas extracelulares.   | 100-102        |
| 4.2.4 Análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM) en sangre periférica.   | 102-104        |
| 4.2.5 Análisis de apoptosis y necrosis celular en sangre periférica.  | 105-108        |
| <b>4.3 Establecer un rango de valores de referencia para la capacidad fagocítica, el estado redox y el potencial de membrana mitocondrial fisiológicos en animales sanos de cada especie.</b> | <b>108-109</b> |
| <b>5. Caracterización de la funcionalidad plaquetaria en animales sanos.</b>  | <b>109-125</b> |
| <b>5.1 Evaluación de la activación plaquetaria a través del estudio de dos de sus fases en animales sanos.</b>  | <b>109-122</b> |
| 5.1.1 Identificación de un marcador plaquetario en mamíferos marinos adecuado para citometría de flujo.   | 109-110        |
| 5.1.2 Estudio de la movilización de calcio intraplaquetario.  | 110-115        |
| 5.1.3 Expresión de la superficie procoagulante y liberación de micropartículas plaquetarias (MPPs).   | 115-122        |
| <b>5.2 Detección de los niveles de plaquetas reticuladas.</b>   | <b>122-124</b> |
| <b>5.3 Establecimiento de un rango de valores de referencia para cada parámetro de función plaquetaria en animales sanos de cada especie.</b>   | <b>125</b>     |
| <b>6. Evaluación de las alteraciones inducidas por contaminantes ambientales en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de mamíferos marinos.</b>  | <b>126-129</b> |
| <b>6.1 Procesamiento de las muestras para la detección de contaminantes.</b>  | <b>126-129</b> |
| 6.1.1 Procesamiento de las muestras de sangre periférica, plasma sanguíneo y tejidos.   | 126-127        |
| 6.1.2 Tratamiento in vitro de sangre periférica con tóxicos.  | 127-129        |
| <b>7. Evaluación de las alteraciones inducidas por estrés crónico en la funcionalidad inmunitaria de mamíferos marinos.</b>   | <b>130-131</b> |
| <b>8. Evaluación de las alteraciones inducidas por patologías en la funcionalidad inmunitaria o plaquetaria de mamíferos marinos.</b>   | <b>131</b>     |
| <b>9. Análisis estadístico.</b>   | <b>131</b>     |

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|   |                |
|---|----------------|
| <b>1. Evaluación de la funcionalidad inmunitaria en animales sanos.</b>   | <b>135-145</b> |
| <b>1.1 Capacidad fagocítica fisiológica en animales sanos.</b>  | <b>135-140</b> |
| 1.1.1 Puesta a punto de nuevos protocolos para la evaluación de la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos en mamíferos marinos. | 135-136        |
| 1.1.2 Valores fisiológicos de capacidad fagocítica en animales sanos.   | 136-140        |
| 1.1.2.1 Delfines mulares ( <i>Tursiops truncatus</i> )  | 136-138        |
| 1.1.2.2 Belugas ( <i>Delphinapterus leucas</i> )  | 138            |
| 1.1.2.3 Morsas ( <i>Odobenus rosmarus</i> )   | 139            |
| 1.1.2.4 Leones marinos ( <i>Otaria flavescens</i> )   | 139            |
| 1.1.2.5 Foca ( <i>Phoca vitulina</i> )  | 140            |
| 1.1.3 Diferencias en la capacidad fagocítica de mamíferos marinos de diferentes especies.   | 140            |
| <b>1.2 Estado redox fisiológico de los leucocitos en animales sanos.</b>  | <b>140-143</b> |
| 1.2.1 Puesta a punto del protocolo para la evaluación del estado redox leucocitario en mamíferos marinos.                                 | 140            |
| 1.2.2 Estado redox fisiológico en monocitos y granulocitos de animales sanos.   | 140-143        |
| 1.2.2.1 Delfines mulares ( <i>Tursiops truncatus</i> )  | 140-141        |
| 1.2.2.2 Belugas ( <i>Delphinapterus leucas</i> )  | 141            |
| 1.2.2.3 Morsas ( <i>Odobenus rosmarus</i> )   | 142            |
| 1.2.2.4 Leones marinos ( <i>Otaria flavescens</i> )   | 142            |
| 1.2.3 Diferencias en el estado redox leucocitario entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.                     | 142-143        |
| <b>1.3 Potencial de membrana mitocondrial de los leucocitos en animales sanos.</b>  | <b>143-145</b> |
| 1.3.1 Puesta a punto de un nuevo protocolo para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (PMM) en mamíferos marinos.          | 143            |
| 1.3.2 Valores fisiológicos de potencial de membrana mitocondrial leucocitario en animales sanos.  | 143-145        |
| <b>2. Evaluación de la funcionalidad plaquetaria en animales sanos.</b>   | <b>146-174</b> |
| <b>2.1 Puesta a punto de nuevos protocolos para la evaluación de la funcionalidad plaquetaria en mamíferos marinos.</b>                   | <b>146-148</b> |
| 2.1.1 Estudio de la movilización del calcio intraplaquetario en mamíferos marinos.  | 146-147        |
| 2.1.2 Estudio de la expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas en mamíferos marinos.                                   | 147            |
| 2.1.3 Detección de plaquetas reticuladas en mamíferos marinos.  | 147-148        |
| <b>2.2 Valores fisiológicos de funcionalidad plaquetaria en animales sanos.</b>   | <b>148-174</b> |
| 2.2.1 Movilización de calcio intraplaquetario en animales sanos.  | 148-160        |
| 2.2.1.1 Delfines mulares ( <i>Tursiops truncatus</i> )  | 148-157        |
| 2.2.1.2 Belugas ( <i>Delphinapterus leucas</i> )  | 157-158        |
| 2.2.1.3 Morsas ( <i>Odobenus rosmarus</i> )   | 159            |
| 2.2.1.4 Leones marinos ( <i>Otaria flavescens</i> )   | 159-160        |
| 2.2.1.5 Foca ( <i>Phoca vitulina</i> )  | 160            |

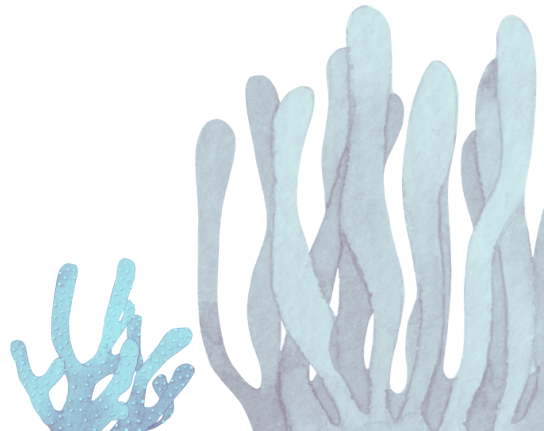
|   |                |
|---|----------------|
| 2.2.2 Diferencias en la movilización de calcio intrplaquetario entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.                        | 161-166        |
| 2.2.3 Expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas en animales sanos.  | 167-169        |
| 2.2.3.1 Delfines mulares ( <i>Tursiops truncatus</i> )  | 167            |
| 2.2.3.2 Belugas ( <i>Delphinapterus leucas</i> )  | 168            |
| 2.2.3.3 Morsas ( <i>Odobenus rosmarus</i> )   | 168-169        |
| 2.2.3.4 Leones marinos ( <i>Otaria flavescens</i> )   | 169            |
| 2.2.3.5 Foca ( <i>Phoca vitulina</i> )  | 169            |
| 2.2.4 Diferencias en la expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies. | 170            |
| 2.2.5 Fracción de plaquetas inmaduras (FPI) en animales sanos.  | 171-173        |
| 2.2.5.1 Delfines mulares ( <i>Tursiops truncatus</i> )  | 171-173        |
| 2.2.5.2 Belugas ( <i>Delphinapterus leucas</i> )  | 173            |
| 2.2.4 Diferencias entre la fracción de plaquetas inmaduras (%FPI) de mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.                        | 173-174        |
| <b>3. Efectos del estrés en la función inmunitaria y plaquetaria de los delfines.</b>   | <b>174-179</b> |
| <b>3.1 Estudio etológico.</b>   | <b>174-175</b> |
| <b>3.2 Relación entre el estrés crónico y la función fagocítica y plaquetaria de los animales.</b>  | <b>175-179</b> |
| 3.2.1 Relación entre el estrés crónico y la función fagocítica en delfines  | 175-177        |
| 3.2.2 Relación entre el estrés crónico y la función plaquetaria en delfines.  | 177-179        |
| <b>4. Evaluación de la función inmunitaria y plaquetaria en animales enfermos. Casos clínicos.</b>  | <b>179-189</b> |
| <b>4.1 Nala, delfina con infección fúngica respiratoria recurrente.</b>   | <b>179-180</b> |
| <b>4.2 Pfizer, animal con inmunodepresión y posterior cuadro digestivo por levaduras.</b>   | <b>180-181</b> |
| <b>4.3 Kuni, cría de delfín diagnosticada de cistitis hemorrágica.</b>  | <b>181-182</b> |
| <b>4.4 Nika, delfina adulta con infección vírica.</b>   | <b>182</b>     |
| <b>4.5 Apolo, delfín adulto con gastritis hemorrágica derivada de estrés crónico.</b>   | <b>183-185</b> |
| <b>4.6 Patrick, león marino con enteritis hemorrágica por cuerpo extraño.</b>   | <b>186-188</b> |
| <b>4.7 Lazo, delfín con gastritis ulcerativa hemorrágica.</b>   | <b>188</b>     |
| <b>4.8 Delfín salvaje varado enfermo en la costa valenciana.</b>  | <b>189</b>     |
| <b>5. Efectos in vitro de los contaminantes ambientales sobre la función inmunitaria y plaquetaria de delfines mulares.</b>                               | <b>189-242</b> |
| <b>5.1 Detección de contaminantes en diferentes matrices de delfines.</b>   | <b>189-194</b> |
| 5.1.1 Detección de compuestos de uso humano en tejidos de delfín.   | 189-190        |
| 5.1.2 Detección de metales pesados en sangre entera o plasma de delfín.   | 190-194        |
| <b>5.2 Efectos de los contaminantes en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines mulares.</b>  | <b>194-242</b> |

# ÍNDICE

|   |         |
|---|---------|
| 5.2.1 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines.                                | 194-209 |
| 5.2.1.1 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad inmunitaria.  | 194-199 |
| 5.2.1.2 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad plaquetaria.  | 199-208 |
| 5.2.2 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines sanos.                           | 209-219 |
| 5.2.2.1 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad inmunitaria.   | 209-213 |
| 5.2.2.2 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad plaquetaria  | 213-219 |
| 5.2.3 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines sanos.                          | 219-229 |
| 5.2.3.1 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad inmunitaria   | 219-222 |
| 5.2.3.2 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad plaquetaria.  | 223-230 |
| 5.2.4 Efectos del paracetamol (acetaminofén) sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines.                | 230-241 |
| 5.2.4.1 Efectos del paracetamol sobre la funcionalidad inmunitaria  | 230-237 |
| 5.2.4.2 Efectos del paracetamol sobre la funcionalidad plaquetaria.   | 237-241 |
| Tabla Resumen efectos ibuprofeno, cafeína, aspirina y paracetamol sobre la función inmunitaria y plaquetaria en delfines. | 242     |

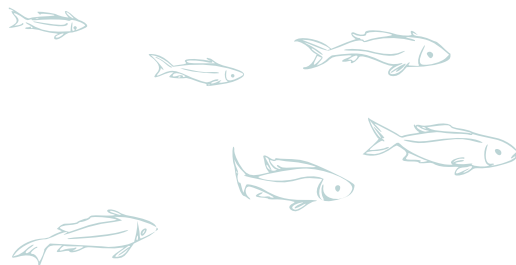
# LISTA DE ABREVIATURAS

**AA:** ácido araquidónico  
**ACTH:** hormona adrenocorticotropa o corticotropina  
**ADP:** Adenosina 5'-difosfato monopotasio  
**AIF:** factor inductor de apoptosis  
**AINE:** antiinflamatorio no esteroideo  
**AMP:** adenosín monofosfato  
**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico  
**ARE:** elemento de respuesta antioxidante  
**ATP:** adenosín trifosfato  
**BCH:** Bajo cuidado humano  
**BCR:** receptor antigénico de los linfocitos B  
**CD62-L:** selectina L  
**CD62-P:** glicoproteína selectina-P  
**CIPF:** Centro de investigación Príncipe Felipe  
**Con A:** concanavalina A  
**COX:** ciclooxigenasa  
**CPA:** células presentadoras de antígeno  
**CRH:** hormona liberadora de corticotropina  
**DAG:** diacilglicerol  
**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol  
**DHR:** dihidrorrodamina  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**ECD:** ficoeritrina-Texas Red conjugado  
**FAU:** unidades arbitrarias de fluorescencia  
**FITC:** fluoresceína  
**FPI:** fracción de plaquetas inmaduras  
**FSC:** forward scatter  
**FSC-A:** forward scatter area  
**FSC-H:** forward scatter altura  
**GPRP:** Gly-Pro-Arg-Pro  
**HE:** hidroetidina  
**HO33342:** BisBenzimida Ho 33342 triidrocloreuro o Hoechst 33342  
**IACUC:** Mote Marine Laboratory Institutional Animal Care and Use Committee  
**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma  
**Ig:** inmunoglobulina  
**IL:** interleuquina  
**IMF:** intensidad media de fluorescencia  
**IP3:** inositol-1,4,5-trifosfato  
**LFA-1:** integrina CD11a/CD18  
**MHC:** las moléculas de histocompatibilidad  
**MNCs:** células mononucleares  
**MPO:** mieloperoxidasa  
**MPPs:** micropartículas plaquetarias  
**NK:** Natural Killers  
**NLR:** receptores tipo NOD



# LISTA DE ABREVIATURAS

**NO:** óxido nítrico  
**NOAA- NCEI:** National Centers for Environmental Informatio  
**NOS2:** óxido nítrico sintasa 2  
**NOX:** enzima NADPH oxidasa  
**PAF:** factor de activación plaquetario  
**PAMP:** Patrones moleculares asociados con los microorganismos invasores  
**PB450:** Pacific blue 450  
**PCB:** bifenilos policlorados  
**PDE:** enzima fosfodiesterasa  
**PE:** ficoeritrina  
**PFA:** Paraformaldehído  
**PG:** Prostaglandina  
**PI:** yoduro de propidio  
**PL:** fosfolipasa  
**PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate  
**PMM:** Potencial de membrana mitocondrial  
**PPTM:** poro de permeabilidad transitoria mitocondrial  
**PS:** fosfatidilserina  
**RH:** rodamina  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**SOD:** superóxido dismutasa  
**SSC:** side scatter  
**Tc:** linfocitos T citotóxicos  
**TCR:** receptor de unión al antígeno de los linfocitos T  
**Th:** linfocitos T colaboradores  
**TLR:** receptores de tipo Toll  
**TMRM:** tetrametilrodamina  
**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral  
**TO:** naranja de tiazol  
**Tx:** tromboxano  
**USF:** Univeridad South-Florida  
**VDAC:** voltage-dependient anion channel  
**VDC Green:** Vybrant Dye Cycle Green  
**VSSC:** violeteta side scatter  
**vWF:** factor de Von Willebrand



## FIGURAS

|   |       |
|---|-------|
| <i>Figura 1. Delfín. Distribución geográfica.</i>                                   | 14    |
| <i>Figura 2. Beluga. Distribución geográfica.</i>                                   | 15    |
| <i>Figura 3. Morsa. Distribución geográfica.</i>                                    | 16    |
| <i>Figura 4. Foca. Distribución geográfica.</i>                                     | 17    |
| <i>Figura 5. León marino. Distribución geográfica.</i>                              | 18    |
| <i>Figura 6. Cadena trófica ecosistema marino.</i>                                  | 21    |
| <i>Figura 7. Bycatch.</i>   | 23    |
| <i>Figura 8. Emisión GEI.</i>   | 28    |
| <i>Figura 9. Activación leucocitos.</i>   | 34    |
| <i>Figura 10. Rodadura y adhesión de los neutrófilos al endotelio.</i>              | 35    |
| <i>Figura 11. Diapedesis.</i>   | 36    |
| <i>Figura 12. Vasodilatación, enrojecimiento y edema.</i>                           | 36    |
| <i>Figura 13. Activación fagocito, quimiotaxis y adhesión al patógeno.</i>          | 37    |
| <i>Figura 14. Opsonización.</i>   | 38    |
| <i>Figura 15. Resumen del proceso de fagocitosis.</i>                               | 39    |
| <i>Figura 16. Fases del estallido respiratorio.</i>                                 | 40    |
| <i>Figura 17. Exposición de los antígenos peptídicos a través de la MHC II.</i>     | 41    |
| <i>Figura 18. Diferenciación de los Linfocitos Th en Th1 y Th2 y sus funciones.</i> | 43    |
| <i>Figura 19. Proliferación de los linfocitos B.</i>                                | 44    |
| <i>Figura 20. Fosforilación oxidativa.</i>  | 45    |
| <i>Figura 21. Componentes del PPTM.</i>   | 46    |
| <i>Figura 22. Procesos principales en la activación plaquetaria.</i>                | 50    |
| <i>Figura 23. Movilización de calcio intraplaquetario.</i>                          | 51    |
| <i>Figura 24. Expresión de la PS y liberación de MPPs.</i>                          | 54    |
| <i>Figura 25. Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.</i>                               | 56    |
| <i>Figura 26. Muestreos de agua Brumovský et al., 2017.</i>                         | 60    |
| <i>Figura 27. Sarasota Dolphin Health Assessment.</i>                               | 68    |
| <i>Figura 28. Extracción sangre pinnípedos.</i>                                     | 74    |
| <i>Figura 29. Extracción sangre cetáceos.</i>                                       | 75    |
| <i>Figura 30. Asistencia y necropsia de delfines varados.</i>                       | 77    |
| <i>Figura 31. Sistema fluídico del citómetro de flujo.</i>                          | 82    |
| <i>Figura 32. Punto de interrogación citómetro de flujo.</i>                        | 83    |
| <i>Figura 33. Protocolo adaptado a mamíferos marinos con IngoflowEx.</i>            | 88    |
| <i>Figura 34. Análisis resultados IngoflowEx.</i>                                   | 90    |
| <i>Figura 35. Análisis resultados IngoflowEx y hidroetidina.</i>                    | 92-93 |
| <i>Figura 36. Protocolo adaptado a mamíferos marinos con FagoflowEx.</i>            | 96    |
| <i>Figura 37. Análisis resultados FagoflowEx.</i>                                   | 97    |
| <i>Figura 38. Aislamiento de los linfocitos por gradiente de densidad.</i>          | 98    |
| <i>Figura 39. Portaobjetos Kit citoquinas.</i>                                      | 101   |
| <i>Figura 40. Fundamento del Kit Quantibody® Dolphin Cytokine Array 1.</i>          | 101   |
| <i>Figura 41. Protocolo adaptado a mamíferos marinos para evaluar PMM.</i>          | 103   |
| <i>Figura 42. Análisis PMM por citometría de flujo.</i>                             | 104   |
| <i>Figura 43. Proceso de apoptosis y necrosis secundaria.</i>                       | 105   |
| <i>Figura 44. Protocolo para evaluar viabilidad, apoptosis y necrosis celular.</i>  | 106   |

## FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| <i>Figura 45. Análisis por citometría de flujo de la viabilidad, apoptosis y necrosis celular.</i>   | 107 |
| <i>Figura 46. Marcaje de las plaquetas con anticuerpo frente a CD41.</i>   | 110 |
| <i>Figura 47. Análisis cinético de la movilización de calcio intraplaquetario 1.</i>   | 113 |
| <i>Figura 48. Análisis cinético de la movilización de calcio intraplaquetario 2.</i>   | 114 |
| <i>Figura 49. Análisis por citometría de las MPPs basales en sangre 1.</i>   | 117 |
| <i>Figura 50. Análisis por citometría de las MPPs basales en sangre 2.</i>   | 118 |
| <i>Figura 51. Análisis cinético de la exposición de PS y liberación de MPPs 1.</i>   | 119 |
| <i>Figura 52. Análisis cinético de la exposición de PS y liberación de MPPs 2.</i>   | 121 |
| <i>Figura 53. Análisis por citometría de flujo de plaquetas reticuladas.</i>   | 124 |
| <i>Figura 54. Comparación estadística entre la capacidad fagocítica de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.</i>                               | 137 |
| <i>Figura 55. Comparación entre especies del estado redox basal de monocitos y granulocitos.</i>   | 143 |
| <i>Figura 56. Comparación entre el PMM de delfines salvajes y bajo cuidado humano.</i>   | 145 |
| <i>Figura 57. Diferencias en la IMF del Fluo-4 en los puntos basal, máximo y final entre delfines salvajes y bajo cuidado humano.</i>                      | 154 |
| <i>Figura 58. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo al activar las plaquetas en delfines salvajes y bajo cuidado humano.</i>       | 155 |
| <i>Figura 59. Evolución de la IMF del Fluo-4 en el tiempo en las diferentes especies bajo cuidado humano.</i>  | 163 |
| <i>Figura 60. Ejemplo de la morfología de la curva que describe la concentración de calcio citosólico al estimular con ADP en las diferentes especies.</i> | 166 |
| <i>Figura 61. Diferencias en el porcentaje de plaquetas inmaduras entre delfines salvajes y bajo cuidado humano.</i>                                       | 172 |
| <i>Figura 62. Diferencias en la capacidad fagocítica entre los animales con más y menos estrés.</i>  | 177 |
| <i>Figura 63. Diferencias en la activación plaquetaria entre los animales con más y menos estrés.</i>  | 178 |
| <i>Figura 64. Caso clínico infección fúngica respiratoria recurrente.</i>  | 180 |
| <i>Figura 65. Caso clínico inmunodepresión y posterior cuadro digestivo.</i>   | 181 |
| <i>Figura 66. Caso clínico cistitis hemorrágica.</i>   | 182 |
| <i>Figura 67. Caso clínico infección vírica.</i>   | 182 |
| <i>Figura 68. Caso clínico estrés y gastritis (capacidad fagocítica).</i>  | 183 |
| <i>Figura 69. Caso clínico estrés y gastritis (PMM).</i>   | 184 |
| <i>Figura 70. Curva de calcio citosólico en caso clínico de león marino con hemorragia.</i>  | 186 |
| <i>Figura 71. FPI en caso clínico de león marino con hemorragia.</i>   | 188 |
| <i>Figura 72. Caso clínico gastritis ulcerativa hemorrágica.</i>   | 188 |
| <i>Figura 73. Efectos del ibuprofeno en la viabilidad celular.</i>   | 195 |
| <i>Figura 74. Efectos del ibuprofeno en la capacidad fagocítica.</i>   | 196 |
| <i>Figura 75. Efecto inhibitor sobre la COX-2 del ibuprofeno.</i>  | 197 |



## FIGURAS

|  |     |
|--|-----|
| <i>Figura 76. Efectos del ibuprofeno sobre el estado redox celular.</i>  | 198 |
| <i>Figura 77. Efectos de la exposición aguda al ibuprofeno sobre la movilización del calcio intraplaquetario.</i>  | 200 |
| <i>Figura 78. Aumento de calcio citosólico en las plaquetas al activarlas con ADP en las muestras control y expuestas al ibuprofeno durante 24 h.</i>                                  | 201 |
| <i>Figura 79. Reducción de la velocidad de recaptación del calcio citosólico en muestras expuestas al ibuprofeno durante 24h.</i>  | 202 |
| <i>Figura 80. Reducción de la concentración final de calcio citosólico en muestras expuestas al ibuprofeno durante 24h.</i>  | 203 |
| <i>Figura 81. Representación gráfica de la evolución de la concentración de calcio citosólico en el tiempo en la muestra control y en las muestras expuestas a ibuprofeno.</i>         | 203 |
| <i>Figura 82. La exposición aguda a ibuprofeno redujo de forma significativa la traslocación de la PS a la cara externa de la membrana plaquetaria.</i>                                | 204 |
| <i>Figura 83. El ibuprofeno redujo la velocidad de exposición de PS por parte de las plaquetas.</i>  | 205 |
| <i>Figura 84. El ibuprofeno redujo la exposición de PS a la cara externa de la membrana plaquetaria a punto final.</i>   | 206 |
| <i>Figura 85. Cambios en el tiempo en la exposición de la PS a la cara externa de la membrana plaquetaria en las muestras control y las tratadas de forma aguda con el ibuprofeno.</i> | 206 |
| <i>Figura 86. Exposición de PS al estimular las plaquetas expuestas a ibuprofeno.</i>  | 207 |
| <i>Figura 87. Mecanismo de acción por el cual el ibuprofeno inhibe la activación plaquetaria.</i>  | 208 |
| <i>Figura 88. La cafeína aumentó la producción de ROS durante el estallido respiratorio.</i>   | 209 |
| <i>Figura 89. Los receptores A1 de adenosina potencian la fagocitosis, mientras que los receptores A2a la inhiben.</i>   | 210 |
| <i>Figura 90. La cafeína redujo el estrés oxidativo basal de las células fagocíticas.</i>  | 212 |
| <i>Figura 91. La cafeína produjo una disminución dosis-dependiente en el aumento de calcio citosólico tras activar las plaquetas.</i>  | 214 |
| <i>Figura 92. La cafeína redujo la velocidad de recaptación del calcio desde el citosol.</i>   | 215 |
| <i>Figura 93. Representación gráfica de la evolución de la concentración de calcio citosólico en el tiempo en la muestra control y en las muestras expuestas a cafeína.</i>            | 215 |
| <i>Figura 94. La cafeína redujo de forma significativa la concentración final de calcio citosólico en la plaqueta.</i>   | 216 |
| <i>Figura 95. Representación gráfica de la pendiente positiva de IMF de Anexina-V en el tiempo en los controles y en las muestras expuestas a cafeína.</i>                             | 217 |

## FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| <i>Figura 96. La cafeína redujo significativamente la velocidad de exposición de PS y liberación de MPPs.</i>   | 217 |
| <i>Figura 97. La aspirina aumentó significativamente el PMM de los leucocitos.</i>  | 220 |
| <i>Figura 98. La aspirina redujo la capacidad fagocítica de los leucocitos.</i>   | 220 |
| <i>Figura 99. La aspirina aumentó el estrés oxidativo basal en leucocitos.</i>  | 222 |
| <i>Figura 100. La aspirina redujo significativamente el recuento de plaquetas por <math>\mu\text{L}</math> de sangre.</i>   | 223 |
| <i>Figura 101. Proceso por el cual la aspirina induce la muerte de las plaquetas.</i>   | 224 |
| <i>Figura 102. La exposición aguda a la aspirina redujo de forma estadísticamente significativa el tiempo de activación de las plaquetas.</i>   | 225 |
| <i>Figura 103. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo tras activar las plaquetas a los 35 segundos, en las muestras control y expuestas a aspirina de forma aguda.</i>   | 226 |
| <i>Figura 104. A <math>200 \mu\text{M}</math>, la aspirina redujo la velocidad de recaptación del calcio hacia sus reservorios internos.</i>  | 227 |
| <i>Figura 105. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo tras activar las plaquetas a los 35 segundos, en las muestras control y expuestas a aspirina durante 24 horas.</i> | 227 |
| <i>Figura 106. El tiempo que tardaron en estimularse las plaquetas se redujo significativamente en las muestras tratadas con la aspirina.</i>   | 228 |
| <i>Figura 107. La velocidad a la que se redujo la señal FSC (formación de MPPs) fue inferior en las muestras tratadas con aspirina que en las muestras control.</i>                             | 229 |
| <i>Figura 108. La aspirina redujo la velocidad de exposición de la PS en las plaquetas.</i>   | 230 |
| <i>Figura 109. El paracetamol produce apoptosis en los leucocitos 1.</i>  | 231 |
| <i>Figura 110. El paracetamol produce apoptosis en los leucocitos 2.</i>  | 232 |
| <i>Figura 111. Mecanismo por el cual el paracetamol induce la apoptosis.</i>  | 234 |
| <i>Figura 112. El paracetamol redujo la capacidad de ingestión de monocitos y granulocitos.</i>   | 235 |
| <i>Figura 113. El paracetamol redujo la capacidad de destrucción de monocitos y granulocitos.</i>   | 236 |
| <i>Figura 114. Cambios en el tiempo en la exposición de PS al estimular las plaquetas en muestras control y expuestas a paracetamol.</i>  | 238 |
| <i>Figura 115. La exposición aguda a paracetamol redujo la velocidad de exposición de la PS tras estimular las plaquetas.</i>   | 239 |
| <i>Figura 116. La incubación con paracetamol durante 24 horas produjo una tendencia de reducción en la velocidad de exposición de PS.</i>   | 240 |
| <i>Figura 117. Alteraciones en la producción de citoquinas en las muestras expuestas a aspirina, cafeína, paracetamol e ibuprofeno.</i>   | 241 |

## TABLAS

|   |     |
|---|-----|
| <i>Tabla 1. Mediadores químicos de la inflamación y sus funciones.</i>  | 33  |
| <i>Tabla 2. Características de los delfines bajo cuidado humano del estudio.</i>  | 66  |
| <i>Tabla 3. Características de los delfines salvajes del estudio.</i>   | 69  |
| <i>Tabla 4. Características de las belugas bajo cuidado humano del estudio.</i>   | 70  |
| <i>Tabla 5. Características de las morsas bajo cuidado humano del estudio.</i>  | 71  |
| <i>Tabla 6. Características de las focas bajo cuidado humano del estudio.</i>   | 71  |
| <i>Tabla 7. Características de los leones bajo cuidado humano del estudio.</i>  | 72  |
| <i>Tabla 8. Kits comerciales empleados en el estudio.</i>   | 79  |
| <i>Tabla 9. Grados de presentación del patrón comportamental.</i>   | 130 |
| <i>Tabla 10. Rango de valores de capacidad fagocítica en delfines bajo cuidado humano sanos.</i>  | 136 |
| <i>Tabla 11. Rango de valores de capacidad fagocítica en delfines salvajes.</i>   | 137 |
| <i>Tabla 12. Rango de valores de capacidad fagocítica en belugas sanas.</i>   | 138 |
| <i>Tabla 13. Rango de valores de capacidad fagocítica en morsas sanas.</i>  | 139 |
| <i>Tabla 14. Rango de valores de capacidad fagocítica en leones sanos.</i>  | 139 |
| <i>Tabla 15. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en delfines bajo cuidado humano sanos.</i>  | 141 |
| <i>Tabla 16. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en belugas bajo cuidado humano sanas.</i>   | 141 |
| <i>Tabla 17. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en morsas sanas bajo cuidado humano.</i>  | 142 |
| <i>Tabla 18. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en leones marinos sanos bajo cuidado humano.</i>                                    | 142 |
| <i>Tabla 19. Rango fisiológico de IMF de TMRM como indicador del PMM leucocitario en delfines bajo cuidado humano.</i>  | 144 |
| <i>Tabla 20. Rango fisiológico de IMF del TMRM como indicador del PMM leucocitario en delfines salvajes sanos.</i>  | 145 |
| <i>Tabla 21. Comparación en la movilización de calcio intraplaquetario entre delfines procedentes de diferentes acuarios, globalmente o por sexo y edad</i>                   | 149 |
| <i>Tabla 22. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en delfines bajo cuidado humano.</i>                                | 150 |
| <i>Tabla 23. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en delfines salvajes sanos.</i>                                     | 152 |
| <i>Tabla 24. Diferencias observadas en la movilización de calcio intraplaquetario entre delfines salvajes y delfines bajo cuidado humano globalmente y por género y edad.</i> | 153 |
| <i>Tabla 25. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en belugas sanas.</i>   | 158 |
| <i>Tabla 26. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en morsas sanas.</i>  | 159 |
| <i>Tabla 27. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en leones marinos sanos.</i>  | 160 |
| <i>Tabla 28. Valores de movilización de calcio intraplaquetario obtenidos en una foca sana.</i>   | 160 |

## TABLAS

|   |     |
|---|-----|
| <i>Tabla 29. Comparación por pares en la movilización de calcio intraplaquetario entre las diferentes especies bajo cuidado humano.</i>   | 162 |
| <i>Tabla 30. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en delfines bajo cuidado humano.</i>   | 167 |
| <i>Tabla 31. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en belugas bajo cuidado humano.</i>  | 168 |
| <i>Tabla 32. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en morsas bajo cuidado humano.</i>   | 169 |
| <i>Tabla 33. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en leones marinos bajo cuidado humano.</i>   | 169 |
| <i>Tabla 34. Comparación por pares en la expresión de PS y producción de MPPs entre las diferentes especies bajo cuidado humano.</i>  | 170 |
| <i>Tabla 35. Rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en delfines sanos bajo cuidado humano.</i>  | 171 |
| <i>Tabla 36. Rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en delfines salvajes sanos.</i>   | 172 |
| <i>Tabla 37. Estudio piloto del rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en belugas, leones marinos y morsas.</i>   | 173 |
| <i>Tabla 38. Diferencias entre la FPI de mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.</i>  | 174 |
| <i>Tabla 39. Orden de los animales según parámetros de inmunocompetencia.</i>   | 176 |
| <i>Tabla 40. Orden de los animales según su capacidad para movilizar el calcio plaquetario tras su estimulación con ADP.</i>  | 178 |
| <i>Tabla 41. Parámetros activación plaquetaria caso clínico estrés y gastritis hemorrágica.</i>   | 185 |
| <i>Tabla 42. Parámetros activación plaquetaria en caso clínico de león marino con gastritis 1.</i>  | 187 |
| <i>Tabla 43. Parámetros activación plaquetaria en caso clínico de león marino con gastritis 2.</i>  | 187 |
| <i>Tabla 44. Concentración de cafeína, aspirina, ketoprofeno e ibuprofeno en muestras de hígado y riñón de un delfín mular.</i>   | 190 |
| <i>Tabla 45. Concentraciones de Cd, Pb, As, Cu, Zn y Cr detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.</i>   | 191 |
| <i>Tabla 46. Concentraciones de Hg, Na, Mg, P, K, Ca y Fe detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.</i>   | 192 |
| <i>Tabla 47. Concentraciones de Al, Ti, Sr, Ba, Mn, Co y V detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.</i>  | 193 |
| <i>Tabla 48. Resumen de los principales efectos del ibuprofeno, cafeína, aspirina y paracetamol sobre los diferentes parámetros de función inmunitaria y plaquetaria en delfines mulares.</i> | 242 |



# *Hipótesis y Objetivos*





El ecosistema marino está siendo sometido de forma incesante a la influencia humana. Los mamíferos marinos, al ser animales longevos que se encuentran en lo alto de la cadena alimentaria son buenos bioindicadores del estado del medio marino. Entre los impactos que más afectan a los mamíferos marinos de vida libre se encuentran la contaminación de los mares y océanos, la pesca accidental, la contaminación acústica y el calentamiento global.

Diversos estudios han demostrado la presencia de contaminantes en los tejidos de mamíferos marinos varados. Por otra parte, algunos estudios han demostrado la presencia en el agua del mar de xenobióticos que todavía no se han analizado en los tejidos de los animales marinos hasta el momento, como fármacos de uso humano y veterinario.

También se han descrito cambios fisiológicos, bioquímicos y del comportamiento relacionados con el estrés agudo y crónico en animales expuestos a la contaminación acústica procedente de determinadas embarcaciones. Por otra parte, los mamíferos marinos que se encuentran bajo cuidado humano en acuarios pueden sufrir patologías o estrés crónico durante su vida, lo que puede ir en detrimento de su bienestar.

Se ha demostrado que el estrés, determinadas patologías y la exposición a contaminantes ambientales pueden producir alteraciones en la función inmune y plaquetaria en humanos y otras especies animales.

Por todo ello, nos planteamos las siguientes hipótesis:

### **Hipótesis 1.**

La aplicación de ensayos funcionales *ex vivo* en mamíferos marinos permitiría establecer los valores de referencia de biomarcadores relevantes de la función inmunitaria o plaquetaria, y detectar alteraciones tempranas en los mismos, como consecuencia de determinadas patologías o procesos estresantes.

### **Hipótesis 2.**

Determinados contaminantes presentes en el mar en concentraciones relevantes, tales como fármacos de uso humano (ibuprofeno, paracetamol, aspirina...) o metales pesados, podrían ser detectados en tejidos u otras matrices de cetáceos varados, así como en sangre u orina

de delfines vivos, ya sean salvajes o bajo cuidado humano, indicando una exposición crónica o aguda a dichos compuestos.

### **Hipótesis 3.**

La aplicación de ensayos funcionales *in vitro* en mamíferos marinos permitiría predecir y caracterizar posibles efectos tóxicos de xenobióticos contaminantes sobre la función inmunitaria y/o plaquetaria de delfines mulares.

De acuerdo con las hipótesis planteadas, los objetivos de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

### **Objetivo 1.**

Desarrollar y validar métodos para el estudio de biomarcadores de la función inmunitaria y plaquetaria en mamíferos marinos, correlacionando los resultados obtenidos con parámetros de hábitat, estrés, indicadores fisiológicos y estado de salud de los grupos de interés.

La consecución de este objetivo requiere la puesta a punto o adaptación de ensayos por medio de diferentes técnicas, principalmente citometría de flujo, para el estudio de la función inmunitaria (identificación de poblaciones leucocitarias, capacidad fagocítica, proliferación de linfocitos, viabilidad celular, apoptosis, potencial de membrana mitocondrial, estrés oxidativo y medida de citoquinas) y plaquetaria (identificación de plaquetas maduras e inmaduras, respuesta de movilización de calcio y generación de micropartículas).

### **Objetivo 2.**

Analizar contaminantes ambientales presentes en los tejidos y diferentes matrices (sangre entera y plasma) de tres grupos de delfines mulares:

a) Delfines salvajes vivos y sanos de la Bahía de Sarasota (Florida, EEUU).



b) Delfines bajo cuidado humano en el Oceanográfico de Valencia y en Mundomar (Benidorm, España).

c) Delfines salvajes varados en las costas de la Comunidad Valenciana.

En función de los resultados obtenidos, seleccionar los compuestos más representativos e interesantes para la posterior realización de los estudios de toxicología *in vitro*.

### **Objetivo 3.**

Realizar estudios de inmunotoxicología y toxicología *in vitro* en muestras de sangre entera de mamíferos marinos, empleando los tóxicos de relevancia medioambiental seleccionados para determinar si dichos xenobióticos inducen alteraciones de la función inmunitaria o plaquetaria que puedan poner en riesgo a los animales salvajes que están expuestos a ellos.





# *Introducción*



# 1. Problemática de la influencia humana, el estrés o las patologías sobre el Sistema Inmunitario de los mamíferos marinos.

## 1.1 Influencia humana sobre los ecosistemas.

Durante el último medio siglo, la población humana se ha duplicado, demandando más recursos procedentes de la naturaleza. Los cambios en el uso y la explotación de los ecosistemas, la contaminación y el cambio climático han sido algunas de las causas de que la biodiversidad esté en peligro. De aproximadamente 8 millones de especies animales y vegetales conocidas, al menos un millón se encuentran amenazadas de extinción, y muchas de ellas podrían desaparecer de forma inminente en las próximas décadas si no se toman medidas contundentes a tiempo. La velocidad a la que se están alcanzando estos niveles de amenaza es de diez a cien veces mayor que la media de los últimos diez millones de años. Aunque esta situación desencadena una rápida evolución biológica para adaptarse a los cambios, todo indica que los cambios generados por el hombre en el entorno se producen más rápido que los cambios adaptativos de las especies (Díaz et al., 2019).

Por fortuna, en los últimos años se ha incrementado el interés y la preocupación de la población por la conservación del medio ambiente, y en especial de los mares y océanos. El último Informe de Evaluación Mundial de la Plataforma Intergubernamental Científico-Normativa sobre Diversidad Biológica y Servicios de los Ecosistemas (IPBES), publicado por la Unesco en mayo del 2019, alerta sobre un declive sin precedentes de la biodiversidad de nuestro planeta. El cambio global en el medio natural durante los últimos 50 años no tiene comparación con el constatado en ningún otro periodo. El 75% de la superficie terrestre y el 66% de los océanos han sido significativamente alterados por la acción del hombre, así como los humedales, habiendo desaparecido ya prácticamente en su totalidad.

Si nos centramos en el ecosistema marino, la sobrepesca, los vertidos industriales, agrarios y urbanos, la presencia de macro-, micro- y nano-plásticos, la subida de la temperatura global o el desarrollo costero han contribuido a que un tercio de las especies de mamíferos marinos se encuentren amenazadas, un tercio de la población de peces se considere sobreexplotada y casi la mitad de los corales hayan desaparecido desde el año 1870 (Díaz et al., 2019).

Por todo ello, es necesario llevar a cabo un control y monitorización continuados de los ecosistemas, con el fin de evaluar los efectos de la influencia humana sobre estos, tomar

conciencia y poner fin a las acciones que dañan el medio ambiente. La idea de que el cambio es posible no es una quimera. Prueba de ello han sido las visibles modificaciones medioambientales que se produjeron durante el confinamiento global durante la pandemia por Covid-19. Si bien la pandemia ha sido una catástrofe sanitaria, económica y social, la fase de confinamiento prácticamente global se acompañó de mejoras medioambientales palpables que demostraron al mundo que si aplicamos medidas es posible reducir la influencia negativa del hombre sobre los ecosistemas y mejorar por ende la calidad de vida de los seres vivos que en ellos habitan, la nuestra propia y la de las generaciones futuras. Durante el confinamiento de la mayoría de países del mundo, las emisiones de gases de efecto invernadero se redujeron significativamente con respecto al año anterior (Lokhandwala y Gautam, 2020). En concreto, las emisiones diarias de CO<sub>2</sub> cayeron un 17% de forma global, y en determinados países incluso llegaron a reducirse en un 26% tras semanas de confinamiento (Le Quéré et al., 2020). Por su parte, en abril de 2020 las emisiones de óxido nítrico (NO) y dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) también disminuyeron un 30% y un 20% respectivamente, en pleno confinamiento, contribuyendo levemente al enfriamiento del planeta (Forster et al., 2020).

Pero no solo mejoró la calidad del aire, sino que también mermó la contaminación química y física de las playas, ríos y lagos (Arif et al, 2020; Yunus et al., 2020; Lokhandwala y Gautam, 2020; Ormaza-González et al., 2020). La contaminación acústica también se redujo considerablemente, tanto en los mares y océanos como en los ecosistemas terrestres. Se observó una caída del ruido sísmico (producido por las vibraciones de la corteza del planeta) debido sin lugar a dudas al descenso de las actividades rutinarias, especialmente del transporte (Mallapati, 2020). En el ecosistema marino se produjo una disminución significativa del ruido antropogénico, principalmente debido a la disminución del transporte marítimo. La potencia acústica se redujo a la mitad tanto en los puertos como en las profundidades marinas con respecto al año anterior (Thompson y Barclay, 2020). Todo ello contribuyó a que durante el confinamiento se produjeran más avistamientos de fauna salvaje cerca de las zonas urbanas y se observara menos basura en las playas (en especial, plásticos) (Ormaza-González et al., 2020).

Así pues, si bien es cierto que los peligros derivados de la acción del hombre existen y permanecen en el ecosistema marino, también lo es que es posible reducirlos tomando medidas y actuando de forma unida y global. En esta tesis hemos querido investigar qué

efectos podían tener el estrés, las patologías o los contaminantes ambientales en la salud de los mamíferos marinos. Para ello, nos centramos en el estudio de las células sanguíneas (leucocitos y plaquetas), puesto que, en especial el sistema inmunitario, es un indicador claro del estado de salud de los animales y su abordaje es poco invasivo para los individuos bajo estudio.

## **1.2 Monitorización del ecosistema marino mediante el estudio de especies centinela.**

Para evaluar el estado de los ecosistemas se emplean especies centinela, cuyo estudio informa no sólo sobre la situación de la especie sino también sobre el entorno en el que habita. En el caso del ecosistema marino, los mamíferos marinos son buenos bioindicadores del medio, debido a su elevada longevidad y a que se encuentran en lo alto de la cadena trófica.

Al ser depredadores apicales, los mamíferos marinos tienen una función determinante en el control de poblaciones y en la estabilidad del medio en el que habitan (Lloret et al., 2012). Sin embargo, su posición también implica que son los receptores finales de todos los impactos que se producen en el ecosistema. En este sentido, uno de los puntos clave es la bioacumulación a través de la dieta de todos los contaminantes a los que se exponen los organismos que se encuentran por debajo de ellos en la cadena alimentaria. En el caso de los mamíferos marinos este proceso ocurre todavía más notablemente con las sustancias de naturaleza lipofílica, como son los policloruros de bifenilos (PCBs) o algunos pesticidas, ya que estas especies presentan grandes cantidades de grasa en su organismo para mantener la temperatura corporal, como adaptación al medio en el que viven.

## **1.3 Los mamíferos marinos: Características biológicas, distribución y riesgos de las especies bajo estudio.**

Los mamíferos marinos proceden evolutivamente de mamíferos terrestres, con modificaciones anatómicas importantes para su adaptación al medio acuático. Las extremidades evolucionaron a aletas y su cuerpo presenta una forma fusiforme o alargada, lo cual evita en gran medida la resistencia contra el agua y mejora la hidrodinámica durante

el nado. También se han adaptado para poder soportar largos periodos de apnea, gracias a la respiración voluntaria en el caso de los cetáceos, y a su gran aprovechamiento del oxígeno (Secretaría de Estado de Medio Ambiente, 2015) presentando un mayor número de eritrocitos en sangre que los mamíferos terrestres y de dos a nueve veces más hemoglobina en los músculos. Por otro lado, cuando se sumergen entran en bradicardia y redistribuyen la sangre oxigenada hacia los órganos vitales más importantes. También sus sentidos han tenido que adaptarse al medio marino, principalmente la visión subacuática, y algunas especies han desarrollado nuevas capacidades para guiarse en su entorno, como la ecolocalización.

Presentan una gran capa de grasa subcutánea que les ayuda a regular su temperatura interna y mantenerla siempre estable, lo cual es imprescindible para su supervivencia, ya que son animales homeotermos. Además, la grasa también mejora su flotabilidad y les resulta útil como reserva energética (Cozzi et al., 2016)

El medio marino es su fuente de alimentación (Crocker D.E and Costa D.P, 2018). En el caso de los pinnípedos, estos aún poseen un vínculo con la tierra firme para dar a luz a sus crías y cuidarlas durante los primeros periodos de vida.

Los mamíferos marinos se dividen filogenéticamente en tres órdenes: el orden Cetácea, que incluye los subórdenes Odontocetos (cetáceos dentados) y Mysticetos (cetáceos barbados); el orden Carnívora, que incluye los Pinnípedos (Odobénidos, Fócidos y Otariídos) y otros carnívoros, como nutrias marinas u osos polares; y el orden Sirenia, en el que se clasifican los manatíes y los dugongs.

Esta Tesis se centra en el estudio de varias especies de cetáceos odontocetos y de pinnípedos, haciendo especial hincapié en los efectos de la influencia humana sobre los delfines mulares (*Tursiops truncatus*), cuya amplia distribución geográfica los convierte en una importante especie centinela global, que permite monitorizar y comparar el estado de ecosistemas muy alejados entre sí, utilizando sujetos de iguales características biológicas. Por otro lado, para iniciar las aproximaciones a los posibles efectos antropogénicos en mares no habitados por delfines mulares y/o en otras especies importantes del ecosistema marino, se han estudiado belugas (*Delphinapterus leucas*), morsas (*Odobenus rosmarus*), focas comunes (*Phoca vitulina*) y leones marinos sudamericanos (*Otaria flavescens*).



### 1.3.1. Cetáceos odontocetos.

#### **1.3.1.1 Delfín mular (*Tursiops truncatus*)**

El delfín mular es un cetáceo odontoceto de tamaño mediano, siendo su longitud media de entre 2 y 3,8 metros y su peso variable, situándose entre los 220 y 500 Kg en los individuos adultos (Figura 1A). Presenta una coloración grisácea uniforme excepto en la zona ventral, que mantiene un color blanquecino o rosado. Tienen una vida media de 25 años, produciéndose los nacimientos mayoritariamente en verano. Las hembras alcanzan la madurez sexual a los 5-12 años, mientras que los machos la alcanzan más tarde, entre los 10-12 años de edad. El periodo de gestación alcanza los 12 meses y la lactancia puede alargarse incluso hasta el año y medio de duración (Secretaría de Estado de Medio Ambiente, 2015). Suelen vivir en grupos de entre 2 y 25 animales, aunque en algunas ocasiones se han llegado a observar grupos formados por cientos de individuos, llegando incluso al millar.

Se distribuyen de forma cosmopolita entre las latitudes 40º norte y 45º sur, llegando a encontrarse en las islas británicas, a una latitud 60º norte (Culik, 2004) (Figura 1B). Normalmente, los delfines viven en áreas templadas o tropicales en zonas costeras, aunque algunos también habitan en zonas pelágicas (Wells y Scott, 1999).

Dependiendo de su hábitat, su alimentación puede sufrir ligeras variaciones, aunque siempre está compuesta por peces e invertebrados (Pauly et al., 1998). Concretamente, en España, los delfines mulares se alimentan principalmente de calamares, sardinas, caballas y chicharros (Blanco et al., 2001). En algunas zonas del océano, la distribución de las poblaciones de delfines es estacional, viéndose influenciada por las migraciones de los organismos que componen su dieta.

Su distribución costera, hace a esta especie especialmente susceptible a la influencia humana, estando más predispuestos a sufrir la contaminación procedente de las ciudades, la captura accidental o colisiones con las embarcaciones, entre otros (Wells y Scott, 1999). El Libro Rojo de los Vertebrados de España lo cataloga como especie “*Vulnerable*”, tanto en aguas de la Unión Europea como en aguas españolas del Mediterráneo (Real Decreto 139/2011), constando en el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas también como “*Vulnerable*”, tanto en aguas peninsulares (Orden del 10 de marzo de 2000) como en las Islas Canarias (Orden del 9 de junio de 1999). El Convenio de Berna lo incluye en el Anexo II, de

fauna estrictamente protegida, y la Directiva de Hábitats y su transposición en el R. D. 1997/1995 lo destacan, junto a la marsopa, en su Anexo II, lo que lo convierte en una especie de interés especial, cuya conservación requiere la designación de áreas especiales de conservación. También consta en su Anexo IV, como especie de interés comunitario y que precisa una protección estricta. El Acuerdo sobre la Conservación de los Cetáceos del Mar Negro, el Mar Mediterráneo y la Zona Atlántica Contigua (ACCOBAMS) lo considera desde el año 2002 como uno de los cetáceos que sufre mayores impactos por las actividades humanas. Por todo esto, el delfín mular está protegido por diferentes legislaciones autonómicas en España, concretamente en la Comunidad Valenciana y Andalucía.

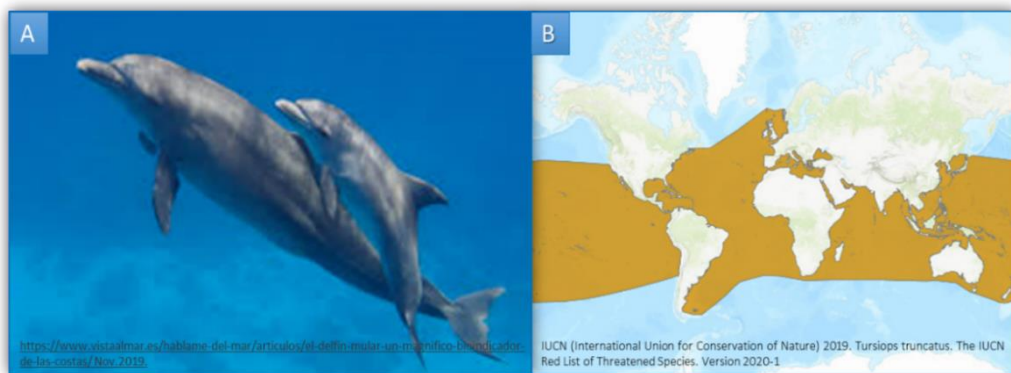


Figura 1. (A) Morfología externa de un delfín mular y su cría. (B) En naranja se detalla la distribución geográfica del delfín mular a nivel global.

### **1.3.1.2 Beluga (*Delphinapterus leucas*)**

Las belugas son cetáceos odontocetos de tamaño mediano (entre 3,5 y 5,5 metros de longitud), presentando los machos una longitud hasta un 25% mayor que la de las hembras y siendo más robustos (Culik, 2004). Los individuos adultos pueden llegar a pesar hasta 1500 Kg y presentan una longevidad superior a los 30 años. Las crías de beluga son grises al nacer y van aclarándose con los años hasta alcanzar el color perlado que las caracteriza aproximadamente a los 8 años de edad (O’Corry-Crowe et al., 2002) (Figura 2A).

Se distribuyen geográficamente en el Océano Ártico y los mares adyacentes (Figura 2B). Normalmente se localizan en zonas costeras de poca profundidad, pero también existen

grupos que viven mar adentro (Reyes, 1991) y su distribución es, en ocasiones, estacional, dirigiéndose a zonas poco profundas en verano y alejándose de la costa en invierno (Barber et al., 2001). Por ello su alimentación puede variar, estando compuesta principalmente por peces de río, gusanos marinos y calamares en zonas costeras y por crustáceos y peces más grandes en aguas más profundas (Culik, 2004).

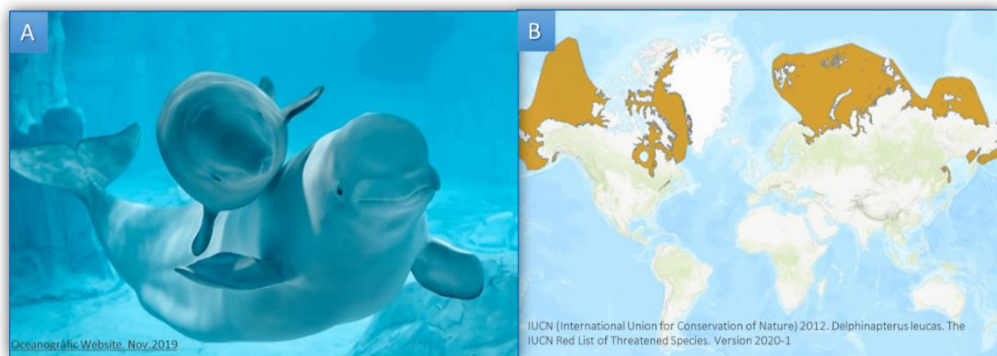


Figura 2. (A) Morfología externa de una beluga y su cría. (B) En naranja se detalla la distribución geográfica de las belugas a nivel global.

El calentamiento global, las capturas directas o la contaminación química y acústica son algunos de los mayores impactos humanos sobre esta especie, constando en el Apéndice II del Convenio de Bonn, relativo a la conservación de las especies migratorias.

### 1.3.2 Pinnípedos.

#### 1.3.2.1 Morsa (*Odobenus rosmarus*)

Las morsas son pinnípedos de la familia Odobenidea que presentan una longitud de aproximadamente tres metros de largo, alcanzando pesos que pueden llegar a los 1200 Kg en los machos más pesados, pero situándose alrededor de 700-800 Kg de media en los individuos adultos (Figura 3A). Tienden a formar grupos muy grandes, de hasta miles de individuos, como una estrategia defensiva frente a los depredadores. Se distribuyen en los mares del Ártico, desde Canadá y Groenlandia hasta Eurasia y el oeste de Alaska (Figura 3B), principalmente en zonas de alta mar y en placas de hielo de la plataforma continental. Su

vida media es de 40 años, llegando a la madurez sexual a los 6-7 años de media. Se aparean en invierno y tras una gestación de unos 15 meses suelen parir una única cría, que crece en tierra mientras su madre obtiene alimentos del agua, principalmente moluscos y ocasionalmente otros mamíferos más pequeños e incluso aves marinas (IUCN,2020).

Las morsas están consideradas como especie *Vulnerable* en la Lista Roja de la IUCN, debido a los impactos generados por los seres humanos en su hábitat, tales como las perforaciones en el medio para obtener gas y petróleo, la contaminación acústica derivada de las rutas de vuelo y las embarcaciones, o los daños en el entorno. A ello se suman las actividades recreativas en la zona, los vertidos de contaminantes industriales y militares a sus aguas y el cambio climático, que está alterando su hábitat de forma muy significativa durante los últimos años (Lowry, 2016).



Figura 3. (A) Morfología externa de una morsa y su cría. (B) En naranja se detalla la distribución geográfica de las morsas a nivel global.

### **1.3.2.2 Foca común (*Phoca vitulina*)**

Se trata de pinnípedos de la familia de los fócidos, de pequeño tamaño (de 1,5 a 1,9 metros de longitud y de 60 a 150Kg en los individuos adultos) (Burns, 2009) (Figura 4 A). Su vida media es de 30-35 años. Alcanzan la madurez sexual a los 3-6 años (Härkönen y Heide-Jorgensen, 1990) reproduciéndose en el agua y dando a luz en primavera-verano una única cría que lactará durante aproximadamente un mes (Bowen et al., 1994). Las focas comunes

viven en grupos en zonas costeras de los océanos Pacífico y Atlántico, distribuyéndose en el hemisferio norte, desde zonas templadas hasta regiones polares, según la subespecie a la que pertenezcan (Figura 4 B). Se alimentan de peces, cefalópodos y crustáceos (Pierce et al., 1991).

A pesar de aparecer en la Lista Roja de la IUCN como una especie de menor preocupación, su localización cercana a los humanos, muchas veces en zonas portuarias, implica la exposición de esta especie a amenazas como la captura accidental (Desportes et al., 2010) o la caza o matanza autorizada, ya sea para fines alimentarios (en Alaska) o para evitar la competencia por el alimento con las pesquerías. Además, están expuestas a grandes concentraciones de contaminantes procedentes de la agricultura o las industrias, que merman sus funciones reproductora (Reijnders, 1986) e inmunitaria (Ross et al., 1995) entre otras. También las transmisiones víricas de carnívoros terrestres a estas especies fomentan el riesgo de infección. La contaminación acústica procedente de las embarcaciones o de las explotaciones petrolíferas mar adentro afectan a sus comportamientos de caza, y por tanto a su condición física (Hastie et al., 2015). Por último, el cambio climático puede alterar la distribución de sus presas y por tanto su correcta nutrición.



Figura 4. (A) Morfología externa de la foca común. (B) En naranja se detalla la distribución geográfica de las focas comunes a nivel global.

### **1.3.2.3 León marino sudamericano (*Otaria flavescens*)**

Pertencen a la familia de los otaríidos. El dimorfismo sexual es evidente en esta especie, siendo los machos mucho más grandes que las hembras (machos: 2,1-2,6 metros de longitud

y 300-350 Kg de peso; hembras: 1,5-2 metros de longitud y 170 Kg de peso medio) (Riet-Sapriza et al., 2013) y presentando una melena que los caracteriza (Figura 5A). Alcanzan la madurez sexual a los 4-7 años de edad, aunque los machos no son capaces de mantener un territorio y un harén hasta los 9-11 años de edad (Grandi et al., 2012). Durante la reproducción los machos arrastran a las hembras hacia zonas alejadas del mar, las hembras gestan una sola cría durante un año y paren en invierno. La lactancia de las crías suele durar 8-10 meses, tras lo cual, las madres salen al mar en busca de alimento durante varios días, manteniendo unidas a las crías en grandes manadas en la costa. Cuando regresan con alimento, permanecen con ellas uno o dos días antes de volver a partir. Se alimentan principalmente de invertebrados y peces bentónicos y pelágicos. Los grupos sociales son diversos, pero lo más común es que esté formado por un único macho, de cuatro a diez hembras y sus crías. Se localizan en las zonas costeras de Sudamérica, en la región Sur-Oeste del Atlántico y Sur-Este del Pacífico (Figura 5B).



Figura 5. (A) Morfología externa del león marino californiano. (B) En naranja se detalla la distribución geográfica de los leones marinos californianos a nivel global.

Debido a sus localizaciones costeras, en muchas ocasiones comparten territorio con los seres humanos, sufriendo las mismas amenazas que las focas, ya citadas en el apartado anterior. A pesar de ello, los leones marinos sudamericanos aparecen en la Lista Roja de la UICN como especies de preocupación menor.

## 1.4. Principales amenazas antropogénicas a las que se enfrentan los mamíferos marinos y sus consecuencias sobre el bienestar animal.

### 1.4.1 Exposición a contaminantes ambientales.

La legislación europea define como “contaminantes” aquellas sustancias (elementos y compuestos químicos) o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y susceptibles de bioacumularse, o que dan lugar a un nivel equivalente de preocupación (Directive 2000/60/EC, 2000). El medio marino es el destino final de muchos de estos compuestos, ya sean físicos, como los plásticos, o químicos, como metales pesados, pesticidas, herbicidas, repelentes de insectos, organoclorados e incluso fármacos de uso humano o veterinario.

El vertido de contaminantes a los mares y océanos es uno de los principales problemas medioambientales en la actualidad. Residuos urbanos, agrícolas e industriales entre otros, son evacuados cada día al ecosistema marino, llegando a generar 400 zonas muertas en el medio marino, o lo que es lo mismo, más de 245.000 Km<sup>2</sup> de áreas hipóxicas, debido principalmente al excesivo e inapropiado uso de los fertilizantes (Díaz et al., 2019).

Según el último informe del IPBES, cada año son vertidos al ecosistema marino entre 300 y 400 millones de toneladas de metales pesados, solventes y otros residuos industriales y aproximadamente el 80% de las aguas residuales que se eliminan al medio ambiente a nivel global no han recibido tratamiento previo. Además, la contaminación por plásticos en los océanos se ha incrementado 10 veces desde el año 1980, afectando a al menos 267 especies marinas, incluyendo al 86% de las tortugas, al 44% de las aves y al 43% de los mamíferos. Tanto es así que se conoce la formación de al menos cinco enormes islas de plástico en el planeta situadas en los lugares donde convergen las corrientes marinas. Las más conocidas son las del Pacífico Norte y la del Atlántico Norte (Díaz et al., 2019).

Estos tóxicos acaban depositándose en el agua y el sedimento del fondo marino, desde donde los organismos menores los captan a través de la dieta. Las especies más grandes absorben los contaminantes al ingerir los organismos que se encuentran por debajo de ellos en la cadena trófica. Los mamíferos marinos, al ser animales longevos que se encuentran en lo alto de la cadena alimentaria (Figura 6 A) se consideran bioindicadores de la contaminación del medio marino. Mediante los procesos denominados como bioacumulación y

biomagnificación acumulan en sus tejidos los contaminantes a los que se han expuesto los organismos de los estratos inferiores.

La **bioacumulación** hace referencia a la cantidad total del contaminante absorbida y retenida por el animal a lo largo del tiempo (Jorgensen, 2016). La **biomagnificación** consiste en el incremento en la concentración de un contaminante desde un nivel trófico inferior a uno superior, donde los depredadores presentan mayores concentraciones que sus presas, debido a que ingieren no solo una presa, sino muchas y viven más años que ellas, estando expuestos por más tiempo a los contaminantes. Además, los organismos en niveles tróficos inferiores suelen crecer proporcionalmente más rápido, por lo que la acumulación de contaminantes queda más diluida que en sus depredadores (Newman, 2014) (Figura 6 B).

Diversos estudios han demostrado la presencia de contaminantes en los tejidos de diferentes especies de mamíferos marinos, como delfín listado (*Stenella coeruleoalba*) (Martínez-López et al., 2019; Shoham-Frider et al., 2016), delfín de Fraser (*Lagenodelphis hosei*) (Durante et al., 2016; Durante et al., 2019), delfín común (*Delphinus delphis*) (Lahvis et al, 1995), orca (*Orcinus orca*), oso polar (*Ursus maritimus*) (Desforges et al., 2017) o foca vitulina (*Phoca vitulina*) (Frouin et al., 2008) entre otros. Los principales tejidos de acumulación son la grasa (donde se acumulan los compuestos lipofílicos), el hígado, el músculo, el riñón y el cerebro.

En estas especies se han detectado compuestos como metales pesados, pesticidas, repelentes de insectos, plaguicidas, per-y polifluoroalquilos (PFAs), bifenilos policlorados (PCBs) o tributiltinas. Otros estudios han detectado la presencia de ftalatos (productos de degradación del plástico) en orina de delfines mulares, poniendo en evidencia su exposición a derivados de los plásticos o microplásticos a través de la dieta (Hart et al., 2018).

Del mismo modo, determinados contaminantes son incluso detectables en el agua de mar. Fármacos como la cafeína, la carbamacepina, el ibuprofeno, el paracetamol o la teofilina entre otros, o ciertos alquilfenoles, PFAs, repelentes de insectos y pesticidas, se han encontrado entre el 90% y el 100% de las muestras de agua del Mediterráneo testadas (Munaron et al., 2012; Desbiolles et al., 2018; Brumovský et al., 2016; Brumovsky et al., 2017).



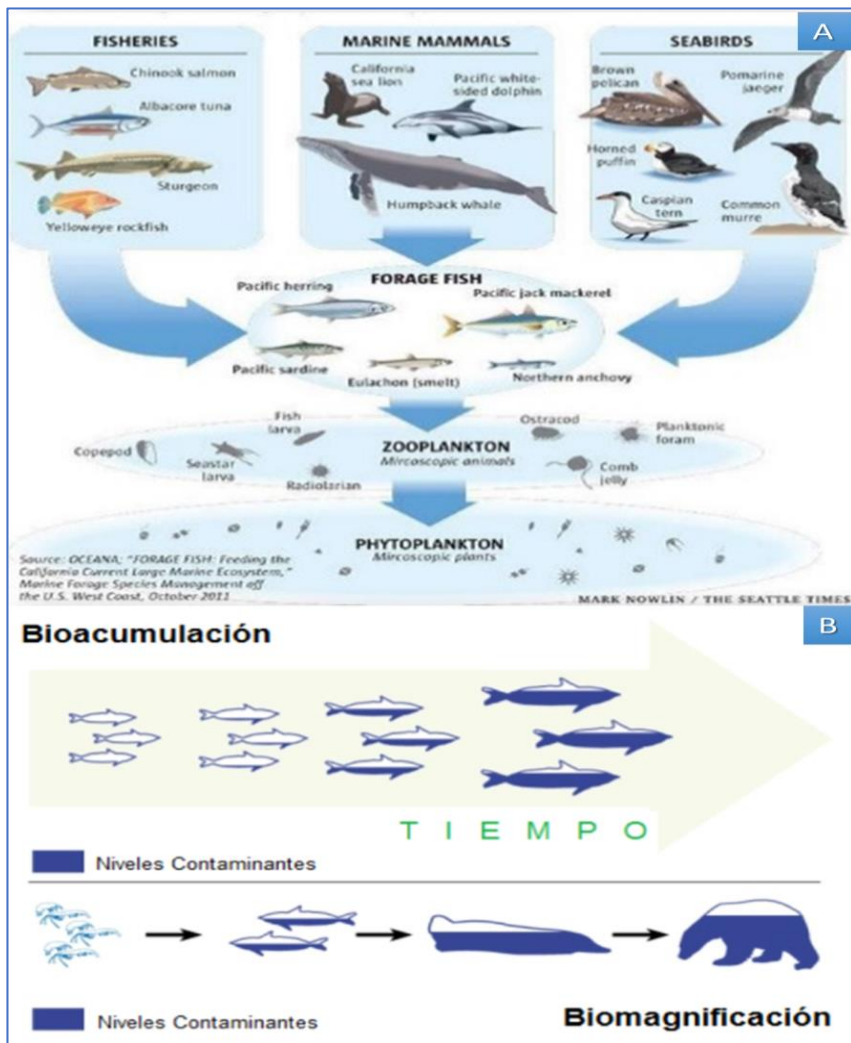


Figura 6. (A) Cadena trófica de los mamíferos marinos. (B) Representación de los niveles de contaminantes en el organismo de los animales en el proceso de bioacumulación y biomagnificación (Descargado de: <http://nano-sostenible.com/2018/10/24/el-cuento-cauteloso-del-ddt> 2. el 20/marzo/2020).

Los contaminantes que se introducen en el medio marino se diluyen gracias al gran tamaño y volumen de los océanos, lo que conlleva que sus efectos no sean inmediatamente visibles, sino que son observables tras una exposición crónica. La toxicidad de los contaminantes o de las combinaciones de contaminantes depende del perfil de toxicidad de cada producto, de cómo interaccionan entre ellos (sinergismo o antagonismo), de su persistencia y su biodisponibilidad, así como de la capacidad de los organismos marinos para absorberlos y metabolizarlos.

Se sabe que muchos de estos compuestos pueden producir en los seres humanos alteraciones a nivel endocrino, neurológico, inmunitario e incluso daño hepático o renal, entre otros (Bjorklund, et al., 2018; Guillette y Gunderson, 2001; Cosola et al., 2018; Kretzschmar y Klinger, 1990). Con respecto al sistema inmunitario, se han llevado a cabo varios estudios *in vitro* en diferentes especies de mamíferos marinos en los que se ha observado una relación directa entre la exposición a ciertos xenobióticos y alteraciones en la funcionalidad inmunitaria. Por ejemplo, se ha observado que ciertos PCBs generan una disminución de la capacidad fagocítica de los granulocitos en orcas y osos polares, así como un descenso en la viabilidad linfocitaria y su capacidad proliferativa (Desforges et al 2017). Los PCBs también se han relacionado con disminuciones en la actividad de las células NK en leones marinos californianos (Peñín et al., 2018). También en orcas se observó una reducción en la capacidad fagocítica tras la exposición *in vitro* de sus leucocitos a pesticidas organoclorados (OCPs) (Desforges et al 2017). Determinados metales pesados como el mercurio (Hg) y el cadmio (Cd) pueden generar una considerable disminución en la viabilidad de los leucocitos en delfines mulares, así como una disminución en la proliferación de linfocitos ante ciertos mitógenos y en la capacidad fagocítica de los granulocitos (Cámara-Pellissó et al., 2008). Por otro lado, la tributiltina y algunos de sus metabolitos, en especial la dibutiltina, alteran la función de los leucocitos en focas vitulinas. La dibutiltina induce una importante reducción en la funcionalidad de los fagocitos, linfocitos B y células NK en esta especie (Frouin et al., 2008). Las nanopartículas de plata procedentes de las industrias textil y cosmética también pueden generar alteraciones a nivel linfocitario en delfines mulares, tales como un potenciamiento de la apoptosis de estas células o una disminución en su capacidad proliferativa (Li et al., 2018).

Como es evidente, los seres humanos también están expuestos a estos contaminantes a través del consumo de pescado, especialmente de los peces que se encuentran en posiciones

superiores en la cadena alimentaria, por el proceso de biomagnificación. El contaminante que se encuentra a mayores niveles en el pescado que consumimos es el metilmercurio, que a elevadas dosis puede producir daños neurológicos y renales, así como alteraciones del desarrollo fetal. Por esto, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) recomienda que las mujeres gestantes no ingieran pescado de las especies más propensas a la contaminación, como el atún, el lucio, el pez espada o las especies pequeñas de tiburones, que según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) son las especies que más bioacumulan este compuesto.

### 1.4.2 Bycatch.

El aumento en la esperanza de vida humana está provocando un crecimiento sin precedentes en la población, lo que implica un aumento en la demanda de ciertos recursos, entre los que se encuentra el pescado. Para cubrir esta demanda, la pesca ha tenido que industrializarse y expandirse a nuevas zonas, alterando muchas áreas del ecosistema marino y sobreexplotando algunas poblaciones de peces, llegando incluso a agotarlas (DeMaster et al., 2001). Según el Informe de Evaluación Mundial del IPBES de 2019, actualmente el 33% de la población total de peces está sobreexplotada y más del 55% del océano está siendo sujeto de la pesca industrial. Esto ha tenido como consecuencia el desplazamiento de los pesqueros en busca de nuevas poblaciones de peces, resultando en un aumento en las interacciones entre mamíferos marinos y pescadores, que compiten por los mismos recursos (Read et al., 2005). En ocasiones, los mamíferos marinos entran en contacto directo con las redes de pesca (Beverton, 1985) y son capturados por ellas (Figura 7), siendo posteriormente liberados al mar en el proceso conocido como bycatch (Alverson et al., 1994).

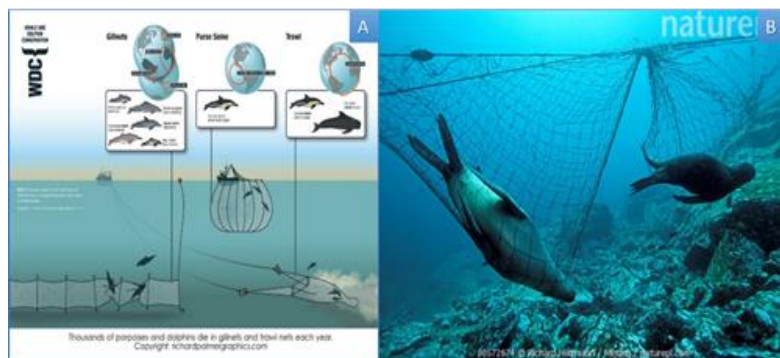


Figura 7. (A) Diferentes artes de pesca en las que pueden enredarse los mamíferos marinos. (B) Leones marinos atrapados en redes de pesca.

El bycatch produce serias lesiones e incluso la muerte en los mamíferos marinos, afectando a la demografía de estas especies en algunas zonas del mundo (Reeves et al., 2003) e incluso poniéndolas en peligro de extinción en algunos casos (Reeves et al., 2020). Cuantificar el número de mamíferos marinos afectados por este problema es complicado, sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de los pescadores no dan parte de estos incidentes. Sin embargo, existen algunos datos que pueden ser orientativos. Si nos centramos en España, sólo en Galicia se registraron 394 delfines comunes víctimas del bycatch en un año (Fernández-Contreras et al., 2010), mientras que en un estudio realizado en el Mar de Alborán, se estimó que de 3000 a 4000 delfines son capturados anualmente en ese área. Esto implica que en un solo año el 10% de la población de delfines del Mar de Alborán son víctimas del bycatch, suponiendo un gran riesgo para la supervivencia de la especie en esta zona. En este mismo estudio se estimó que en todo el estrecho de Gibraltar, y teniendo en cuenta todas las flotas pesqueras, las cifras son mucho más alarmantes, superando los 10000 delfines que padecen interacción con las artes de pesca anualmente (Tudela et al., 2004). Algunas de las soluciones que se proponen para contrarrestar el problema del bycatch en animales marinos son la modificación de las redes de pesca por nuevos sistemas menos peligrosos para la fauna marina o la clausura de algunos espacios marítimos a los barcos pesqueros (Tulloch et al., 2019).

Los cetáceos víctimas de bycatch suelen quedar enredados en las redes bajo el agua, acabando asfixiados al no poder salir a la superficie a respirar. En sus intentos por escapar de las redes se lesionan sufriendo hemorragias y fracturas e incluso a veces amputaciones (Dolman y Brakes, 2018). Si bien los mamíferos marinos están adaptados anatómicamente y fisiológicamente para no sufrir la enfermedad descompresiva en condiciones normales, sus mecanismos adaptativos pueden verse anulados en situaciones muy estresantes. Algunos de estos mecanismos son: la capacidad de colapsar los alveolos bloqueando el intercambio de gases en profundidad, una menor capacidad pulmonar, la presencia de vías respiratorias reforzadas para almacenar aire durante el buceo y recuperarlo gradualmente en el ascenso a la superficie, disminución de la frecuencia cardíaca durante el buceo, presencia de shunts arterio-venosos o esfínteres mioelásticos a nivel alveolar, o el mayor contenido en hemoglobina y mioglobina en la sangre y la masa muscular respectivamente.

Al quedar atrapados en las redes de pesca, los animales sufren una fuerte respuesta de estrés acompañada de la liberación de hormonas como la adrenalina, que provoca que algunos de

estos mecanismos adaptativos, como el cierre del esfínter respiratorio, fallen y se produzca el intercambio de gases en profundidad desencadenando la embolia gaseosa (García-Párraga et al., 2018). Si los animales han sufrido embolia gaseosa severa acaban muriendo y apareciendo varados en las costas. La ausencia de bacterias o cambios autolíticos son indicios histológicos de que las burbujas de gas se formaron a causa de este síndrome y no post-mortem (Moore et al., 2009).

En los seres humanos la enfermedad descompresiva afecta principalmente a los buceadores, debido a los cambios bruscos de presión a los que están sometidos al descender a elevadas profundidades y posteriormente ascender a la superficie. En la enfermedad descompresiva, el nitrógeno solubilizado en la sangre y los tejidos a altas presiones forma burbujas al disminuir rápidamente la presión ambiente. Este síndrome puede cursar con síntomas como el dolor muscular y articular o la fatiga, sin embargo, se ha demostrado que incluso en los buceadores asintomáticos existe un aumento en el nivel de micropartículas celulares en sangre, principalmente las portadoras de las siguientes proteínas: CD41, CD31, CD66b, CD142 y CD235 (Thom et al., 2015). Las micropartículas son vesículas derivadas de las membranas celulares con diámetros de entre 0,1 $\mu$ m y 1 $\mu$ m. Se ha demostrado que los niveles de micropartículas en sangre son de 2,4 a 11,7 veces mayores en buzos que padecen síntomas de enfermedad descompresiva que en los individuos asintomáticos, así como un aumento en la activación de los neutrófilos en las personas que presentaban el síndrome (Thom et al., 2015). Así pues, las micropartículas celulares son un indicador importante en el diagnóstico y posterior monitorización de la evolución de la enfermedad descompresiva en humanos. De hecho, se ha observado que, al tratar la enfermedad descompresiva, la disminución en la producción de micropartículas ocurre de forma proporcional a la remisión de la enfermedad (Madden et al., 2014).

### **1.4.3 Contaminación acústica.**

En el medio acuático, el sonido viaja más fácilmente que la luz (Urlick, 1983), por lo que los mamíferos marinos obtienen mucha información de su entorno a partir de la audición, siendo este un sentido muy importante en comportamientos como la búsqueda de alimento, la huida de depredadores y la comunicación con el resto del grupo.

Durante las últimas décadas, el extenso tráfico marítimo, las actividades militares o las instalaciones mar adentro para extracción de petróleo o gas están aumentando los niveles

de sonido en el entorno marino, pudiendo afectar el comportamiento e incluso la capacidad auditiva de los animales que en él habitan (Wright et al., 2007). Puesto que la introducción de sonido antropogénico en el medio marino es históricamente reciente, comenzando de forma importante hace cien años, desconocemos las consecuencias a corto, medio y largo plazo en el ecosistema marino.

Las embarcaciones modernas pueden llegar a alcanzar altas frecuencias (hasta 44.8 kHz) que llegan a atravesar distancias de hasta 700 metros en el mar (Aguilar-Soto et al., 2006). En muchas ocasiones, el sonido generado por la acción del hombre en los mares se solapa o supera al que emiten los mamíferos marinos para comunicarse u orientarse, produciendo lo que se conoce como enmascaramiento auditivo. Las vocalizaciones de los mamíferos marinos se encuentran en un rango de entre 20 Hz y 20 KHz (Richardson et al., 1995), y los *clicks* que emiten durante la ecolocalización presentan su pico en el rango de 30 a 60 KHz (O'Brien et al., 2016). Así pues, los sonidos de procedencia humana perjudican indudablemente la comunicación, reproducción y obtención de alimentos en estas especies, lo cual es un potencial factor estresante para ellas.

Se ha demostrado la relación entre las exposiciones a sonidos antropogénicos con la aparición de indicadores de estrés en estas especies. En delfines, se han observado cambios en el ritmo cardíaco como respuesta a exposiciones sonoras (Miksis-Olds et al., 2007). En otro estudio se detectó un aumento en las hormonas de estrés en belugas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) ante la elevación artificial del sonido ambiente (Romano et al., 2004). Además, se han observado numerosos comportamientos indicativos de estrés en animales expuestos a altos niveles de ruido en el mar, incluso a distancias de 50 m del barco. Entre dichos comportamientos se encuentran cambios en las vocalizaciones (con aumento de las frecuencias normales de emisión), reducción de la actividad de comunicación entre ellos (Jensen et al., 2009) e incluso cese de emisión de sonidos en delfines mulares (Buckstaff, 2004), orcas (Foote et al., 2004), belugas (Lesage et al., 1999) y calderones (Rendell et al., 1999).

En poblaciones de orcas (Williams et al., 2006) y delfines comunes (Stockin et al., 2008), se han observado alteraciones en los patrones migratorios (Richardson et al., 1990; Malme et al., 1984) e interrupciones en la alimentación por la presencia de barcos. Se han detectado alteraciones tanto en el buceo, realizando inmersiones más prolongadas para evitar barcos

de recreo (Evans et al.,1992), como en la velocidad de nado y en comportamientos relacionados con la reproducción (Wright et al., 2007).

En ocasiones, algunos individuos han sufrido traumas acústicos con pérdida de audición reversible o irreversible (André et al., 2009) y varamientos masivos en zonas con una elevada contaminación acústica (Weilgart, 2007; Wright et al., 2007). En este último caso, los varamientos masivos de zifios (cetáceos similares a los delfines) apenas unas horas o días después de la utilización de sónares en maniobras navales militares en la misma zona marítima ha sido uno de los ejemplos más evidentes de la contaminación acústica en el mar, siendo la embolia gaseosa la principal causa de muerte en estos animales (Fernández et al., 2005; Jepson et al., 2003). Los zifios, normalmente bucean a altas profundidades, exceptuando los momentos en que deben emerger a respirar (Tyack et al., 2006). Se cree que, ante estos altos niveles de sonido, los animales percibieron una amenaza y presentaron una respuesta de estrés agudo, sufriendo como consecuencia la enfermedad descompresiva. Otra posible explicación es que el propio sonido de las maniobras militares pudiera generar la formación de burbujas de nitrógeno en sangre mediante un proceso denominado “difusión rectificada”. En el 75% de estos animales se detectaron cúmulos proteicos intracelulares de proteínas de fase aguda (PFA) en hígado (Wright et al., 2007), lo cual puede ser indicativo de una respuesta de estrés agudo. Ya en otras ocasiones se han observado estos aglomerados en el hígado de marsopas víctimas de la pesca accidental (Godinho et al., 2006).

Por todo ello, podemos concluir que existe una relación directa entre la contaminación acústica en el mar con la aparición de estrés agudo o crónico en mamíferos marinos. Como es sabido, el estrés puede generar alteraciones en la función inmunitaria y desequilibrios hormonales (André et al., 2009) que pueden predisponer a los animales a padecer ciertas enfermedades.

#### ***1.4.4 Calentamiento global.***

La emisión de gases de efecto invernadero (GEI) es la principal causa del aumento de la temperatura en el planeta. Aproximadamente, el 80% de las emisiones de GEI son de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el cual procede de la quema de combustibles fósiles, como el carbón, el gas natural o el petróleo, así como de la combustión de materiales biológicos o químicos. A éstos le sigue el metano (CH<sub>4</sub>), que supone alrededor del 10% de las emisiones y procede del transporte y la producción de combustibles fósiles, así como de la práctica ganadera y

agrícola. El 5% de las emisiones de efecto invernadero se componen de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), el cual se genera durante el tratamiento de aguas residuales, actividades agrícolas e industriales y tras la combustión de combustibles fósiles. Por último, y en menor proporción, algunos gases fluorados o el vapor de agua, entre otros, también pueden desencadenar este proceso (Figura 8 A). El transporte, la generación eléctrica y las actividades industriales son los principales productores de estos gases (Ministerio para la Transición Ecológica, 2019; Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, 2019).

El comportamiento de los gases de efecto invernadero consiste en dejar pasar la radiación del sol a través de ellos, pero no dejar escapar las radiaciones infrarrojas devueltas por la superficie terrestre, absorbiéndolas y calentando progresivamente la superficie del planeta y las capas bajas de la atmósfera (AEC, 2019) (Figura 8 B).

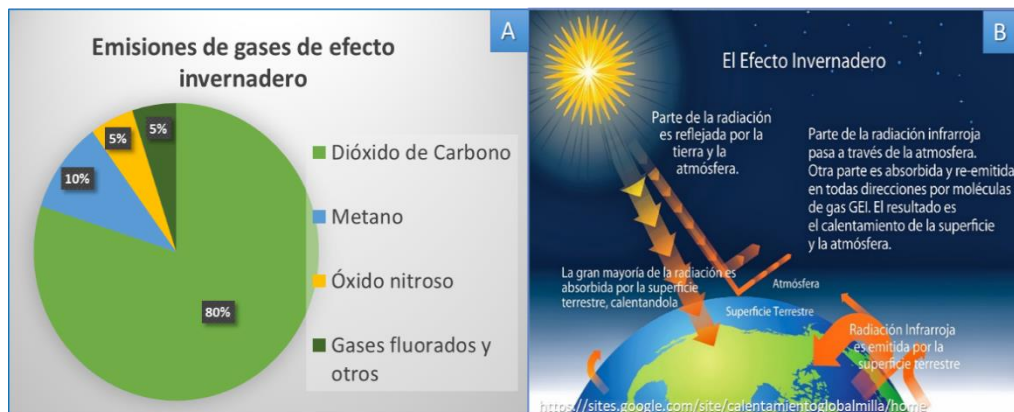


Figura 8. (A) Proporción de las emisiones de gases de efecto invernadero a nivel global. (B) Representación de las fases del efecto invernadero.

El calentamiento global se inició con la era industrial, pero solo recientemente ha sobrepasado el rango de variabilidad natural (Trusel et al., 2018). La temperatura global se está incrementando de forma exponencial. Durante los últimos treinta años, la temperatura ha aumentado a una media de  $0,2^{\circ}\text{C}$  por década. Como consecuencia, el nivel del mar ha aumentado entre 16 y 21 cm desde el año 1900, acelerándose este fenómeno durante las últimas décadas, en las que ha aumentado a razón de más de 3 mm por año (Díaz et al., 2019). Se cree que, si no se adoptan las medidas consensuadas en el Acuerdo Climático de París del



año 2017, en el cual se estipuló limitar el calentamiento global a 2°C sobre los niveles pre-industriales, en el año 2030 podría derretirse todo el hielo del Océano Ártico durante los meses más cálidos del año (Rosen, 2017). Puesto que el hielo del mar ayuda a enfriar el planeta reflejando la luz solar y previniendo la absorción de calor por parte del océano Ártico, su desaparición supondría alteraciones en el clima de todo el globo terráqueo. Incluso cumpliendo con dicha restricción, el hielo del Antártico y de Groenlandia seguiría perdiendo masa los próximos cien años a la misma velocidad o incluso más rápido que en las últimas décadas, debido a la respuesta no-lineal del deshielo frente al calentamiento global (Pattyn et al., 2018; Trusel et al., 2018). Según análisis estratigráficos de los núcleos de hielo de Groenlandia, la magnitud del deshielo en este área durante los últimos 350 años es excepcional (Trusel et al., 2018).

Estos cambios tienen consecuencias en la biodiversidad, provocando cambios en la distribución de las especies, la dinámica de poblaciones y en la funcionalidad de los ecosistemas. Los mamíferos marinos que habitan en las zonas polares son valiosos bioindicadores del medio en el que viven, debido a su posición apical en la cadena trófica, y son consideradas especies centinela para el estudio de los efectos del cambio climático en estas áreas.

El aumento de las temperaturas desencadena el deshielo de los polos y por tanto el aumento en el nivel del mar, generando cambios en las características, frecuencia y distribución de las presas de los mamíferos marinos (Perry et al., 2005). Esto implica que los mamíferos deban introducir cambios en sus conductas de búsqueda de alimento, que pueden implicar un aumento en la duración y la distancia recorrida hasta encontrar suficientes presas, o en la necesidad de bucear a mayores profundidades, aumentando la duración de las inmersiones entre respiraciones (Martin y Smith, 1999). Lamentablemente, ya se están produciendo estos efectos en algunas especies. Uno de los casos más claros es el de los osos polares, que caminan largas distancias en busca de alimento, llegando incluso a acceder a zonas habitadas por humanos.

El aumento en la emisión de gases de efecto invernadero está causando la acidificación de los océanos, que absorben dióxido de carbono de la atmósfera (AMAP, 2013). Esta reducción en el pH del agua es particularmente notable en el Ártico (AMAP, 2013) y podría llegar a

afectar a la supervivencia de ciertos organismos, como los invertebrados calcificados, que son la principal dieta de las morsas (Kovacs et al., 2015).

Por otro lado, los bloques de hielo marino son también lugares de reposo para diferentes especies animales, de manera que la reducción o desaparición de estas plataformas obliga a estas especies a buscar nuevos lugares de descanso. Un ejemplo claro es el caso de la población de morsas de la costa del mar de Chuckchi, situado entre Alaska y Siberia, que desde 2007 descansan en las playas de la zona durante la época estival, en lugar de hacerlo en el hielo marino, debido a que este se retrae muy notablemente durante estos meses (MacCracken, 2012). Los cambios en el ecosistema conllevan también la sustitución de determinadas especies habituadas al hielo por especies que viven en mar abierto, como es el caso del plancton, que está comenzando a reemplazar a las algas que crecen en el hielo del Ártico (Rosen, 2017).

Todos estos cambios en el ecosistema obligan por tanto a los mamíferos marinos a cambiar sus comportamientos naturales, modificando sus conductas de caza e incluso su ubicación debido a la desaparición de las plataformas de hielo. Es lógico pensar que estos cambios pueden generar estrés crónico en estas especies y, por tanto, como consecuencia, posiblemente alteraciones a nivel inmunitario. Para contrarrestar los efectos del cambio climático, algunos investigadores han propuesto técnicas de geoingeniería para enfriar el planeta y evitar el deshielo, como son emitir partículas flotantes de color claro para reflejar la luz solar en el Ártico o la utilización de bombas eólicas para llevar agua a la superficie durante el invierno y congelarla artificialmente. Si embargo, la mayoría duda de los beneficios reales de estas técnicas, ya que supondrían inmensos esfuerzos y posiblemente la circulación del planeta compensaría este leve enfriamiento con más vientos calientes. Todos los expertos coinciden en que la única solución permanente posible es la reducción en la emisión de los gases de efecto invernadero (Rosen, 2017).

Así pues, la influencia del ser humano sobre el ecosistema marino deriva en la bioacumulación de contaminantes en los organismos acuáticos, así como en la aparición de procesos de estrés o de patologías relacionadas directa o indirectamente con la acción del hombre. Ejemplo de ello son la embolia gaseosa resultante del bycatch o la contaminación acústica o las infecciones derivadas de la inmunosupresión de los animales, la cual puede tener su origen en la exposición a ciertos xenobióticos o en el estrés crónico o agudo.

## 2. El sistema inmunitario y la hemostasia en mamíferos marinos: Relevancia en estudios de toxicidad y en el control sanitario de animales en cautividad.

### 2.1. El sistema inmunitario y sus respuestas.

El sistema inmunitario es el conjunto de estructuras y procesos biológicos que defiende al organismo de agresiones externas, ya sean de naturaleza biológica o físico-química o incluso de agresiones internas, en el caso de las células cancerosas. Este sistema está compuesto por elementos formes (células, tejidos y órganos) y elementos solubles (proteínas y moléculas pequeñas), que definen varias barreras defensivas frente a la entrada de agentes patógenos en el organismo.

En primer lugar, las barreras físicas, como la piel o las mucosas, son la primera línea de defensa frente a los invasores microbianos. A ellas, se añaden los mecanismos de autolimpieza, como la tos, los estornudos y el flujo mucoso en el sistema respiratorio, el vómito y la diarrea en el sistema digestivo o la orina en el sistema urinario. Además, tanto en la piel como en el tracto digestivo existe una microbiota fisiológica y bien adaptada que excluye por competición a los microorganismos exógenos (Tizard, 2009 a).

La segunda barrera defensiva es la inmunidad innata, que abarca todos los mecanismos bioquímicos o celulares de respuesta rápida frente a la entrada de microorganismos patógenos. La velocidad en su actuación se debe a que la respuesta se lleva a cabo por células y moléculas que están presentes de manera constante en los líquidos biológicos. Se trata de una respuesta inespecífica, ya que actúa de la misma manera ante cualquier agente y no presenta mecanismos de memoria. Esta inmunidad se basa en las diferencias físico-químicas entre los patógenos y los componentes normales del organismo (Tizard, 2009 a).

La última barrera defensiva es la inmunidad adquirida o específica, que es el sistema de defensa que reconoce y destruye a los patógenos y aprende de este proceso desarrollando una memoria, gracias a la cual, si el organismo vuelve a enfrentarse con el mismo microorganismo, el sistema inmunitario específico lo destruirá con mayor eficiencia y velocidad.

### 2.1.1. Respuesta inmunitaria innata

Ante una invasión microbiana se pueden generar dos tipos de señales, tras las cuales se activa la inflamación. Por un lado, los patrones moleculares asociados con los microorganismos invasores (PAMP) y por otro, las alarminas, moléculas liberadas tras la lesión o la muerte celular durante el daño tisular.

Los PAMP son moléculas conservadas que se expresan en muchos tipos de microorganismos y son reconocidos por determinados receptores (PRR) presentes en células centinela como los macrófagos, eosinófilos, células epiteliales del tracto respiratorio o intestinal, células dendríticas y mastocitos, que se localizan en superficies corporales o en zonas próximas. Los PRR más importantes son los receptores de tipo Toll (TLR), que pueden ser extracelulares (TLR 2, 4 y 5), que reconocen proteínas, lipoproteínas y lipopolisacáridos microbianos; o intracelulares (TLR 3,7 y 9), que reconocen ácidos nucleicos virales. Otros receptores importantes que cabe destacar son los receptores tipo NOD (NLR), normalmente implicados en detectar virus o bacterias intracelulares, ya que reconocen PAMP intracelulares. (Tizard , 2009b) (Figura 9 A).

Cuando el receptor de la célula centinela se une al PAMP, se produce una señal en la célula que resulta en la liberación de citoquinas y otras moléculas que promueven la respuesta inflamatoria (Figura 9 B). Entre las proteínas más importantes que se liberan, hay citoquinas como las interleuquinas IL-1 e IL-6 o el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), que poseen propiedades vasoactivas y quimiotácticas. También se expresan enzimas como la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), que genera óxido nítrico y otras sustancias oxidantes, o la ciclooxigenasa 2 (COX-2) que produce lípidos inflamatorios, leucotrienos y prostaglandinas, que desempeñan un papel importante en la inflamación, potenciando la vasodilatación y el aumento en la permeabilidad vascular.

Algunos tipos celulares, como los macrófagos o monocitos, liberan también quimioquinas, para inducir la migración celular hacia la zona de inflamación. Algunas de estas moléculas son capaces de activar los nociceptores generando dolor y provocando que los nervios de la zona liberen péptidos bioactivos (Tizard, 2009 b; León-Regal et al., 2016). Los mastocitos liberan histamina y el propio tejido lesionado también produce otras moléculas vasoactivas de naturaleza lipídica o proteica, que actúan sobre los vasos sanguíneos incrementando el flujo de sangre a través de los capilares y facilitando la interacción de neutrófilos y monocitos con

el endotelio vascular (León-Regal et al., 2016). En la Tabla 1 se detalla la función de algunos de los principales mediadores químicos de la inflamación.

Por su parte, los productos liberados por el patógeno o las alarminas activan la expresión de la glicoproteína selectina-P (CD62-P) en las células endoteliales de los capilares. La selectina-L (CD62-L), de la membrana de neutrófilos y monocitos circulantes, se une de forma transitoria a la CD62-P del endotelio, ralentizando el flujo de estas células en la zona lesionada. Mientras la célula fagocítica rueda sobre el endotelio, las células endoteliales secretan el factor de activación plaquetario (PAF), que activa a los neutrófilos para expresar la integrina CD11a/CD18 (LFA-1), molécula de adhesión que potencia la unión fuerte entre los neutrófilos y la molécula de adhesión intercelular-1 del endotelio (ICAM-1), paralizándolos por completo (Figura 10).

| Mediador químico                                    | Función  |
|---|--|
| Citoquinas (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ...)           | Activación del endotelio y quimiotaxis   |
| Óxido nítrico                                       | Citotoxicidad, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.                      |
| Especies reactivas de oxígeno (ROS)                 | Aumento de la permeabilidad vascular y daño endotelial y tisular.                          |
| Factor de activación plaquetario (PAF)              | Aumento de permeabilidad vascular y adhesión leucocitaria al endotelio.                    |
| Prostaglandinas                                     | Vasodilatación y activación de nociceptores y otros mediadores químicos de la inflamación. |
| Leucotrienos B4                                     | Activación leucocitaria, quimiotaxis y adhesión.   |
| Leucotrienos C4, D4, E4                             | Aumento de la permeabilidad vascular.  |
| Productos del sistema de complemento (C3a, C5a...). | Aumento de la permeabilidad vascular   |
| Histamina   | Aumento de la permeabilidad vascular.  |

Tabla 1. Mediadores químicos de la inflamación y su función.

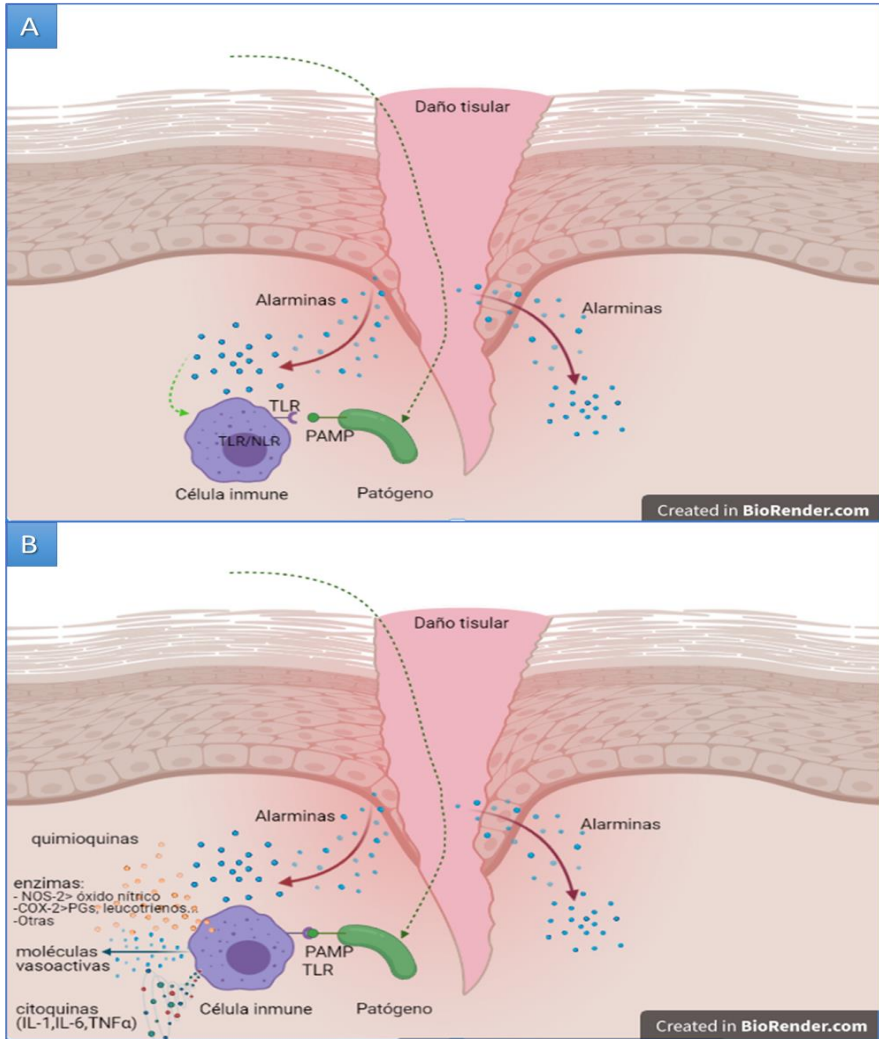


Figura 9. (A) Activación de las células inmunitarias mediante la unión de sus receptores al PAMP del patógeno o mediante la acción de las alarminas. (B) Liberación de citoquinas y moléculas proinflamatorias.

En el caso de los monocitos, estos expresan integrinas de tipo  $\beta 2$ , que se unen a la ICAM-endotelial. Los compuestos quimioatrayentes procedentes del tejido infectado y lesionado atraen a los neutrófilos y monocitos hacia el tejido, introduciéndose entre las células endoteliales en el proceso conocido como diapédesis, hasta llegar al tejido infectado (Figura 11). Los monocitos tardan más tiempo en llegar que los neutrófilos, y una vez allí maduran transformándose en macrófagos (Tizard, 2009 c).

También se desencadena una vasodilatación que promueve la llegada a la zona de más células inmunitarias capaces de destruir al patógeno, con el fin último de evitar la diseminación de la infección al resto del organismo. Esta vasodilatación lleva a un aumento en la permeabilidad vascular, que facilita el paso de neutrófilos y monocitos a la zona afectada y la extravasación del plasma, causando el edema característico. La vasodilatación y el aumento en el flujo sanguíneo en la zona afectada tienen también como consecuencia el enrojecimiento y el calor característicos de la zona inflamada (León-Regal et al., 2016) (Figura 12).

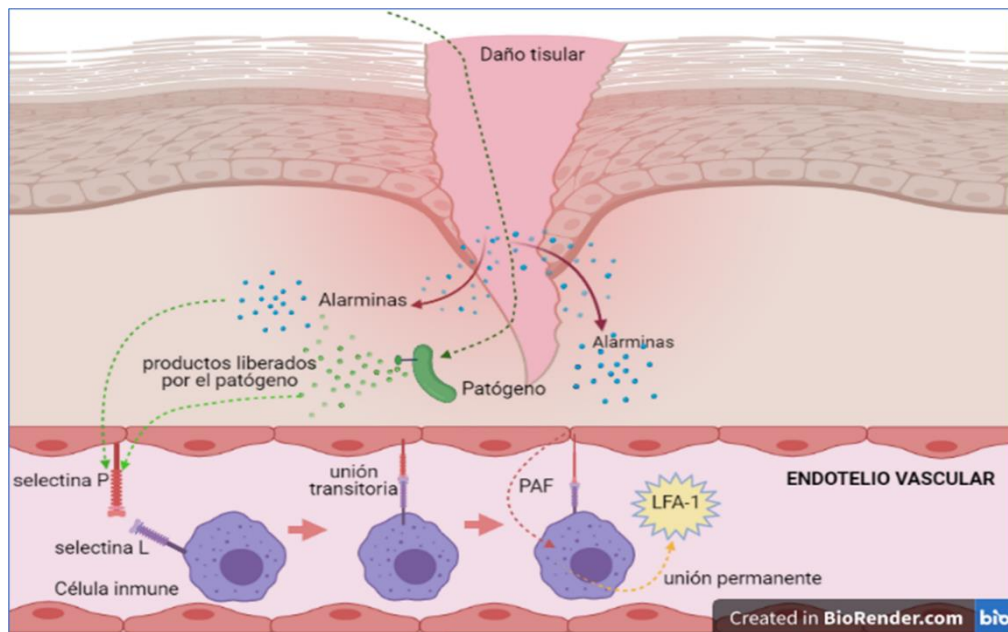


Figura 10. Rodadura de los neutrófilos por el endotelio y adhesión.

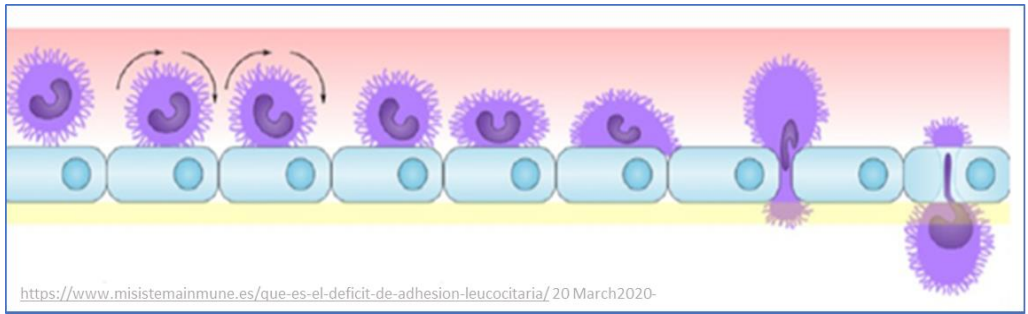


Figura 11. Proceso de diapedésis.

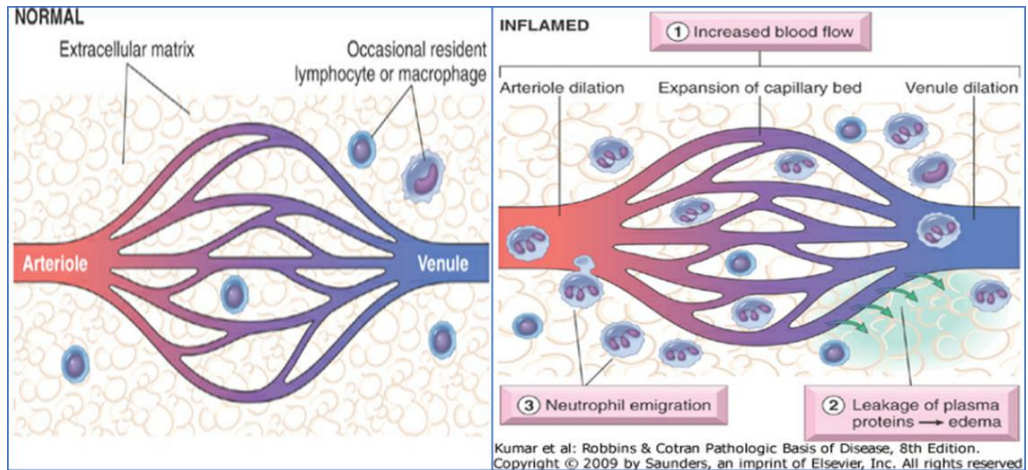


Figura 12. Vasodilatación, aumento del flujo sanguíneo, enrojecimiento y edema característicos del proceso de inflamación.



Una vez que los neutrófilos y macrófagos se localizan en el tejido afectado, las integrinas de la matriz extracelular, el  $TNF\alpha$  liberado por las células inmunitarias activadas en la zona dañada y otros agentes quimiotácticos, como CXCL8 (precursor de la IL-8) o C5a, activan a los fagocitos. Las células activadas liberan elastasa, defensina y moléculas oxidantes con los que potencian la adhesividad al patógeno y la generación de más  $TNF\alpha$ , que actuará como agente quimiotáctico. Los agentes quimiotácticos producidos por las células inmunes que actúan en la zona o por el propio patógeno, atraen a los fagocitos hacia los lugares de invasión con mayor concentración en estas moléculas. Para desplazarse hacia esas zonas, éstos emiten proyecciones de su membrana denominadas lamelipodios. Los macrófagos son capaces de secretar colagenasas que destruyen el tejido conjuntivo, desorganizando la matriz extracelular para penetrar mejor en el tejido lesionado (Figura 13).

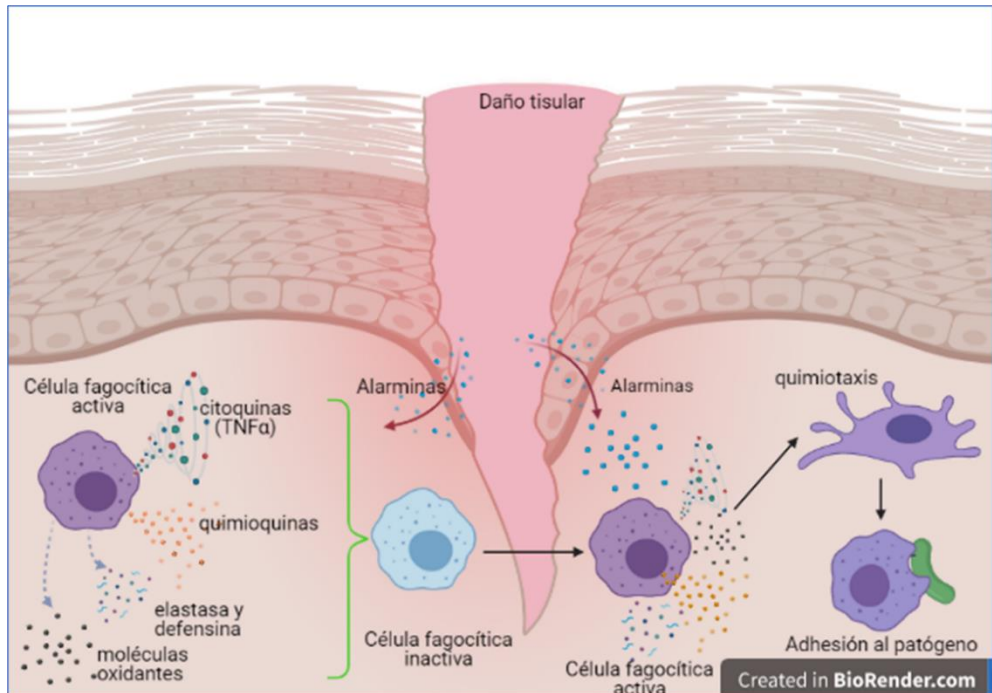


Figura 13. Proceso de activación de la célula fagocítica en el espacio extracelular, quimiotaxis y adhesión al patógeno.

Una vez que el fagocito localiza al patógeno debe unirse a él. Las bacterias y las células suelen estar cargadas negativamente, por lo que se repelen, de manera que para que se produzca la adherencia en estos casos deben intervenir moléculas cargadas positivamente que neutralicen la carga negativa del patógeno. Estas moléculas son las opsoninas, entre las cuales encontramos moléculas del sistema de complemento o algunos anticuerpos (Hiemstra y Daha, 1998) (Figura 14).

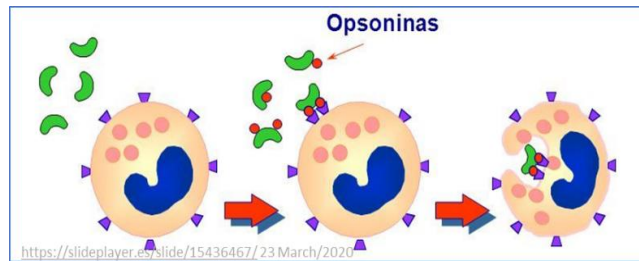


Figura 14. Proceso de opsonización.

Los receptores de membrana de las células fagocíticas pueden reconocer a sus ligandos en la superficie del agente infeccioso o a las opsoninas que lo recubren. Tras la adhesión del fagocito al patógeno, se estimula la polimerización de la actina F que tiene como resultado la formación de lamelipodios capaces de englobar al patógeno hasta retenerlo en una vacuola denominada fagosoma (Figura 15 A).

La destrucción del patógeno se produce a través de dos procesos principales: la liberación de enzimas líticas desde los gránulos intracelulares del granulocito y el estallido respiratorio. Los lisosomas presentes en las células fagocíticas son vacuolas intracelulares con enzimas en su interior. Durante la fagocitosis el fagosoma y el lisosoma se fusionan formando el fagolisosoma, donde las enzimas lisosomales como lisozimas, proteasas, hidrolasas ácidas y mieloperoxidasa digieren las paredes bacterianas y comienzan a destruir al patógeno. Cabe destacar que las células inmunes contienen también péptidos capaces de formar poros en la membrana del patógeno que acaban por destruirlo. En ocasiones, estos péptidos se pueden encontrar también en el espacio extracelular (Figura 15 A) (Verhoef, 1998; Tizard, 2009 c).

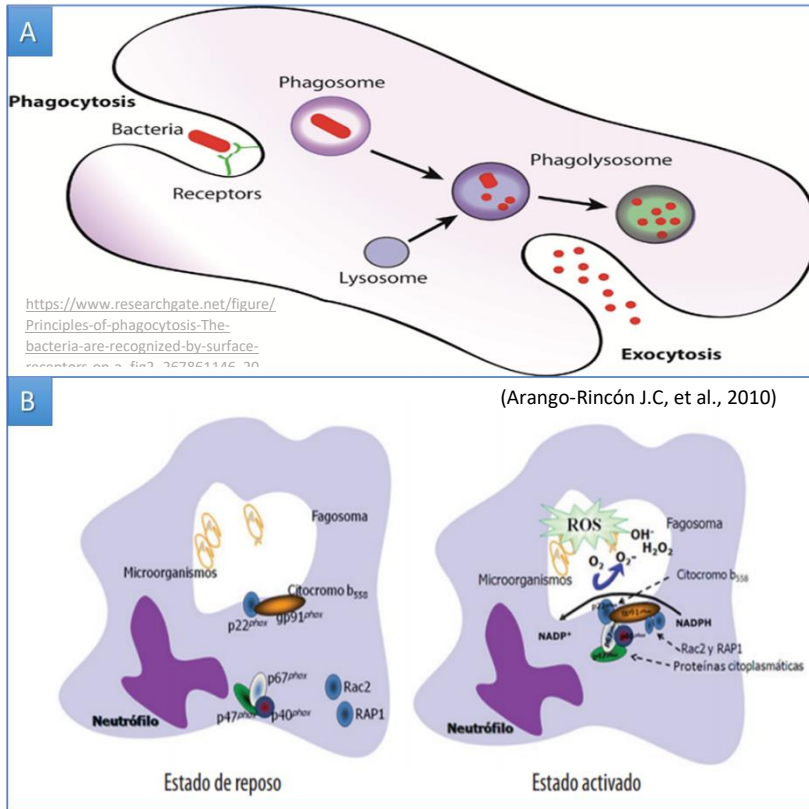


Figura 15. (A) Resumen del proceso de fagocitosis: Ingestión del patógeno, formación del fagolisosoma, destrucción del patógeno y eliminación de los restos por exocitosis. (B) Formación de la NADPH oxidasa por el ensamblaje de sus componentes durante la activación celular.

En el fagolisosoma tiene lugar también el estallido respiratorio. La enzima NADPH oxidasa (NOX) es un complejo enzimático en la superficie celular cuyos componentes están separados en las células en reposo, sin embargo, con la activación del fagocito se unen ensamblando NOX (Figura 15 B) (Arango-Rincón et al., 2010). Este complejo transforma el NADPH liberando electrones, que son captados por el oxígeno generando anión superóxido. Por su parte el NADP<sup>+</sup> acelera la vía de la hexosa monofosfato donde se transforma la glucosa en

pentosa y  $\text{CO}_2$ , generando energía. El anión superóxido se transforma en peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), y posteriormente el peróxido de hidrógeno reacciona a través de la mieloperoxidasa (MPO) con iones halógenos intracelulares, principalmente el cloro, dando como resultado el ión hipoclorito. Este ión destruye a los patógenos mediante la oxidación de sus proteínas y lípidos e intensifica las propiedades bactericidas de las enzimas del lisosoma (Figura 16). Para evitar daños a la propia célula, los neutrófilos poseen sistemas protectores frente a los radicales libres de oxígeno, como el glutatión, el ascorbato, el hierro o la vitamina E (Tizard, 2009 c).

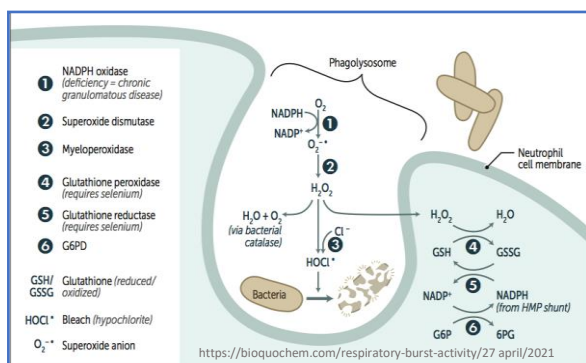


Figura 16. Fases del estallido respiratorio.

Los macrófagos actúan de manera más lenta que los neutrófilos y llegan más tarde a la zona de lesión, pero su respuesta frente al patógeno es más efectiva y repetitiva, pudiendo fagocitar más de una vez. Los neutrófilos, al contrario, llegan rápidamente a la zona lesionada, pero solo son capaces de fagocitar una vez, tras lo cual mueren y sus restos actúan como

agentes quimiotácticos para atraer a más neutrófilos y macrófagos a la zona. Además, los macrófagos estimulan la respuesta inmunitaria adquirida, mientras que los neutrófilos no son capaces de hacerlo. Al finalizar el proceso de fagocitosis, los macrófagos contribuyen a la reparación del tejido dañado, fagocitando las células dañadas, rotas o muertas.

### 2.1.2. Respuesta inmunitaria adquirida.

Para que la inmunidad adquirida se active es indispensable la acción de las células presentadoras de antígeno. Éstas son, fundamentalmente, las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B, siendo las primeras las más eficaces. Estas células se encuentran en los tejidos superficiales del organismo de forma natural, siendo las primeras células en detectar la entrada del patógeno y actuar contra él. Las células dendríticas están especializadas en capturar antígenos extraños, fragmentarlos en su interior mediante

proteólisis y exponer los fragmentos en la superficie celular sobre las moléculas de histocompatibilidad tipo II. De este modo, las células dendríticas se dirigen y presentan el antígeno a los linfocitos T cooperadores, normalmente localizados en sangre, ganglios, nódulos linfáticos y mucosas, que lo reconocen y activan la respuesta inmunitaria adquirida (Figura 17).

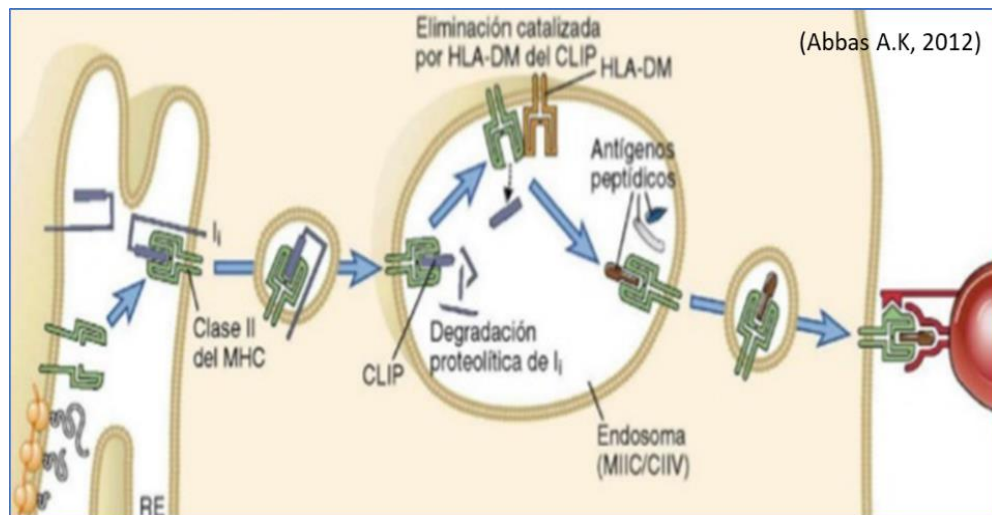


Figura 17. Exposición de los antígenos peptídicos a través de la MHC II de una célula presentadora de antígeno.

Los macrófagos también son células presentadoras de antígeno, pero su eficacia es menor debido a que fagocitan y destruyen a los antígenos en su interior y no son capaces de activar a los linfocitos T vírgenes, es decir, los linfocitos T que nunca han reconocido antes al antígeno. Los linfocitos B son células presentadoras de antígeno muy eficaces en respuestas inmunes secundarias, es decir, cuando el patógeno entra por segunda vez en el organismo o en veces sucesivas. Las células presentadoras de antígeno (CPA) son las únicas que pueden expresar las moléculas de histocompatibilidad tipo II (MHCII), mientras que todas las células nucleadas (incluyendo a las CPA), pueden expresar las moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHCI), que presenta el antígeno a los linfocitos T citotóxicos (Abbas, 2012).

Para entender la respuesta inmunitaria adquirida, se debe diferenciar correctamente los tipos de linfocitos que actúan en ella. Los linfocitos T colaboradores (Th) se encargan de regular la respuesta inmunitaria, mientras que los linfocitos T citotóxicos (Tc) destruyen células que presentan antígenos endógenos. Por su parte, los linfocitos B actúan en la defensa del organismo produciendo anticuerpos.

La célula presentadora de antígeno presenta los péptidos antigénicos retenidos por la molécula de histocompatibilidad tipo II (MHC II) a los linfocitos T colaboradores (Th), que los va a reconocer con su receptor de unión al antígeno (TCR). Cada linfocito Th está recubierto con muchos receptores antigénicos (TCR) idénticos con una misma especificidad antigénica. Estos receptores se forman aleatoriamente y al azar, de manera que hay un gran repertorio de TCRs distintos, y el antígeno por probabilidad se unirá al menos a uno de estos TCRs presentes en los linfocitos de una misma clonalidad. Cuando el TCR del linfocito entra en contacto con los péptidos antigénicos la célula se activa, liberando citoquinas, principalmente IL-2, y expresando el receptor para IL-2, y comienza a proliferar. En su activación también es imprescindible la acción de citoquinas estimulantes, procedentes normalmente de las células que están actuando en la inmunidad innata. Cuando la estimulación se produce en un linfocito Th virgen, parte de los linfocitos generados en la proliferación son resistentes a la apoptosis y no poseen acción efectora, y sobrevivirán como células de memoria en el organismo por largo tiempo, para presentar una mejor respuesta inmune ante una segunda entrada del antígeno (Figura 18).

Durante la proliferación de los linfocitos Th, éstos se diferencian en varios tipos de linfocitos Th, aunque dos de ellos son los más importantes. Por un lado, los Th1 son linfocitos efectores, que secretan IFN $\gamma$  (activador de macrófagos) e IL-2 y estimulan la producción por los linfocitos B de IgG, que es opsonizante. También activa a los linfocitos T citotóxicos, potenciando por tanto la respuesta inmunitaria celular. Los linfocitos Th1 son estimulados por la IL-12, generada durante la respuesta inmunitaria innata (Figura 18).

Por otro lado, los linfocitos Th también se pueden diferenciar en linfocitos Th2, que se activan por la acción de la IL-1, también sintetizada en la respuesta inmunitaria innata, o IL-4, y secretan IL-4, IL-10 e IL-13 entre otras. Estas citoquinas intervienen en la activación de los linfocitos B para que liberen anticuerpos, estimulando por tanto la respuesta inmune humoral. También existen otros tipos de linfocitos Th como los Th17, que al activarse

secretan IL-17, una citoquina importante en la activación de los neutrófilos (Tizard, 2009 d) (Figura 18).

Los linfocitos T citotóxicos (Tc) se pueden activar por la estimulación de los Th1, pero también pueden hacerlo a través de la presentación del antígeno a estas células por parte de moléculas de histocompatibilidad tipo I, presentes en todas las células nucleadas. De este modo, cualquier célula nucleada que presente el antígeno en su interior puede mostrarlo a los linfocitos Tc, que a través de su receptor TCR lo identifica y se activa. Tras la activación, el linfocito Tc libera IL-2, expresa el receptor para IL-2 y prolifera dando lugar a numerosos linfocitos Tc clonales, que acabarán liberando perforinas, que inducen la apoptosis de la célula infectada.

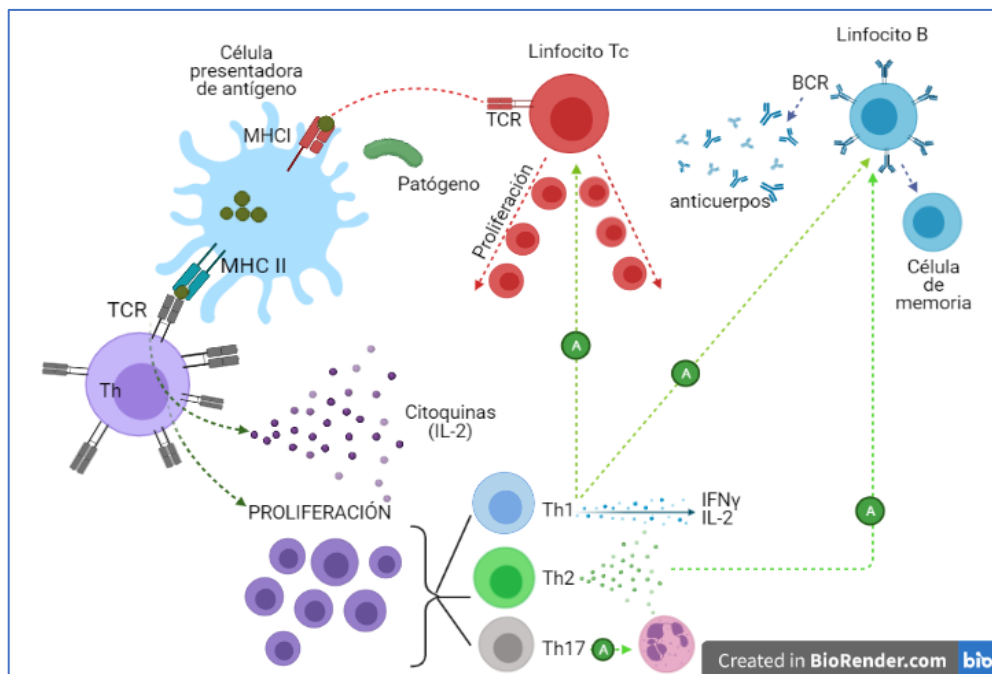


Figura 18. Diferenciación de los Linfocitos Th en Th1 y Th2 y sus respectivas funciones. Funciones de los linfocitos B y T citotóxicos.

Por su parte, los linfocitos B pueden activarse por reconocimiento directo del antígeno

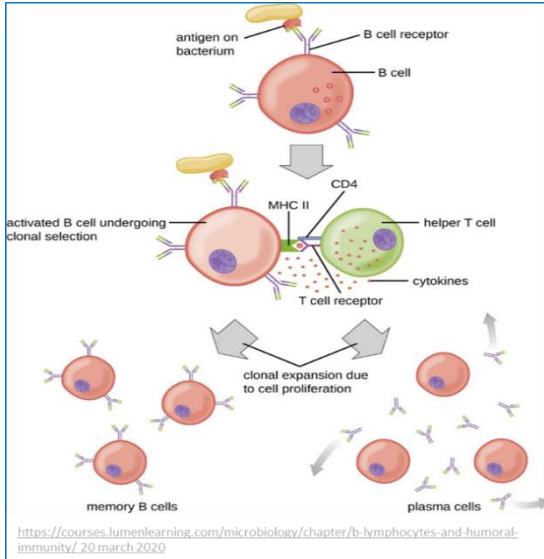


Figura 19. Proliferación y diferenciación de los linfocitos.

B.

se denominan anticuerpos, y actuarán activando a células NK, neutrófilos o al sistema de complemento, así como uniéndose al antígeno para neutralizarlo u opsonizarlo (Tizard, 2009 e).

mediante su receptor antigénico (BCR) o a través de la estimulación por los linfocitos Th2. En este caso, el linfocito B actúa como célula presentadora de antígeno y a través de moléculas MHCII expone péptidos antigénicos a linfocitos Th2, que al activarse liberan IL-4 entre otras citoquinas, las cuales activan a linfocitos B. En ambos casos, una vez activo, el linfocito B prolifera y se diferencia en células de memoria, que permanecerán almacenadas en los ganglios linfáticos, o en linfocitos B efectores, que tras la liberación de sus receptores BCR se transforman en células plasmáticas (Figura 19).

Una vez liberados, los receptores BCR

### 2.1.3. Bioenergética de las células inmunitarias.

La mitocondria es un orgánulo indispensable en el metabolismo energético de las células, siendo su principal función la producción de energía en forma de ATP mediante la fosforilación oxidativa. En este proceso intervienen una serie de complejos enzimáticos que forman la cadena transportadora de electrones (I, II, III, y IV) (Figura 19). Los electrones se transfieren a lo largo de la cadena transportadora generando energía, la cual se emplea para bombear protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranoso, creando un gradiente electroquímico en la membrana interna mitocondrial. Debido a este gradiente,



se genera un flujo de protones desde fuera hacia dentro de la matriz a través de la ATP sintasa (o complejo V), la cual aprovecha dicho flujo para formar moléculas de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico.

Más concretamente, en el ciclo de Krebs se producen NADH y FADH<sub>2</sub>, que donan sus electrones al complejo I y II respectivamente. Los electrones son posteriormente transportados al complejo III por la coenzima Q, y del complejo III al IV por el citocromo C, generando el bombeo de protones a través de los complejos I, II y IV hacia el espacio intermembranoso (Figura 19). Al final de la cadena, el oxígeno recoge los electrones y capta protones del medio para formar agua. El gradiente electroquímico generado a través de la membrana interna, denominado potencial de membrana mitocondrial, es del orden de 180 mV negativos con respecto al citosol, lo que supone una separación a través de la membrana interna de dos compartimentos con diferentes concentraciones de protones, habiendo por tanto una diferencia en la concentración y en la distribución de la carga a un lado y otro de la membrana. Esto genera una fuerza proton-motriz, que devuelve los protones a la matriz mitocondrial a través de la ATP sintasa, produciendo ATP (Stryer et al., 2004) (Figura 20).

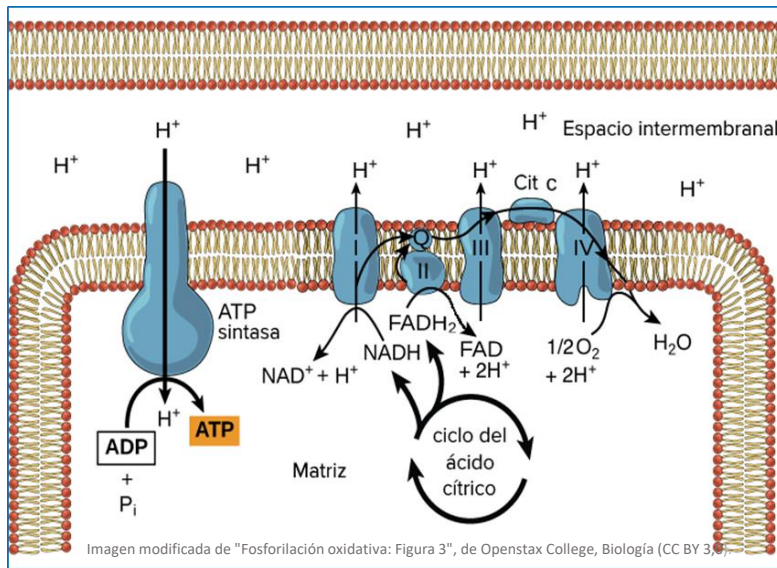


Figura 20. Proceso de fosforilación oxidativa mediante la cadena de transporte de electrones.

El ATP producido en la mitocondria se transfiere al citosol a través de porinas de la membrana externa mitocondrial denominadas VDAC (voltage-dependent anion channel).

Durante el transporte mitocondrial de electrones se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) en la mitocondria, siendo el principal lugar de producción el complejo III de la cadena respiratoria. Cada día se producen grandes cantidades de anión superóxido en la mitocondria, que a su vez es neutralizado por la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso.

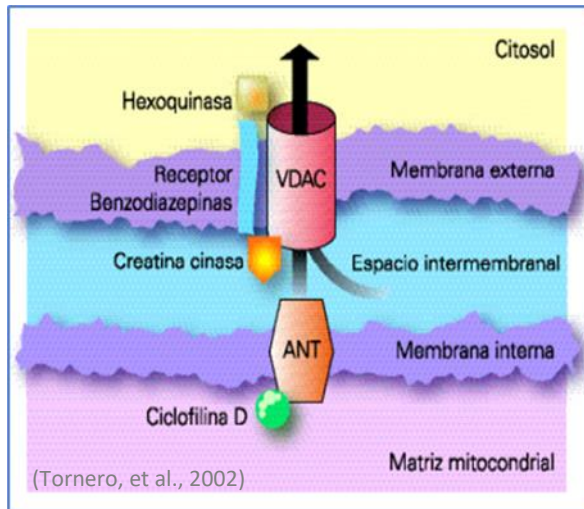


Figura 21. Componentes del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.

Las mitocondrias tienen también un papel fundamental en la muerte celular programada. Cuando la mitocondria se expone a algún estímulo apoptótico se forma el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM), que conecta el citosol celular con la matriz mitocondrial. Este poro o canal, es un complejo multiproteico formado por la unión de proteínas citoplasmáticas (hexoquinasa), de la membrana externa (VDAC), de la membrana interna (ANT) y de la matriz mitocondrial (ciclofilina D), que en estado basal se encuentran separadas (Figura 21). Su apertura

genera una disminución del potencial de membrana mitocondrial, y por tanto de la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa. Cuando la apertura del canal es sostenida en el tiempo, la mitocondria se hincha debido a la entrada de agua procedente del citosol, lo cual daña su membrana externa, liberándose así moléculas del espacio intermembranoso de la mitocondria al citoplasma celular. Algunas de las moléculas que viajan hacia el citosol tienen actividad proapoptótica, como el citocromo C, determinadas caspasas o el factor inductor de apoptosis (AIF), que una vez en el citosol activan diferentes rutas apoptóticas en la célula (Tornero et al., 2002). Por otro lado, la mitocondria también

presenta mecanismos de protección frente a la apoptosis, como son algunas proteínas de la familia Bcl. Ante una disfunción mitocondrial se puede producir una generación masiva de especies reactivas de oxígeno, que, a su vez, pueden desencadenar la muerte celular (Stryer et al., 2004).

Así pues, como vemos, alteraciones en la funcionalidad o vitalidad celular pueden conllevar una disfunción mitocondrial, que en la mayoría de los casos irá acompañada de cambios en el potencial de membrana mitocondrial. Un ejemplo claro es el caso del efecto del triclosán en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. El triclosán es un antimicrobiano presente en muchos cosméticos de uso diario como las pastas dentífricas, los enjuagues bucales, jabones, cremas o desodorantes. A través de las aguas residuales, el triclosán alcanza el ecosistema marino y se acumula en los organismos que en él habitan. Se ha demostrado que este compuesto genera cambios importantes en la homeostasis del calcio intracelular y una superproducción de ROS en este alga verde, generando estrés oxidativo que desencadena daños en la membrana celular y mitocondrial y por tanto su despolarización, llegando finalmente a la apoptosis (Gonzalez-Pleiter et al., 2017).

#### **2.1.4. La apoptosis como mecanismo regulador de la función inmunitaria.**

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada producida para el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, aunque agentes exógenos, como determinados contaminantes pueden producir la activación de este proceso. Durante la apoptosis las células sufren cambios morfológicos en la membrana, se descondensan el núcleo y el citoplasma, y la cromatina nuclear se compacta y fragmenta.

En las células sanas, los fosfolípidos de la membrana celular están distribuidos asimétricamente, presentándose en la monocapa externa fosfatidilcolina y esfingomiélin, y en la monocapa interna fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositoles. Cuando las células entran en apoptosis, la membrana celular sufre una redistribución que expone la PS hacia la superficie externa de la membrana, cuando ésta aún permanece intacta. En estadios más avanzados del proceso apoptótico, la membrana se daña y deja de proteger el interior celular, dejando al descubierto sus estructuras. La PS es reconocida por los macrófagos, que fagocitarán a la célula apoptótica durante el daño tisular.

## 2.2. La funcionalidad plaquetaria y su papel en la hemostasia.

Las plaquetas son fragmentos celulares anucleados, esenciales para el proceso de la hemostasia primaria. Proviene de la fragmentación de los megacariocitos, dando lugar a plaquetas reticuladas que tras madurar son liberadas al torrente sanguíneo como plaquetas, estructuras con forma discoide con aproximadamente un diámetro de 3  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.1. Adhesión de la plaqueta a la matriz subendotelial.

Cuando se produce una lesión vascular, queda expuesta la matriz subendotelial, donde se encuentran colágeno, fibronectina, laminina, vitronectina, trombospondina y factor de Von Willebrand (vWF), algunos de los agonistas plaquetarios principales. Además, como resultado de la lesión, se forman sustancias como trombina o factor de activación plaquetario, que también ejercen un efecto activador en las plaquetas. Algunas hormonas circulantes como adrenalina y vasopresina potencian dicha activación y las plaquetas ya activadas liberan más moléculas agonistas como ADP, tromboxanos  $A_2$  o serotonina. Por su parte, para contrarrestar esta fuerte respuesta de activación, las células endoteliales liberan inhibidores de la activación plaquetaria como óxido nítrico o prostaglandinas (PG) como la PGL<sub>2</sub> (Monteiro et al., 2001) (Figura 22).

La adhesión a la matriz subendotelial es un proceso pasivo en el cual la plaqueta se une al colágeno y a otras moléculas de la matriz a través del complejo glicoproteico de membrana GPIa/IIa. Cuando el flujo sanguíneo presenta un alto coeficiente de cizallamiento, las plaquetas se unen al colágeno a través de su glicoproteína GPIb/IX/V, utilizando como ligando el vWF.

Tras la adhesión a la matriz subendotelial y/o tras la unión de alguno de sus otros agonistas a su receptor de membrana en la plaqueta, las plaquetas se activan comenzando así el proceso de modulación de la actividad de enzimas plaquetarias y canales iónicos.

### 2.2.2 Activación plaquetaria.

#### 2.2.2.1 Transducción de señales en la activación plaquetaria.

En la activación de las plaquetas, las proteínas G plaquetarias adquieren un papel fundamental. Estas proteínas están formadas por las subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$  y  $G\gamma$ . En las

plaquetas en reposo, la subunidad  $G\alpha$  está unida a GDP, sin embargo, tras la unión de los agonistas a sus receptores de membrana, el GDP se sustituye por GTP y la subunidad  $G\alpha$  unida al GTP se disocia de las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$ , desencadenando la modulación de enzimas y canales plaquetarios. Progresivamente el GTP se va hidrolizando a GDP de nuevo, momento en el cual la subunidad  $G\alpha$  unida al GDP se asocia de nuevo a las subunidades  $G\beta$  y  $G\gamma$  (Monteiro et al., 2001). La modulación de las enzimas que se desencadena a raíz de este proceso se resume en la activación de determinadas fosfolipasas y tirosina quinasas y la inhibición del AMPc:

a) Activación de fosfolipasas:

Las principales fosfolipasas activadas en este proceso son la fosfolipasa C y la fosfolipasa A<sub>2</sub>.

La fosfolipasa C hidroliza los fosfoinosítidos, produciendo inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). El IP<sub>3</sub> desencadena la liberación de calcio desde el sistema tubular denso al citosol, aumentando la concentración de calcio citosólico en la plaqueta, lo cual es un estímulo importante para otros sistemas necesarios en la activación plaquetaria (Brass y Joseph, 1985) (Figura 22). El DAG activa la proteína-quinasa C, que promueve la secreción de los gránulos, la expresión del receptor para el fibrinógeno y la fosforilación de determinadas proteínas.

La fosfolipasa A<sub>2</sub> promueve la liberación de ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de la membrana. El AA entra en la vía de la ciclooxigenasa para producir endoperóxidos de prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), que activan la liberación de gránulos  $\alpha$  y gránulos densos (Figura 22). Los gránulos densos contienen calcio, serotonina, ADP, ATP y otros agonistas. Los gránulos  $\alpha$  liberan proteínas adhesivas como vWF, fibronectina, trombospondina y fibrinógeno que estimulan los procesos de adhesión y agregación plaquetaria y la reparación de los vasos lesionados (Benton et al., 1982).

b) Activación de tirosina quinasas y proteínas RAS:

Las tirosina quinasas son esenciales en la transducción de señales en la activación plaquetaria, mientras que las proteínas RAS son proteínas de bajo peso molecular que actúan en la disociación o asociación del GTP y GDP a las proteínas G y activando la fosforilación de proteínas asociadas al citoesqueleto o a los microtúbulos plaquetarios (Monteiro et al., 2001) (Figura 22).

### c) Inhibición de la síntesis de AMPc:

Muchos agonistas plaquetarios como el ADP, la trombina o la adrenalina inhiben la formación de AMPc, que es un inhibidor de la activación de las plaquetas. Sin embargo, algunas moléculas generadas en el proceso de activación, como las prostaglandinas, estimulan su formación. El AMPc inhibe la activación plaquetaria disminuyendo el incremento de calcio citosólico plaquetario mediante su recaptación por el sistema tubular denso. También el GMPc potencia la actividad del AMPc, retrasando su degradación y por tanto disminuyendo la activación plaquetaria. Los agonistas plaquetarios potencian la activación plaquetaria al inhibir la producción de AMPc, antagonista natural de este proceso (Monteiro et al., 2001).

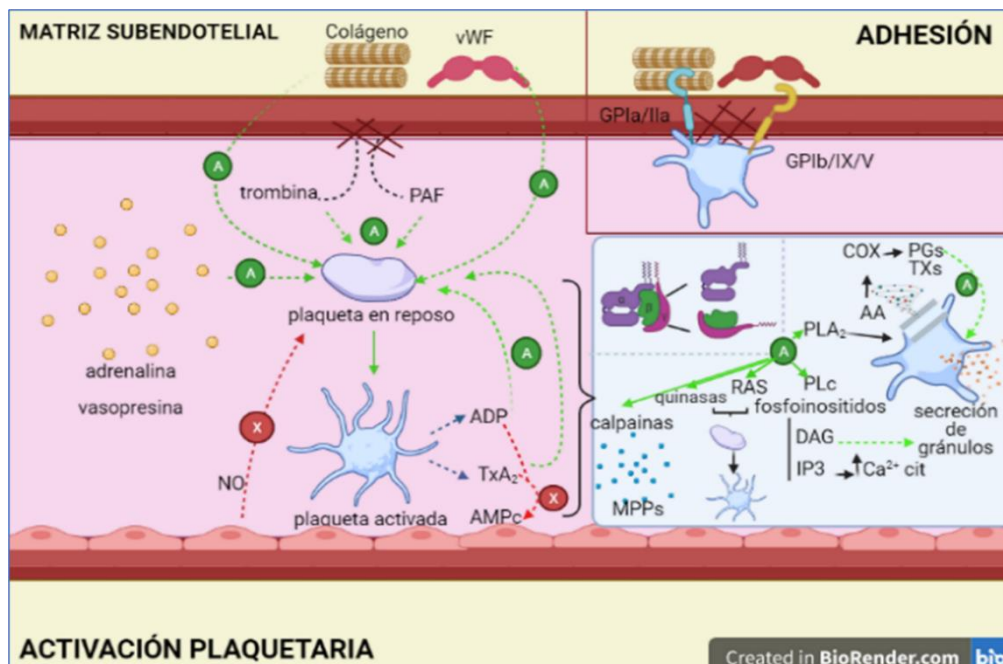


Figura 22. Procesos principales durante la activación plaquetaria. La plaqueta en reposo se activa al contactar con diferentes agonistas (trombina, PAF, vWF, colágeno, adrenalina...). Se adhiere a la matriz endotelial de forma pasiva y una vez activada promueve la activación de fosfolipasas, quinasas y proteínas que desencadenan el cambio de forma de la plaqueta, el aumento de calcio citosólico y la liberación de los gránulos y micropartículas plaquetarias.

d) Movilización de calcio citosólico:

Durante la activación plaquetaria se produce un aumento de calcio citosólico, determinante para la producción de una correcta respuesta funcional de la célula. En las plaquetas en reposo, la concentración de calcio intracelular es muy inferior a la concentración extracelular debido a que la membrana plasmática es principalmente impermeable a este ion. Por otro lado, en reposo, el calcio intraplaquetario se encuentra almacenado en diferentes estructuras, principalmente en el sistema tubular denso, pero también en mitocondrias, gránulos densos, gránulos  $\alpha$  y la cara interna de la membrana plasmática.

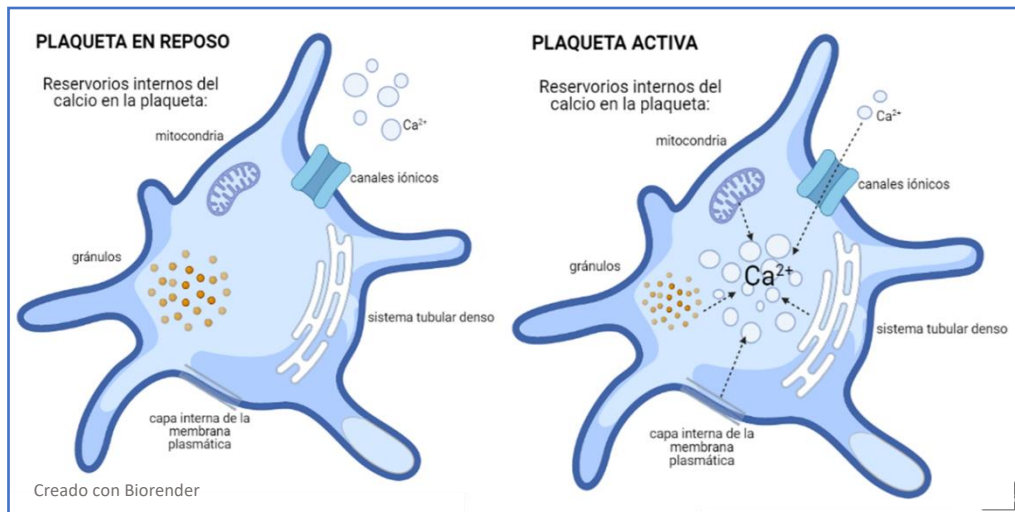


Figura 23. Liberación de calcio desde los reservorios internos al citosol y entrada del calcio desde el espacio extracelular a la plaqueta durante la activación plaquetaria.

Tras la unión de la plaqueta a uno de sus agonistas, el calcio se libera al citosol desde los orgánulos de almacenamiento. Por otro lado, se activan los canales iónicos de calcio para permitir la entrada de calcio extracelular al citoplasma plaquetario. El aumento de calcio citosólico activa diferentes moléculas como las quinasas dependientes de calcio/calmodulina, las proteasas dependientes de calcio, la proteína quinasa C y las fosfolipasas C y  $A_2$ . La función de las tres últimas moléculas se ha explicado anteriormente (Figura 23).

e) Activación de las quinasas dependientes de calcio/calmodulina:

Tiene dos consecuencias principales: el aumento de ATP citosólico, determinante en la activación del aparato contráctil de la plaqueta y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina, que desencadena el cambio de forma y contracción de la plaqueta, así como la secreción de gránulos densos y gránulos  $\alpha$  (Broekman et al., 1980).

f) Activación de las proteasas dependientes de calcio (Calpaína I y II):

Estimulan la reorganización del citoesqueleto y la agregación plaquetaria mediante la fragmentación de la proteína ligadora de actina y talina. Por otro lado, actúan en la liberación de micropartículas, que se detallará en el siguiente apartado.

#### 2.2.2.2 Cambio de forma de la plaqueta.

Tras la adhesión de las plaquetas al subendotelio y su activación, se llevan a cabo múltiples reacciones en cadena y la liberación de numerosas moléculas, que van a ser indispensables en el cambio de forma de la plaqueta, la agregación plaquetaria, secreción de gránulos, expresión de la actividad procoagulante y liberación de micropartículas.

El cambio más inmediato que se da en las plaquetas una vez activadas es el cambio de forma. El citoesqueleto se reorganiza formando pseudópodos gracias a la acción de moléculas como las calpaínas y a la formación de haces por parte de los filamentos de actina. Por su parte, y derivado de la acción de moléculas como las quinasas dependientes de calcio, la miosina se incorpora al citoesqueleto contribuyendo al cambio de forma de la plaqueta y a la centralización de los gránulos y microtúbulos. La actina y la miosina se unen dotando a la plaqueta de capacidad de movimiento, basado en la extensión y contracción (Furman et al., 1993).

#### 2.2.2.3. Agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria consiste en la unión de plaquetas activadas entre sí. Entre otras cosas, las plaquetas activadas expresan receptores de membrana para la unión plaqueta-plaqueta, como el receptor para el fibrinógeno, expresado por la acción de la proteína quinasa C. El fibrinógeno forma un puente irreversible entre las plaquetas. El vWF también actúa de forma importante en la agregación plaquetaria en condiciones de cizallamiento



elevado. A su vez, las plaquetas agregadas retroalimentan positivamente este proceso de agregación liberando más ADP y tromboxanos (Monteiro et al., 2001).

#### 2.2.2.4. Secreción de sustancias almacenadas en los gránulos.

Como hemos visto, los gránulos se redistribuyen hacia el centro del citoplasma mientras la plaqueta sufre cambios morfológicos. En esta zona las membranas de los gránulos y del sistema canalicular abierto se fusionan liberando el contenido del gránulo al exterior. Este proceso se produce fácilmente en el caso de los gránulos  $\alpha$  y gránulos densos, pero la secreción por parte de los lisosomas requiere de estímulos muy fuertes. Como se ha mencionado, los gránulos densos contienen calcio, serotonina, ADP, ATP y otros agonistas. Los gránulos  $\alpha$  liberan proteínas adhesivas como vWF, fibronectina, trombospondina y fibrinógeno, que estimulan los procesos de adhesión y agregación plaquetaria y la reparación de los vasos lesionados (Monteiro et al., 2001).

#### 2.2.2.5. Expresión de actividad procoagulante y liberación de micropartículas.

Las plaquetas activadas exponen la fosfatidilserina (PS) hacia la cara externa de la membrana, normalmente localizada en la cara interna. De esta manera, pueden unirse a la PS los componentes del complejo protrombina para generar trombina. Algunos de estos componentes son proporcionados por las propias plaquetas activadas, como el factor V, presente en los gránulos  $\alpha$ . Este proceso va acompañado de la liberación de micropartículas plaquetarias, fomentado por la acción de las calpaínas y del calcio citosólico, el cual inhibe la traslocasa (cuya función es transportar la PS de la capa externa a la interna de la membrana) y activa la enzima escramblasa (que potencia el movimiento aleatorio de lípidos a través de las capas de la membrana) (Figura 24).

Las micropartículas plaquetarias son pequeños fragmentos de la membrana plaquetaria (de entre 0.1 y 1 micras) que presentan funciones importantes en la comunicación entre células, transportando moléculas bioactivas y señalizando diferentes procesos en el organismo relacionados con la hemostasis y la trombosis. Las micropartículas estimulan a sus células diana uniéndose a sus ligandos en la membrana o transfiriendo receptores de superficie de una célula a otra.

Si bien la presencia de micropartículas plaquetarias en el torrente sanguíneo es normal, constituyendo entre un 70% y un 90% de todas las micropartículas circulantes, un aumento

en la concentración de estas estructuras puede estar asociada con determinadas patologías como trombocitopenia, trombosis arterial o artritis reumatoide entre otras (Italiano et al., 2010).

Por otro lado, también se ha descrito el aumento en la concentración de micropartículas procedentes de plaquetas y otros tipos celulares, en individuos con síndrome del buceador o enfermedad descompresiva (Thom et al., 2015).

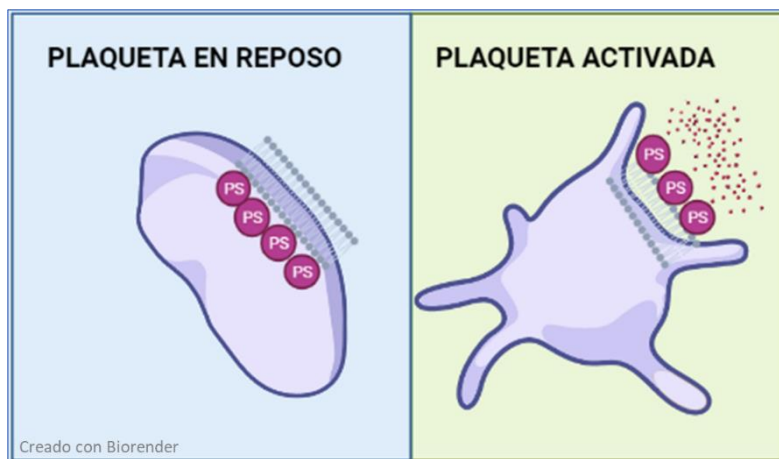


Figura 24. Expresión de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana y liberación de micropartículas plaquetarias.

## 2.3. Infección y estrés en mamíferos marinos: Consecuencias sobre la función inmunitaria y la hemostasia.

### 2.3.1 Principales patologías infecciosas en mamíferos marinos.

Los mamíferos marinos están expuestos a numerosos patógenos en su hábitat. Estos patógenos, pueden generar alteraciones a nivel inmunitario, ya sea debido a una activación leucocitaria para la destrucción del patógeno o a una inmunosupresión, a veces presente en determinadas infecciones víricas.

Las infecciones se pueden dividir en bacterianas, víricas, parasitarias o fúngicas. En cuanto a las infecciones bacterianas en los mamíferos marinos, éstas suelen ser secundarias a otros procesos. Algunas de las bacterias más comunes que afectan a estas especies son *Brucella ssp.* (Foster G, et al., 1996), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Geraci et al., 1966; Kinsel et al., 1997), *Salmonella ssp* (Minette 1986), o *Staphylococcus ssp.* (Palmer et al., 1991), entre otras. En cuanto a las infecciones víricas, algunas de las más importantes en estas especies son el morbilivirus, posiblemente el virus de mayor virulencia para estas especies y que suele acabar con la vida de los animales, estando muy relacionado con procesos de inmunosupresión (Rubio-Guerri et al., 2013). Otros virus frecuentes en cetáceos son el adenovirus y el papilomavirus (Malmberg et al., 2017; Rehtanz et al 2006). Algunas de estas infecciones víricas pueden ser devastadoras para las especies que se encuentran en peligro de extinción. Las infecciones parasitarias no suelen generar la muerte del animal, pero los debilitan potenciando la aparición de otros procesos patológicos. Algunos de los parásitos más comunes en mamíferos marinos son *Stenurus ssp.* (a nivel pulmonar), *Anisakis ssp* o el *Nasitrema ssp.*, produciendo este último, daños más serios como la encefalitis. Por último, hongos como el *Rhizopus microsporus* entre otros, pueden afectar las vías respiratorias de los cetáceos afectando a su inmunidad.

### **2.3.2. Estrés e inmunosupresión en mamíferos.**

Como es bien conocido, el estrés puede conllevar alteraciones fisiológicas importantes en los seres vivos, siendo una de ellas en el mundo animal, la inmunosupresión. En el caso de los mamíferos, la respuesta al estrés está regulada por el sistema nervioso central (SNC), concretamente por el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. Ante un estímulo estresante, el hipotálamo segrega la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula a la hipófisis o pituitaria para secretar la hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH), que a su vez estimula a las glándulas suprarrenales para liberar glucocorticoides. El glucocorticoide mayoritario en los mamíferos es el cortisol (Figura 25).

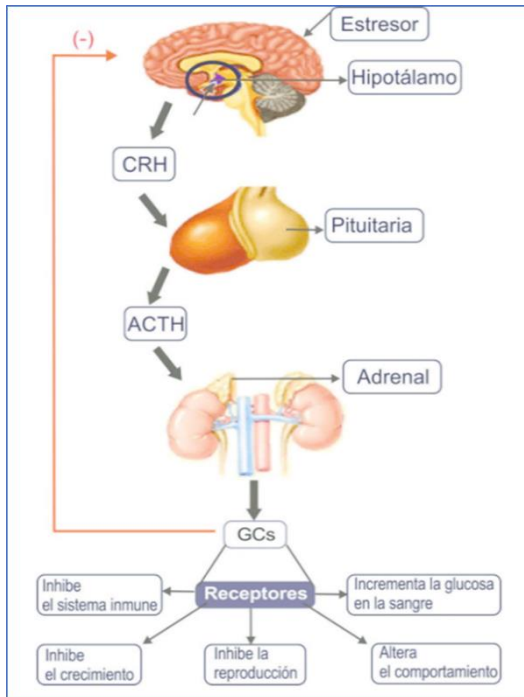


Figura 25. Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/b-lymphocytes-and-humoral-immunity/> 20 march 2020).

reacciones que alteran la producción de citoquinas y por tanto inhibiendo la maduración y movilización celular. En el caso de la adrenalina, puede actuar como agonista plaquetario.

Los glucocorticoides actúan a nivel de los órganos linfoides primarios y secundarios, linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos. Todas estas células presentan receptores para glucocorticoides de tipo II en su citoplasma. Cuando el cortisol se une a su receptor, este se trasloca al núcleo de la célula, donde altera la producción de numerosas proteínas, entre las que se encuentran citoquinas importantes para la respuesta inmune como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), las interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 o el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) (Gómez-González y Escobar, 2006).

Por otro lado, el sistema nervioso simpático, activado en las situaciones que el animal percibe como peligrosas, activa la liberación de adrenalina y noradrenalina al torrente sanguíneo, que aumentan la frecuencia cardíaca y respiratoria e incrementan el flujo sanguíneo en los músculos. Todo esto ocurre en detrimento de la funcionalidad de sistemas en ese momento menos importantes, como el digestivo, el reproductor, o el inmunitario, así como el proceso de crecimiento, para poder presentar una efectiva respuesta de huida o de lucha (Moscoso, 2009; Gómez-González y Escobar, 2006). Tanto los glucocorticoides como las catecolaminas afectan a la funcionalidad de las células inmunitarias al unirse a sus receptores específicos leucocitarios, desencadenando una serie de

Estos efectos a nivel inmunitario son mucho más notables cuando el animal padece estrés crónico. Por ello, los animales que viven en condiciones deficientes de bienestar tienden a sufrir cambios comportamentales, productivos e inmunosupresión (Broom, 2007). Esto es especialmente relevante en el campo de la producción animal, donde se han creado instituciones específicas para el control del bienestar animal en ganadería y granjas de producción, como el Farm Animal Welfare Committee. Según este organismo, para considerar que un animal vive en buenas condiciones de bienestar deben cumplirse cinco características: ausencia de hambre y sed, ausencia de incomodidad física o térmica, ausencia de enfermedad, ausencia de miedo o estrés y ausencia de conductas anormales (FAWC, 1979). Esta definición de bienestar animal ha traspasado la barrera de los animales de producción, aplicándose a los animales domésticos y también a los animales albergados en núcleos zoológicos.

Para determinar si los animales sufren estrés la medida del cortisol es un método sumamente aceptado, aunque no es el único método. El estudio de parámetros etológicos es un importante indicador de estrés en los animales, y de especial relevancia en el campo de los mamíferos marinos, donde la obtención de muestras es compleja en ocasiones. Situaciones estresantes pueden desembocar en conductas raras en los animales, en ocasiones incluso estereotipadas. Normalmente estos comportamientos van ligados a agresividad, vocalizaciones o respuestas psicósomáticas como vómitos, diarrea o pérdida de control en la micción o defecación (Harewood y McGowan, 2005; De Jong et al., 2013; Sanmiguel-Plazas et al., 2018). Parámetros fisiológicos como la temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria o electroencefalografía también pueden ser de gran ayuda, así como la medida de catecolaminas en orina. La electrofisiografía también se considera una técnica poco invasiva para determinar si el animal padece estrés basado en las señales bioeléctricas de su organismo, íntimamente relacionadas con cambios psicofisiológicos derivados del estrés (Sanmiguel-Plazas et al., 2018).

### ***2.3.3. Medicina preventiva y nuevos bioindicadores de estrés crónico.***

Debido a que en la naturaleza los animales salvajes no muestran signos de debilidad para evitar atraer depredadores, los cetáceos y pinnípedos no suelen presentar sintomatología hasta que la patología se encuentra ya en un estado muy avanzado. Es por ello, que la medida de la funcionalidad inmunitaria o plaquetaria de forma rutinaria puede ser una herramienta

muy útil en el diagnóstico precoz de determinadas patologías que se acompañen con inmunosupresión o sobreactivación de las células inmunitarias o con alteraciones a nivel plaquetario. Así pues, un animal asintomático podría empezar a padecer alteraciones a nivel inmunitario o plaquetario mucho antes de presentar signos clínicos. Estas medidas también pueden ayudar a evaluar la evolución de la enfermedad.

Para detectar alteraciones a nivel inmunitario o plaquetario en primer lugar se debe realizar un muestreo continuado en animales sanos para establecer los valores de referencia sobre los que relativizar las siguientes medidas.

#### **2.4. Conservación del medio marino: Efecto de contaminantes ambientales sobre la función inmunitaria y la hemostasia de los mamíferos marinos.**

Determinados compuestos presentes en el medio ambiente pueden alterar la funcionalidad del sistema inmunitario o plaquetario. En este sentido, la inmunotoxicología es la disciplina que pretende detectar, cuantificar e interpretar las alteraciones del sistema inmune producidas por la exposición a diferentes compuestos (Trizio et al., 1988). Los estudios toxicológicos *in vitro* son también aplicables a las plaquetas, aunque nunca se han desarrollado en mamíferos marinos.

La toxicidad se puede dar como una respuesta sistémica que desencadena finalmente y de forma indirecta una alteración en la función inmune o plaquetaria o por el contrario como un daño directo del tóxico sobre las células. Así pues, el compuesto puede disminuir la respuesta inmune (inmunosupresión) favoreciendo que el animal sufra infecciones. Se ha observado que numerosos cetáceos varados con infecciones víricas, presentaban altas concentraciones de contaminantes en sus tejidos (Duignan et al., 1992, Domingo et al, 1990; Aguilar y Borrell, 1994). Por otro lado, determinados contaminantes pueden exacerbar la respuesta inmunitaria generando alergias o enfermedades autoinmunes. La misma premisa se cumple en el caso de las plaquetas. Se ha demostrado que las plaquetas humanas ven alterada su funcionalidad ante la exposición a determinados contaminantes ambientales. Por ejemplo, bajas concentraciones de mercurio o de zinc pueden inducir la activación plaquetaria en humanos (Kostka et al., 1997; Watson et al., 2015).

En este tipo de estudios están incluidos los estudios de toxicología, inmunotoxicología y toxicología con plaquetas *in vitro*. En primer lugar, se determinan los compuestos presentes en los tejidos y sangres de los animales varados o salvajes y posteriormente se exponen a las células de delfines sanos para determinar si los xenobióticos pueden alterar la funcionalidad de las células y por tanto puede alterar la defensa de los animales salvajes frente a agentes patógenos o hemorragias al estar en contacto con dicho compuesto presente en el mar.

#### **2.4.1. Contaminantes modelo para estudios de toxicidad *in vitro*: Características y mecanismos.**

Como hemos detallado anteriormente, determinados xenobióticos como los PCBs, metales pesados o ciertos pesticidas han sido detectados previamente en tejidos de cetáceos salvajes (Martínez-López et al.,2019; Shoham-Frider et al.,2016; Durante et al., 2019 y 2016...). Sobre estos contaminantes se han realizado estudios *in vitro* en muestras de sangre de delfines u otras especies de mamíferos marinos, demostrando que afectan de forma más o menos severa la viabilidad y funcionalidad de las células inmunitarias (Desforges et al., 2017; Peñín et al., 2018; Cámara-Pellisó et al.,2008...). En esta tesis hemos seleccionado compuestos que nunca antes se habían investigado en el campo de la toxicología (detección en tejidos) e inmunotoxicología en mamíferos marinos, basándonos en su importante presencia en las aguas del mar Mediterráneo. En concreto, nos hemos centrado en fármacos y drogas de uso humano halladas entre el 90% y el 100% de las muestras de agua de mar testadas en varios estudios previos (Munaron et al.,2012; Brumovský et al.,2017). Algunos de los compuestos de este grupo presentes a mayores concentraciones en el agua fueron el paracetamol, la aspirina, la cafeína y el ibuprofeno, presentando concentraciones de hasta 2,5 a 4 ng/l en agua. Debemos tener en cuenta que cualquier compuesto vertido al mar se diluye enormemente debido al gran volumen de agua que este contiene. Actualmente, el NOAA-NCEI (National Centers for Environmental Information) estima que el volumen del mar Mediterráneo es de aproximadamente  $4,4 \cdot 10^{12}$  litros de agua. Por ello, la simple detección de cualquier xenobiótico en el agua del mar indica ya un alto índice de trasvase desde las ciudades hacia el mar. Debemos tener en cuenta que los cuatro compuestos seleccionados se llegaron a detectar en aguas muy lejanas a la costa, donde el factor de dilución es mayor (Figura 26).

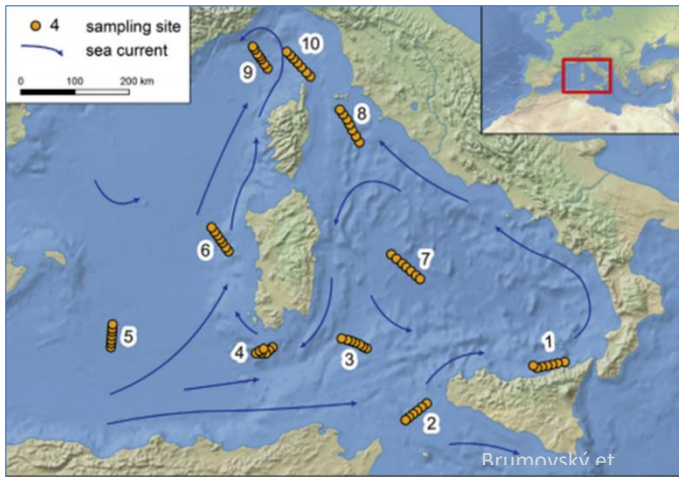


Figura 26. Patrón de muestreos realizados por Brumovský et al., 2017, en ocasiones alejados de la costa. Los círculos amarillos muestran los puntos de muestreo de agua llevados a cabo en cada zona (10 zonas muestreadas en total, 7 muestreos en cada zona).

Por tanto, por su importante presencia en el ecosistema marino, por su diario e ingente empleo por parte del ser humano y por sus conocidos efectos sobre el sistema inmunitario y plaquetario en mamíferos terrestres como los seres humanos o los ratones, seleccionamos el paracetamol, el ibuprofeno, la aspirina y la cafeína para realizar los estudios de toxicología, inmunotoxicología y toxicología *in vitro* en plaquetas en mamíferos

marinos. Cabe destacar que, en este último caso, nuestro grupo ha sido pionero en la puesta a punto de los protocolos para realizar estudios de toxicología *in vitro* en plaquetas de mamíferos marinos. Si bien, como hemos mencionado anteriormente, existen estudios previos de inmunotoxicología en mamíferos marinos, ningún grupo ha evaluado los efectos de ningún xenobiótico sobre las plaquetas en estas especies anteriormente, ni siquiera empleando los contaminantes más estudiados como los PCBs o los metales pesados.

El ibuprofeno pertenece a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y como tal, es un inhibidor de la ciclooxigenasa, reduciendo por tanto la respuesta inflamatoria, efecto para el que ha sido diseñado. Por este mismo mecanismo, es capaz también de inhibir la producción de tromboxanos en las plaquetas, los cuales son esenciales en la activación y función plaquetaria durante la hemostasia (Bieren et al., 2017; Driver et al., 2019). La aspirina, al ser también inhibidora de la ciclooxigenasa, presenta efectos similares al ibuprofeno en mamíferos terrestres (Morris et al., 2015), y puede inducir la apoptosis de las plaquetas a dosis menos elevadas que el paracetamol (van der Wal, et al., 2012).



Los efectos de la cafeína sobre la fagocitosis son inciertos, aunque sí que se ha demostrado ampliamente sus efectos antioxidantes en seres humanos y ratones (Nimse et al.,2015; Pillon-Barcelos et al.,2013). Además, por su efecto antagónico sobre la fosfodiesterasa, parece ejercer un impacto negativo sobre la activación plaquetaria (Montoya et al.,2013; Morse, 1997; Marquis et al., 1969; Olas y Brys, 2019).

El paracetamol se ha demostrado como un compuesto potencialmente inmunosupresor en mamíferos terrestres, posiblemente impidiendo la buena adhesión entre las células fagocíticas y los patógenos (Ruutu y Kosunen, 1972; Abramson et al.,1990) o por la inhibición del estallido respiratorio (Van Zyl et al.,1989; Abramson et al., 1990).





*Material y  
métodos*





## 1. Sujetos incluidos en el estudio.

Como se ha mencionado en la introducción, en este estudio se ha trabajado con diferentes especies de cetáceos y pinnípedos bajo cuidado humano o de vida libre.

### 1.1 Delfín mular (*Tursiops truncatus*)

Para la realización de este proyecto se han empleado dos grupos de delfines mulares: delfines bajo cuidado humano, albergados en el Oceanogràfic de Valencia y Mundomar de Benidorm, y delfines salvajes que viven en la Bahía de Sarasota (Florida, EEUU). En el caso de los estudios de toxicología con tejidos de animales varados, se han empleado muestras de delfines mulares varados en las costas de la Comunidad Valenciana entre 2005 y 2019.

Tanto las muestras procedentes de animales bajo cuidado humano (de cada una de las especies estudiadas) como las de delfines salvajes se han tomado bajo la aprobación de los correspondientes Comités de Ética y Bienestar animal. En concreto, en el caso de los animales en cautividad, los muestreos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana y de Mundomar. En el caso de los animales salvajes muestreados en Estados Unidos, se obtuvo la aprobación de la National Marine Fisheries Service Scientific Research Permit No. 20455, y del Mote Marine Laboratory Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

#### 1.1.1 Delfines bajo cuidado humano:

En el estudio se han incluido quince delfines del Oceanogràfic de Valencia y cinco delfines de Mundomar (Benidorm). La población está constituida por siete machos y trece hembras, siendo la mayoría de los individuos delfines adultos. La edad, sexo, peso y acuario de origen de cada sujeto se detalla en la Tabla 2. Para la mayoría de animales mayores de 25 años (de las diferentes especies), la edad es aproximada, debido a que proceden de otros acuarios y no está debidamente documentada. Todos los animales se encontraban sanos durante los muestreos, exceptuando los animales enfermos que se emplearon para evaluar posibles alteraciones en la función inmunitaria y plaquetaria predisponentes o derivadas de la patología.

Para la toma de muestras de sangre y saliva, todos los animales recibieron un entrenamiento médico periódico, de manera que los muestreos se realizaron de forma voluntaria y sin estrés por parte del animal, como se detallará en el apartado de toma de muestras.

| Nombre del delfín | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg) | Acuario      |
|-------------------|-------------|--------|-----------|--------------|
| <b>Kuni</b>       | 3           | Macho  | 170       | Oceanogràfic |
| <b>Neptuno</b>    | 15          | Macho  | 198       | Oceanogràfic |
| <b>Nico</b>       | 5           | Macho  | 167       | Oceanogràfic |
| <b>Nika</b>       | 30-35       | Hembra | 199       | Oceanogràfic |
| <b>Billy</b>      | 30-35       | Hembra | 196       | Oceanogràfic |
| <b>Lazo</b>       | 25-30       | Macho  | 184,5     | Oceanogràfic |
| <b>Josué</b>      | 25-30       | Macho  | 194       | Oceanogràfic |
| <b>Virkin</b>     | 3           | Hembra | 173       | Oceanogràfic |
| <b>Leia</b>       | 16          | Hembra | 173       | Oceanogràfic |
| <b>Grisell</b>    | 30-35       | Hembra | 197       | Oceanogràfic |
| <b>Elly</b>       | 25-30       | Hembra | 180       | Oceanogràfic |
| <b>Pfizer</b>     | 9           | Hembra | 168       | Oceanogràfic |
| <b>Venus</b>      | 13          | Hembra | 198       | Oceanogràfic |
| <b>Apolo</b>      | 6           | Macho  | 168       | Oceanogràfic |
| <b>Nala</b>       | 15          | Hembra | 175       | Oceanogràfic |
| <b>Aqua</b>       | ≥ 20 *      | Hembra | 207       | Mundomar     |
| <b>Camino</b>     | ≥ 20 *      | Hembra | 205       | Mundomar     |
| <b>Farah</b>      | ≥ 20 *      | Hembra | 210       | Mundomar     |
| <b>Maia</b>       | 38-40       | Hembra | 240       | Mundomar     |
| <b>Edu</b>        | 32          | Macho  | 216       | Mundomar     |

Tabla 2. Edad, sexo, peso y acuario de origen de los delfines bajo cuidado humano incluidos en el estudio. \*La edad exacta de Aqua, Camino y Farah se desconoce, pero han vivido en Mundomar durante 20 años.

### 1.1.2 *Delfines salvajes sanos:*

Se han incluido en el estudio dieciséis delfines mulares salvajes pertenecientes a la población de delfines que viven en la Bahía de Sarasota (Florida, EEUU). Se obtuvieron muestras de dichos animales en el contexto del proyecto “Sarasota Dolphin Health Assessment”, llevado a cabo en Sarasota durante junio de 2019. Se trata de un proyecto que se lleva a cabo anualmente desde el año 1983 en la Bahía de Sarasota (Figura 27 A). El equipo estable implicado en el proyecto, monitoriza a la población de delfines con periodicidad. Una vez al año, durante la época estival, veterinarios e investigadores de diferentes países participan en el control sanitario de los animales. En primer lugar, se realiza una selección de los individuos de interés. Las madres con crías lactantes son directamente excluidas del estudio, con el fin de no perturbar ni a la cría ni a la madre en este periodo crítico para la supervivencia del neonato. La identificación de los individuos de interés se realiza mediante observación y reconocimiento de la morfología y las marcas en las aletas dorsales de los animales (Figura 27 B). Cuando los delfines seleccionados para el muestreo son identificados, se les acompaña desde un bote silenciosamente y a cierta distancia hasta que alcanzan una zona de baja profundidad. En este momento se dispone una red a un perímetro de seguridad de los animales, la cual es sujeta por personal del proyecto (Figura 27 C). Los veterinarios experimentados se aproximan al animal y con cuidado llevan a cabo los diferentes muestreos en el menor tiempo posible (Figura 27 D). Finalmente, los delfines son liberados. Las muestras se identifican y almacenan adecuadamente en el “Sample Processing Boat” (Figura 27 E) y se transportan al laboratorio. Nuestro grupo estableció una colaboración con la Universidad de South Florida Sarasota-Manatee (USF), que nos cedió uno de sus laboratorios y todo su equipamiento e instrumental. Por su parte, la compañía Beckman Coulter (California, USA) instaló un citómetro de flujo CytoFLEX en el laboratorio de la USF, similar al que alberga nuestro laboratorio en Valencia, durante las semanas en que el proyecto se llevó a cabo (Figura 27 F).

La población de delfines salvajes a la que hemos tenido acceso para llevar a cabo nuestro estudio está compuesta por siete machos y nueve hembras. La edad, sexo y peso de los animales se muestran en la Tabla 3. Ningún delfín presentaba lesiones o procesos patológicos activos durante el muestreo.

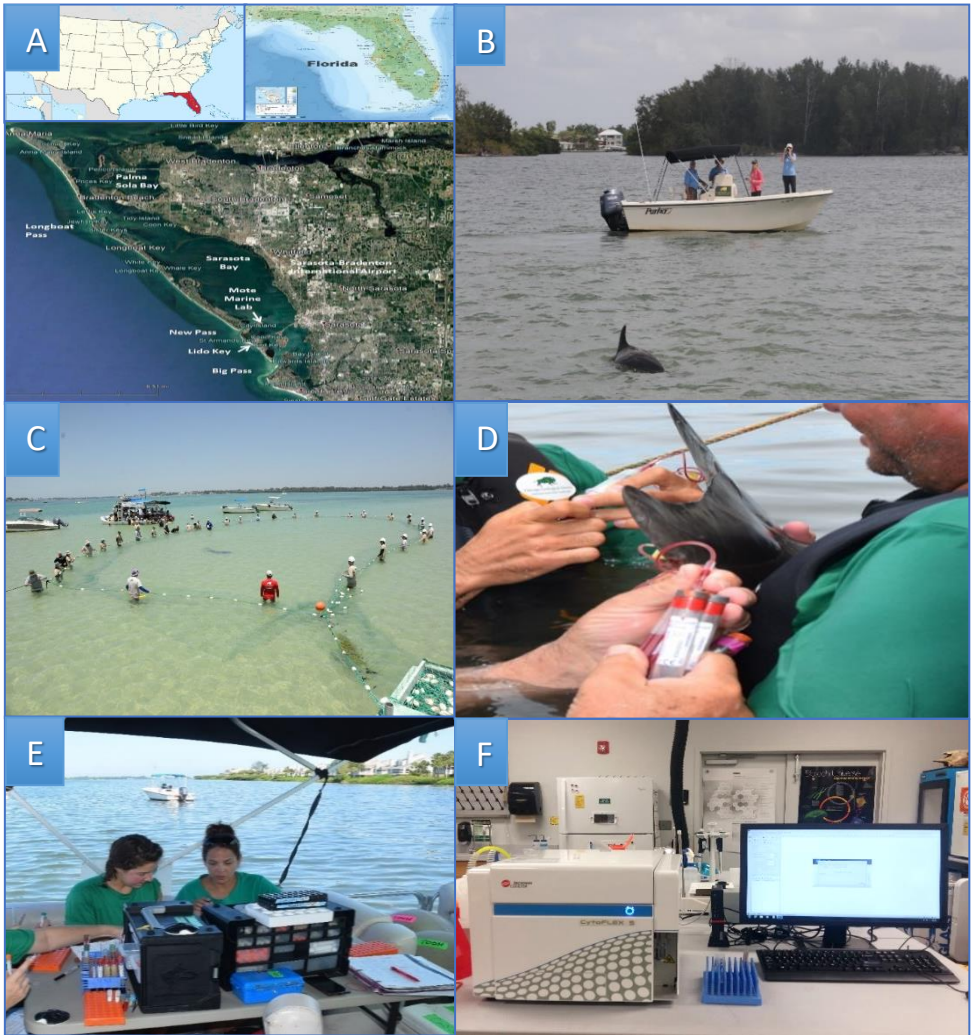


Figura 27. (A) Mapa de la Bahía de Sarasota (Florida, EEUU). (B) Identificación de los animales de interés por reconocimiento de marcas en las aletas dorsales. (C) Descarga de la red perimetral. (D) Extracción de muestra sanguínea. (E) Identificación, organización y almacenamiento de las muestras. (F) Citómetro de flujo en el laboratorio de la USF.



| Nº de identificación del delfín | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg) |
|---------------------------------|-------------|--------|-----------|
| 128                             | 27          | Macho  | 211       |
| 138                             | 27          | Macho  | -         |
| 211                             | 14          | Hembra | -         |
| 221                             | 10          | Hembra | 171       |
| 238                             | 17          | Macho  | 227       |
| 261                             | Adulto*     | Hembra | 195       |
| 264                             | 11          | Macho  | 181       |
| 266                             | 12          | Macho  | 176       |
| 281                             | 2           | Hembra | 62,3      |
| 283                             | 4           | Hembra | 83        |
| 285                             | 11          | Hembra | 173       |
| 287                             | 2           | Hembra | 84        |
| 289                             | 2           | Hembra | 79        |
| 291                             | 2           | Hembra | 69        |
| 316                             | 2           | Macho  | 61        |
| 318                             | ≥10*        | Macho  | 214       |

Tabla 3. Edad, sexo y peso de los delfines salvajes incluidos en el estudio. \*La edad exacta de los delfines 261 y 318 se desconoce, pero por su morfología, peso y longitud podemos afirmar que el animal 261 es adulto y el animal 318 ronda los 10 años de edad. (-) El peso de los delfines 138 y 211 se desconoce.

### 1.1.3 Delfines salvajes varados:

En este estudio, se han incluido muestras de tejidos de seis delfines mulares varados en las costas de la Comunidad Valenciana entre los años 2005 y 2019. Los delfines se encontraron muertos o muy enfermos y sin posibilidades de recuperación, por lo que se procedió a la eutanasia humanitaria. En su momento, personal especializado del Oceanogràfic practicó la necropsia y tomó muestras de los diferentes tejidos. En este proyecto se han empleado muestras de riñón, grasa, músculo e hígado de cada uno de los animales.

## 1.2 Beluga (*Delphinapterus Leucas*)

Se han incluido tres belugas pertenecientes al Oceanogràfic de Valencia en el estudio. La población consta de dos individuos adultos (macho y hembra) y su cría. La edad, el sexo y el peso de los animales se detalla en la Tabla 4. Los animales se encontraban sanos durante los muestreos, exceptuando determinadas muestras excepcionales tomadas cuando alguno de ellos enfermó para determinar si existían alteraciones inmunitarias o plaquetarias asociadas. Del mismo modo que los delfines, las belugas estaban entrenadas para realizar la extracción de sangre de forma voluntaria.

| Nombre de la beluga | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg) |
|---------------------|-------------|--------|-----------|
| <b>Yulka</b>        | ≥20*        | Hembra | 800-900** |
| <b>Kairo</b>        | ≥50*        | Macho  | 1000      |
| <b>Kylu</b>         | 5           | Macho  | 600-700** |

Tabla 4. Edad, sexo y peso de las belugas incluidas en el estudio. \*La edad exacta de Yulka y Kairo se desconoce, al proceder de otro acuario.\*\*Algunos pesos son aproximados, debido a la dificultad para pesar a los animales de forma rutinaria.

A pesar del reducido número de animales, los tres individuos representan diferentes aspectos interesantes en la población. Kairo es un animal geriátrico, mientras que Yulka es una adulta de mediana edad y Kylu es una cría en crecimiento. No muchos acuarios en el mundo albergan esta especie y menos centros todavía han conseguido reproducirla en cautividad. Por todo ello, poder contar con individuos de diferentes edades, entre ellos, un animal joven del que tenemos muestras prácticamente desde su nacimiento ha sido un aspecto muy interesante para el desarrollo de este estudio piloto realizado con belugas.

## 1.3 Morsa (*Odobenus Rosmarus*)

Se han incluido en el estudio tres morsas hembras pertenecientes al Oceanogràfic de Valencia. La edad y el peso cada una de ellas se detalla en la Tabla 5. Las tres hembras se encontraban sanas durante los muestreos y estaban entrenadas para los chequeos veterinarios.

| Nombre de la morsa | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg)  |
|--------------------|-------------|--------|------------|
| <b>Ninotska</b>    | 18          | Hembra | 900-1000** |
| <b>Petrus</b>      | 18          | Hembra | 900-1000** |
| <b>Tania</b>       | 18          | Hembra | 900-1000** |

Tabla 5. Edad, sexo y peso de las morsas incluidas en el estudio.  
 \*\*Los pesos son aproximados, debido a la dificultad para pesar a los animales de forma rutinaria.

En 2019, las morsas fueron trasladadas al acuario Tierpark Hagenbeck de Hamburgo de forma permanente, para participar en su programa de reproducción y conservación de la especie. Así pues, no se contó con las muestras de estos individuos durante el último año de realización de esta tesis.

#### 1.4 Foca común (*Phoca vitulina*)

Cuatro focas pertenecientes al Oceanogràfic de Valencia se han incluido en el estudio, sin embargo, solamente de dos de ellas se obtuvieron resultados concluyentes. Las muestras de los primeros animales fueron útiles para la puesta a punto de los protocolos experimentales en pinnípedos. La edad, el sexo y el peso cada una de ellas se detalla en la Tabla 6. Al igual que el resto de animales estudiados, las focas se encontraban sanas durante los muestreos y estaban entrenadas para los chequeos veterinarios.

| Nombre de la foca | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg) |
|-------------------|-------------|--------|-----------|
| <b>Taz</b>        | 5           | Macho  | **70-90   |
| <b>Neus</b>       | 25-30       | Hembra | **70-90   |

Tabla 6. Edad, sexo y peso de las focas incluidas en el estudio.  
 \*\*Los pesos son aproximados, debido a la dificultad para pesar a los animales de forma rutinaria.

### 1.5 León marino (*Otaria flavescens*)

Se han incluido ocho leones marinos en el estudio. Dos de ellos pertenecen a Mundomar (Benidorm), mientras que seis viven en el Oceanogràfic de Valencia. La mayoría de ellos son animales adultos y todos están entrenados para realizar de forma voluntaria la extracción de sangre. La edad, sexo, peso y acuario de origen de cada sujeto se detalla en la Tabla 7.

En la mayoría de las ocasiones, los animales se encontraban sanos en el momento del muestreo. El macho llamado Patrick sufrió una hemorragia aguda severa a causa de la ingestión de un cuerpo extraño. La hemorragia se cronificó con pérdida leve pero constante de sangre durante varias semanas. Las muestras de este animal sirvieron para la puesta a punto del protocolo de detección de plaquetas reticuladas en leones marinos.

| Nombre del león marino | Edad (años) | Sexo   | Peso (Kg) | Acuario      |
|------------------------|-------------|--------|-----------|--------------|
| <b>Alvin</b>           | 19          | Macho  | 400-500** | Oceanogràfic |
| <b>Patrick</b>         | 11          | Macho  | 300-450** | Oceanogràfic |
| <b>Demi</b>            | 19          | Hembra | 100-150** | Oceanogràfic |
| <b>Laura</b>           | 19          | Hembra | 100-150** | Oceanogràfic |
| <b>Ginger</b>          | 8           | Hembra | 100-150** | Oceanogràfic |
| <b>Ámbar</b>           | 19          | Hembra | 100-150** | Oceanogràfic |
| <b>Etíope</b>          | 15          | Macho  | 260**     | Mundomar     |
| <b>Ursa</b>            | 28          | Hembra | 90**      | Mundomar     |

Tabla 7. Edad, sexo y peso de los leones marinos incluidos en el estudio. \*\*Los pesos son aproximados, debido a la dificultad para pesar a los animales de forma rutinaria.

## 2. Toma de muestras.

Para la realización de esta tesis han sido necesarios tres tipos de muestras: sangre entera, plasma y tejidos de diferentes órganos. El modo de obtención de las muestras se detalla a continuación:

### 2.1 Extracción de sangre y obtención de plasma.

#### 2.1.1 Extracción de sangre:

Las muestras de sangre periférica se tomaron por parte del personal veterinario de cada acuario y del proyecto “Sarasota Dolphin Health Assessment” mediante la punción de la vena caudal de los animales.

En el caso de los animales bajo cuidado humano, todos ellos están entrenados para presentar la aleta caudal voluntariamente.

La extracción de sangre en pinnípedos se realiza “en seco”, es decir, el animal se coloca en una plataforma fuera del agua, aprovechando su forma de vida semi-acuática. El entrenador indica al animal que se coloque en posición decúbito-ventral, tumbado boca abajo y relajado. Para garantizar la seguridad del técnico que realice la extracción sanguínea, tanto con las focas como con los leones marinos y las morsas, se coloca una barrera física acorde al tamaño de la especie entre el animal y el veterinario, dejando solo al alcance de este las aletas caudales de los animales (Figura 28 A). En el caso de las morsas, debido a su gran tamaño, la barrera es de obra y se extiende hasta el techo del recinto. La vena es observable en la cara dorsal de las aletas caudales. En ocasiones, cuando el ambiente es frío, es necesario humedecer la zona con agua caliente para producir vasodilatación y localizar más fácilmente el vaso. Se limpia la zona antes de introducir la aguja y se aplica presión y un antiséptico tras la extracción (Figura 28).

En los cetáceos, la vena se localiza en la cara ventral de la aleta caudal, de manera que los animales se colocan en posición decúbito-dorsal en el agua, lateralizándose únicamente para respirar cuando es necesario. El veterinario desinfecta la zona con alcohol e introduce la aguja. Tras la extracción de sangre, se aplica presión sobre la zona con una gasa limpia para evitar el sangrado y se vuelve a desinfectar con un spray antiséptico resistente al agua (Figura 29).

Por su parte, los delfines salvajes no están entrenados, de manera que en el momento del muestreo fueron sostenidos por dos veterinarios en el agua respetando su posición corporal normal (decúbito ventral) y elevando la aleta caudal manualmente para poder acceder a su cara ventral. Ningún animal opuso resistencia física durante el proceso. Se les realizó la venopunción simultáneamente tanto en la vena caudal derecha como izquierda para obtener la sangre a la mayor rapidez posible y evitar estrés al animal, prolongándose la extracción únicamente por unos segundos (Figura 27 D). Al finalizar el muestreo, los veterinarios soltaban al delfín y las redes perimetrales se dejaban caer, alejándose nadando éste hacia su grupo social.



Figura 28. (A) Posicionamiento decúbito-ventral del animal y colocación de la barrera. (B) Limpieza de la zona. (C) Extracción de sangre en pinnípedos y detalle de la localización de la vena. (D) Aplicación de presión y desinfección sobre la zona tras la extracción.



Figura 29. (A) Posicionamiento decúbito-dorsal del animal (B) Extracción de sangre de la vena caudal en delfín y (C) en beluga. (D)Detalle de la localización de la vena caudal. (E) Presión en la zona con una gasa. (F) En azul se observa el antiséptico rociado sobre la zona de extracción.

Para realizar los ensayos de funcionalidad leucocitaria, la sangre fue recogida en tubos heparinizados, mientras que para los ensayos de funcionalidad plaquetaria se recogió en

tubos con citrato. Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento. En todos los casos (muestras en España o en EEUU), las muestras se comenzaron a procesar durante las dos primeras horas post-extracción.

### **2.1.2 Obtención de plasma:**

Para obtener el plasma sanguíneo se centrifugó la sangre entera heparinizada a 2000 rpm durante cinco minutos. Con una micropipeta se trasvasó la fase plasmática a microtubos que se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

## **2.2 Obtención y procesamiento de tejidos de animales varados.**

Ante la aparición de animales varados en las costas de la Comunidad Valenciana, se activa la Red de Varamientos, por la cual, la persona que encuentra al animal debe ponerse en contacto con la policía y esta, a su vez, con el personal de la Fundación Oceanogràfic encargado de asistir a los animales enfermos. Los veterinarios de la red de varamientos acuden a la zona de inmediato y evalúan el estado de salud del animal (Figura 30 A). Normalmente, los cetáceos varados llegan a las costas en muy mal estado o ya muertos. Cuando llegan vivos, su grave estado de salud lleva a que, en la inmensa mayoría de las ocasiones, el animal acabe siendo sometido a eutanasia.

Los veterinarios de la red de varamientos y los biólogos de la Universidad de Valencia practican la necropsia a los animales que se hallan muertos en las costas o que acaban sometidos a eutanasia, y extraen muestras de todos los tejidos (Figura 30 B) en las instalaciones del Instituto Cavanilles (Universidad de Valencia). Las muestras se almacenan a -80°C congeladas en el banco de tejidos del Oceanográfico, localizado en un almacén de la Ciudad de las Artes y las Ciencias.

En este proyecto se han empleado muestras de tejidos de seis delfines mulares varados desde 2005 a 2019. Las muestras se han analizado para la detección de contaminantes ambientales acumulados en los diferentes órganos en el Área de Toxicología-Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Murcia, con quien establecimos una colaboración.





Figura 30. (A) Asistencia a un delfín varado. (B) Necropsia de un delfín varado.

### 3. Reactivos, tóxicos, soluciones y medios de cultivo.

#### 3.1 Fluorocromos.

- La hidroetidina o dihidroetidio (HE. Merck) se preparó a 1 mg/ml en DMSO. Este fluorocromo se ha utilizado en los ensayos de estado redox basal y en la detección del estallido respiratorio provocado durante la fagocitosis, como indicador de los niveles de superóxido intracelular. En estos ensayos se ha empleado a una concentración final de 0,3µg/ml.

- La dihidrorodamina 123 (DHR123) (proporcionada en el Kit FagoflowEx de Exbio) es una sonda fluorogénica permeable a las células útil para la detección ROS, como el peróxido, el peroxinitrito o los iones de hipoclorito. La DHR123 no es fluorescente por sí misma, sólo emite fluorescencia al oxidarse por las ROS al producto fluorescente RH123. Ni el óxido nítrico, ni el superóxido ni el peróxido de hidrógeno por separado parecen oxidar la DHR123, sino que estas ROS deben combinarse con otros componentes celulares, como el citocromo c oxidasa o el hierro, para oxidarla.

- La tetrametilrodamina (TMRM ThermoFisher Scientific) se preparó a 1 mM en DMSO. Este fluorocromo se ha utilizado en la detección del potencial de membrana mitocondrial, ya que es sensible a los cambios de potencial producidos en este orgánulo celular. Para dicho ensayo se empleó a una concentración final de 100 nM.

- El Fluo-4-acetoximetil éster (Fluo-4 AM, ThermoFisher Scientific) se preparó a 1 mM en DMSO. Este fluorocromo se utilizó en el ensayo de movimientos de calcio intraplaquetario, ya que es un indicador de los niveles intracelulares de este ión. El Fluo-4 ligado al éster AM no se une al calcio por sí mismo, sin embargo, al introducirse en la célula, las esterasas lo hidrolizan a Fluo-4. Éste es un análogo del Fluo-3, siendo una molécula que es básicamente no fluorescente hasta que se une al  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando así su fluorescencia al menos 100 veces. Para los ensayos se empleó a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ .

- La BisBenzimida Ho 33342 trihidrocloruro o Hoechst 33342 (HO33342) (Merck) se preparó a 1 mg/ml en  $\text{H}_2\text{O}$ . Este marcador nuclear vital se ha utilizado para distinguir los leucocitos de las células anucleadas y debris presentes en las muestras tras su procesamiento. Se utilizó a una concentración final de 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

- El Vybrant Dye Cycle Green (VDCGreen, ThermoFisher) se preparó a 250  $\mu\text{M}$  en DMSO. Es otro marcador nuclear permeable a las células vivas. Se empleó en los ensayos para evaluar el potencial de membrana mitocondrial a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ .

- El 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y el yoduro de propidio (PI) (ambos de Merck) se prepararon a 1 mg/ml en  $\text{H}_2\text{O}$ . Estos marcadores nucleares no son permeables a la membrana plasmática, por lo que entran únicamente en las células con dicha membrana dañada, siendo indicadores de viabilidad celular. Dependiendo de la combinación de anticuerpos fluorescentes/fluorocromos de cada ensayo, se empleó el marcador compatible con los espectros de emisión de fluorescencia. El PI se empleó en los ensayos de fagocitosis y apoptosis celular y el DAPI se empleó en la evaluación del potencial de membrana mitocondrial. La concentración final fue de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el PI y de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para el DAPI.

- El Naranja de tiazol es un marcador de ARN. Se utilizó el reactivo del Kit BD Retic-Count™ de Becton Dickinson. La concentración del marcador de ácidos nucleicos es 0,01 mg/ml, empleándose a una concentración final de 0,002  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

- La Anexina V, marcador de fosfatidilserina, se obtuvo del Kit Anexina V-FITC/PI (Miltenyi Biotec) y se empleó en los ensayos de apoptosis y de detección de micropartículas plaquetarias.

- Como fluoroesferas para estandarización de protocolos de citometría de flujo: SPHERO Supra Rainbow Fluorescent Particles, Mid-Range (Spherotech).

En los casos en que la congelación era posible, los fluorocromos se alicuotaron en volúmenes pequeños para evitar procesos de congelación-descongelación y se almacenaron a -20 °C.

### 3.2 Anticuerpos monoclonales y kits comerciales.

Para marcar las plaquetas de mamíferos específicamente se empleó el anticuerpo contra CD41 PE (clon P2, Beckman Coulter). Se emplearon los siguientes Kits comerciales:

| Nombre del Kit                                 | Compañía         | Referencia  |
|--|------------------|-------------|
| <b>IngoflowEx</b>                              | Exbio            | ED7040      |
| <b>FagoflowEx</b>                              | Exbio            | ED7042      |
| <b>Kit Anexina V-FITC/PI</b>                   | Miltenyi Biotec  | 130-092-052 |
| <b>Kit BD Retic Count</b>                      | Becton Dickinson | 349204      |
| <b>Kit Quantibody Dolphin Cytokine Array 1</b> | RayBiotech       | QAD-CYT-1-4 |

Tabla 8. Kits comerciales empleados en el estudio, compañía y número de referencia de cada kit.

### 3.3 Reactivos.

- La citocalasina A (ENZO) se preparó a 10 mM en DMSO. Se alicuotó en pequeños volúmenes y se almacenó a -20 °C. Este reactivo se utilizó como inhibidor de la fagocitosis en los ensayos correspondientes, a una concentración de 400 µM.

- El ionóforo de calcio A23187 (Merck) se preparó a 10 mg/ml en DMSO. Se alicuotó en pequeños volúmenes y se almacenó a -20 °C. Este reactivo se utilizó en la generación de micropartículas plaquetarias a una concentración final de 0,02 µg/ml.

- La Adenosina 5'-difosfato monopotasio (ADP) (Merck) se preparó a 10 mM en PBS. Se alicuotó en pequeños volúmenes y se almacenó a -20 °C. Este reactivo se utilizó en el ensayo de movimientos de Ca<sup>2+</sup> intraplaquetario, ya que es un agonista plaquetario, que provoca la liberación al citosol del Ca<sup>2+</sup> procedente de las reservas presentes en las plaquetas. Se empleó a las concentraciones finales de 12 µM y 24 µM.

- La trombina se empleó a las concentraciones de 0,05 y 0,5 U/mL. El GPRP (Gly-Pro-Arg-Pro) se empleó a una concentración de 2,5 Mm (en agua).

- El Alamar Blue (ThermoFisher, DAL1025) se empleó en el ensayo de proliferación de linfocitos. Se mantuvo a 4°C y se usó en una proporción 1:10 en las muestras.

- La concanavalina (ConA) se preparó a 40 µg/ml en agua. Se empleó en los ensayos de proliferación de linfocitos a una concentración final deseada de 10 µg/ml por pocillo.

### 3.4 Tóxicos.

- El ibuprofeno se diluyó en DMSO. Se prepararon 5 soluciones madre (800 mM, 400 mM, 200 mM, 100 mM y 50 mM) y se almacenaron a -20°C. Las concentraciones finales en el ensayo fueron 3,2 mM, 1,6 mM, 800 µM, 400 µM y 200 µM.

- La cafeína se preparó a 30 mM en H<sub>2</sub>O destilada, en fresco para cada ensayo. Las concentraciones finales en el ensayo fueron 1,5 mM, 150 µM, 15 µM, 1,5 µM, 0,15 µM y 0,015 µM.

- El paracetamol se preparó a 20 mM en H<sub>2</sub>O destilada, en fresco para cada ensayo. Las concentraciones finales en el ensayo fueron 0,01µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM y 1 mM.

- La aspirina se diluyó en etanol puro cada día del ensayo. Se prepararon 5 diluciones madre (400 mM, 40 mM, 4 mM, 0,4 mM y 0,04 mM). Las concentraciones finales en el ensayo fueron 0,02µM, 0,2 µM, 2 µM, 20 µM y 200 µM.

### 3.5 Tampones y soluciones.

- Versalysse Lysing Solution (Beckman Coulter) se empleó como lisante de eritrocitos no fijador en los ensayos de fagocitosis, apoptosis y potencial de membrana mitocondrial. Se almacenó a temperatura ambiente.

- Tampón Tyrode modificado: 137 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 10 mM HEPES, ajustado a pH 7.4, en agua destilada estéril. Se almacenó a 4°C hasta su uso. Cada día antes de comenzar el experimento se añade al tampón 0.35% de BSA y 5.5 mM de glucosa (tampón Tyrode completo), desechando el resto sobrante cada día. Este tampón se utiliza para el ensayo de movilización de Ca<sup>2+</sup> intraplaquetario.

- Tampón Tyrode enriquecido con calcio: Se añade 0,22 mg/ml de CaCl<sub>2</sub> al tampón Tyrode completo, previamente a la realización del experimento, desechando el resto sobrante cada día. Este tampón se utiliza para el ensayo de la expresión de la superficie procoagulante y liberación de micropartículas plaquetarias.

- Tampón fosfato PBS pH 7.4 (GIBCO).

-Paraformaldehído (PFA) 1% en PBS: Dilución en PBS de una solución al 32 % de PFA (Electron Microscopy Sciences).

- El Histopaque 1077 es un medio a base de polisucrosa y diatrizoato de sodio que facilita el aislamiento y la recuperación rápida de MNCs de sangre completa por gradiente de densidad.

### **3.6 Medios de cultivo.**

Para reconstituir las muestras en los ensayos de fagocitosis, apoptosis y potencial de membrana mitocondrial se empleó medio RPMI 1640 (GIBCO, 21875034).

Para el tratamiento de la sangre periférica con tóxicos se utilizó medio modificado para linfocitos: medio RPMI 1640 + GlutaMAX-I (GIBCO, 61870-010) suplementado con 10 mM de HEPES (GIBCO,15630-056), 0,1mM de aminoácidos no esenciales (GIBCO, 11140-050, 50U/ml de penicilina/50 µg/ml de estreptomina (GIBCO, 15140-122), 50 µM de 2-mercaptoetanol (GIBCO, 21985-023) y 10% de suero bovino (GIBCO, 26010-074).

## **4. Caracterización de la funcionalidad y viabilidad inmunitaria, estado redox basal y función mitocondrial en leucocitos de animales sanos.**

Para poder detectar si determinados contaminantes ambientales o el estrés crónico pueden afectar la funcionalidad inmunitaria en mamíferos marinos y por tanto pueden predisponerlos a padecer enfermedades, el primer paso es averiguar cómo funcionan los leucocitos en condiciones normales en animales sanos.

Por otro lado, también algunas patologías se han visto asociadas a alteraciones en la respuesta inmunitaria, ya sea aumentándola (inflamación-infección) o disminuyéndola (inmunosupresión). Por su naturaleza, cuando los mamíferos marinos enferman, no suelen presentar una sintomatología evidente hasta que la enfermedad se encuentra ya en fases avanzadas. Esto es debido a que estas especies no pueden mostrar indicios de debilidad en su medio natural, ya que, a pesar de localizarse en lo alto de la cadena trófica y no poseer prácticamente depredadores, pueden estar amenazadas por otras especies de mayor tamaño como las orcas, los osos polares o algunos tiburones, dependiendo de la especie de

la que se trate. Tomando como referencia la funcionalidad de las células inmunitarias en animales sanos y empleando estas pruebas de forma rutinaria se pueden detectar precozmente alteraciones en la respuesta inmunitaria (inflamación-infección o inmunosupresión) antes de que el animal presente signos clínicos. Por ello, estas pruebas, aplicadas como una herramienta diagnóstica adicional en los chequeos rutinarios que se realizan a los animales, pueden ser útiles para diagnosticar y tratar la enfermedad precozmente, mejorando la medicina preventiva en acuarios y zoológicos.

En este proyecto se evaluó la respuesta inmunitaria innata de los animales mediante el estudio de la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos, y la respuesta inmunitaria adquirida mediante el estudio de la capacidad proliferativa de linfocitos T. También se evaluaron el estado redox basal, la producción de citoquinas y el potencial de membrana mitocondrial de leucocitos de animales sanos. La técnica más importante utilizada para realizar los ensayos funcionales del estudio fue la citometría de flujo.

#### 4.1 Citometría de flujo.

La citometría de flujo es el método analítico por el cual células o partículas en suspensión alineadas en una corriente laminar circulan hasta atravesar una o varias fuentes de iluminación, produciéndose la dispersión de la luz y la emisión de fluorescencia en el caso de que las partículas contengan moléculas fluorescentes o estén marcadas con ellas. La luz

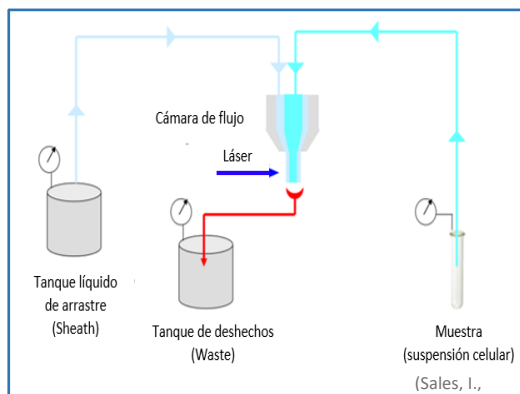


Figura 31. Sistema fluido del citómetro de flujo.

dispersada y la fluorescencia son filtradas, captadas por detectores y convertidas en valores digitales que almacena un ordenador. Así pues, la citometría de flujo se basa en un sistema fluido (Figura 31), óptico (Figura 32) y electrónico por el cual las células o partículas se analizan multiparamétricamente en función de su tamaño, complejidad interna y múltiples factores medibles empleando anticuerpos o tinciones fluorescentes específicas.

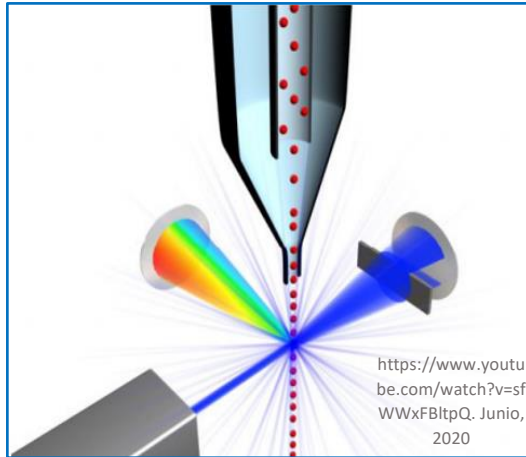


Figura 32. Células atravesando el punto de interrogación dispersando la luz y emitiendo fluorescencia.

El citómetro de flujo empleado en esta Tesis es un CyTOFLEX S (Beckman-Coulter, CA, USA) equipado con 4 láseres (405 nm, 488 nm, 561 nm y 635 nm) y 13 detectores de fluorescencia. Este citómetro, además de detectar la dispersión de luz frontal (forward scatter, FSC) y la lateral (side scatter, SSC) procedentes del láser de 488 nm, permite detectar la dispersión lateral procedente del láser de 405 nm (violet side scatter, VSSC). El software de adquisición empleado por el equipo es el CytExpert 2.3. La colaboración con la compañía Beckman-Coulter nos permitió utilizar el mismo equipo en

los ensayos con animales bajo cuidado humano y salvajes, ya que nos proporcionó un equipo con las mismas características técnicas en la Universidad de South Florida Sarasota-Manatee (USF) que el que se utilizó en el Servicio de Citómica del CIPF.

Los protocolos de adquisición de muestras se estandarizaron con las fluoroesferas SPHERO Supra Rainbow Fluorescent Particles, siguiendo el siguiente procedimiento: tras el ajuste de las condiciones de adquisición de los protocolos en los estudios de animales bajo cuidado humano (Servicio de Citómica del CIPF), se adquirieron las fluoroesferas para determinar las regiones diana en cada uno de los canales de fluorescencia utilizados. Los valores de fluorescencia obtenidos para las fluoroesferas se exportaron y se utilizaron para definir las condiciones de adquisición en los estudios de animales salvajes (USF), de forma que las regiones diana para cada uno de los canales de fluorescencia fuesen las mismas. El mismo lote de las fluoroesferas fue utilizado en ambos citómetros de flujo. Tras la estandarización, los protocolos de adquisición se utilizaron para el análisis de las muestras de animales salvajes.

## 4.2 Análisis de la funcionalidad inmunitaria en animales sanos.

Se han aplicado diferentes protocolos para evaluar las respuestas inmunitarias innata y adquirida del sistema inmunitario.

### 4.2.1 Evaluación de la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.

Para evaluar la funcionalidad de las células fagocíticas estudiamos dos fases imprescindibles en el proceso de la fagocitosis: la ingestión del patógeno por parte de la célula, y su destrucción mediante el estallido respiratorio o *burst* oxidativo. En esta tesis hemos adaptado diferentes Kits comerciales empleados en medicina humana para su uso en muestras de mamíferos marinos, modificando los protocolos proporcionados por los fabricantes en algunos aspectos para su buen funcionamiento en estas especies.

Por un lado, para evaluar la capacidad de ingestión de las células hemos adaptado el kit IngoFlowEx®, mientras que, para evaluar la producción del estallido respiratorio tras ingerir el patógeno, adaptamos el Kit FagoFlowEx®. Por otro lado, para analizar simultáneamente la ingestión y destrucción del patógeno en las células de una misma muestra, hemos puesto a punto un nuevo protocolo combinando el Kit IngoflowEx con el uso de hidroetidina. En todos los casos se ha empleado como estímulo la bacteria *Escherichia coli* (*E.coli*) proporcionada por los diferentes Kits, ya que al igual que en humanos, también es capaz de infectar a cetáceos y pinnípedos (Schaefer et al.,2011; Delport et al., 2015).

La adaptación a mamíferos marinos de kits comerciales para evaluar la función inmune en humanos es novedosa y su uso podría facilitar la estandarización o comparación entre futuros estudios en estas especies, de las cuales se tienen pocas referencias.

A continuación, se detalla la metodología empleada para el estudio tanto de la ingestión como de la destrucción del patógeno por parte de las células fagocíticas en mamíferos marinos.



#### **4.2.1.1 Adaptación del Kit Ingoflow para la determinación de la capacidad de fagocitosis *in vitro*.**

a) Componentes del Kit IngoflowEx:

1. Suspensión de bacterias fluorescentes (*E. coli*-FITC).
2. Solución de extinción (azul de tripano).
3. Solución de lisis de eritrocitos y fijación de leucocitos.
4. Tampón de lavado.
5. Solución de tinción de ADN (PI).

b) Principio del ensayo:

Este ensayo se basa en medir la fluorescencia de las células fagocíticas que ingieren la bacteria *E. coli* marcada con fluoresceína (FITC). La *E. coli* fluorescente se añade a la sangre heparinizada del individuo y la mezcla se incuba a 37°C. En paralelo, se incuba el control negativo no expuesto al patógeno, que se utiliza para establecer el límite entre las células que han fagocitado la bacteria y las que no. Durante la incubación, los fagocitos ingieren el patógeno fluorescente de modo que al final encontramos en la muestra:

- Células fagocíticas que no han ingerido al patógeno y por tanto no emiten fluorescencia
- Células fagocíticas que no lo han ingerido todavía, pero presentan la bacteria fluorescente adherida a la membrana celular
- Células fagocíticas que han ingerido correctamente al patógeno y que por tanto emiten la fluorescencia verde de las bacterias
- Bacterias libres que no han sido ingeridas por las células fagocíticas y,
- El resto de componentes sanguíneos (eritrocitos, plaquetas, debrís...).

Los eritrocitos se lisan y los restos celulares y las bacterias no ingeridas se eliminan mediante lavados con PBS. La fluorescencia de las bacterias unidas a la superficie de las células fagocíticas se apaga con azul de tripano, un colorante que no atraviesa la membrana celular intacta.

c) Modificaciones para su uso en mamíferos marinos:

A continuación, enumeramos las modificaciones del ensayo original que llevamos a cabo para optimizar su uso en mamíferos marinos:

1. Control negativo adicional:

Añadimos un control negativo adicional: el control negativo biológico. Para ello empleamos la citocalasina A, un metabolito de origen fúngico capaz de inhibir la fagocitosis uniéndose a los microfilamentos de actina de los fagocitos e impidiendo su polimerización, y por tanto, la formación de lamelipodios, la movilidad celular y la quimiotaxis. Este control negativo nos proporciona información complementaria a la que ofrece el control negativo propuesto por el fabricante, que informa sobre la autofluorescencia de las células de la muestra. El nuevo control negativo es más comparable al tubo test, puesto que contiene exactamente los mismos componentes, con la diferencia de que añadimos un compuesto para inhibir el proceso de fagocitosis.

2. Aumento del periodo de incubación:

Tras realizar varias pruebas experimentales, ampliamos el periodo de incubación de las células con el patógeno de 30 minutos (según fabricante) a una hora, observándose así mejores resultados.

3. Solución de lisis de eritrocitos no fijante:

La solución de lisis de eritrocitos que incluye el Kit es fijante. En el proceso de fijación, las células se permeabilizan y mueren quedando fijadas por largo tiempo. Para mantener las células vivas, adaptamos el ensayo empleando una solución de lisis que no fijara las células. En concreto, empleamos VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter). En las muestras de cetáceos la lisis se llevó a cabo correctamente siguiendo las instrucciones del fabricante, sin embargo, los pinnípedos necesitaron el doble de volumen de VersaLyse o bien el doble de tiempo de incubación con la solución de lisis para conseguir el mismo resultado. Esto posiblemente sea debido a que los pinnípedos, y en especial las morsas, poseen una mayor concentración de lípidos en sangre que los cetáceos, lo que puede dificultar la lisis.

4. Discriminación entre células vivas y muertas:

En el ensayo original se emplea el yoduro de propidio (PI) para reconocer todos los leucocitos una vez fijados. El PI es una tinción rojo fluorescente que aumenta su fluorescencia al intercalarse entre el ADN del núcleo celular, pero solo puede penetrar en las células permeabilizadas (muertas). Por ello, empleamos PI para descartar del análisis las células muertas. Para reconocer los leucocitos vivos empleamos Hoechst 33342 (HO), una tinción nuclear capaz de penetrar en las células vivas y que emite fluorescencia azul al unirse a su ADN.

5. Medio RPMI para conservar las células hasta la lectura en el citómetro:

Puesto que trabajamos con células vivas, empleamos medio RPMI para conservar las células hasta su lectura en el citómetro, un medio más respetuoso con la viabilidad celular que el PBS empleado en el ensayo original.

6. Momento de adición del azul de tripano:

En el Kit original proponen añadir el azul de tripano tras la incubación con el patógeno. Tras varias pruebas experimentales, observamos mejores resultados adicionándolo justo antes de la lectura en el citómetro.

d) Protocolo definitivo para la evaluación de la capacidad de ingestión de monocitos y granulocitos en mamíferos marinos:

Se prepararon tres tubos por cada muestra de sangre: control negativo (autofluorescencia), control con citocalasina A y tubo positivo o test. A cada tubo se añadieron 50 µl de sangre heparinizada del animal. Los tubos se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Tras este tiempo, el tubo de citocalasina se preincubó con citocalasina A a una concentración final de 400 µM durante 30 minutos en un incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C. Posteriormente, se añadieron 10 µl de *E.coli*-FITC al control con citocalasina y al tubo test y se incubaron junto con el tubo negativo sin *E.coli*-FITC durante una hora a 37°C en el incubador de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, los tubos se colocaron en hielo durante 5 minutos para detener el proceso de fagocitosis, tras lo cual se añadieron 500 µl de Versalyse Lysing Solution a cada tubo en las muestras de cetáceos y 1 ml en las muestras de pinnípedos. Se dejó actuar a la solución de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Una vez lisadas, las muestras se

centrifugaron a 200 g y a 4°C durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados de las muestras con 3 ml de PBS filtrado y frío (a 4°C) centrifugando del mismo modo que en el paso anterior. Tras retirar el sobrenadante, las muestras se resuspendieron en 300 µl de RPMI atemperado. Para finalizar, se añadió el Hoechst 33342 (HO) a cada tubo a una concentración final de 3 µg/ml y se incubó durante 15 minutos a 37°C en el incubador de CO<sub>2</sub>. Antes de la lectura en el citómetro, se añadieron 10 µl del azul de tripano proporcionado por el fabricante y PI a una concentración final de 5 µg/ml para descartar las células muertas. Las muestras se analizaron en el citómetro lo antes posible (Figura 33).

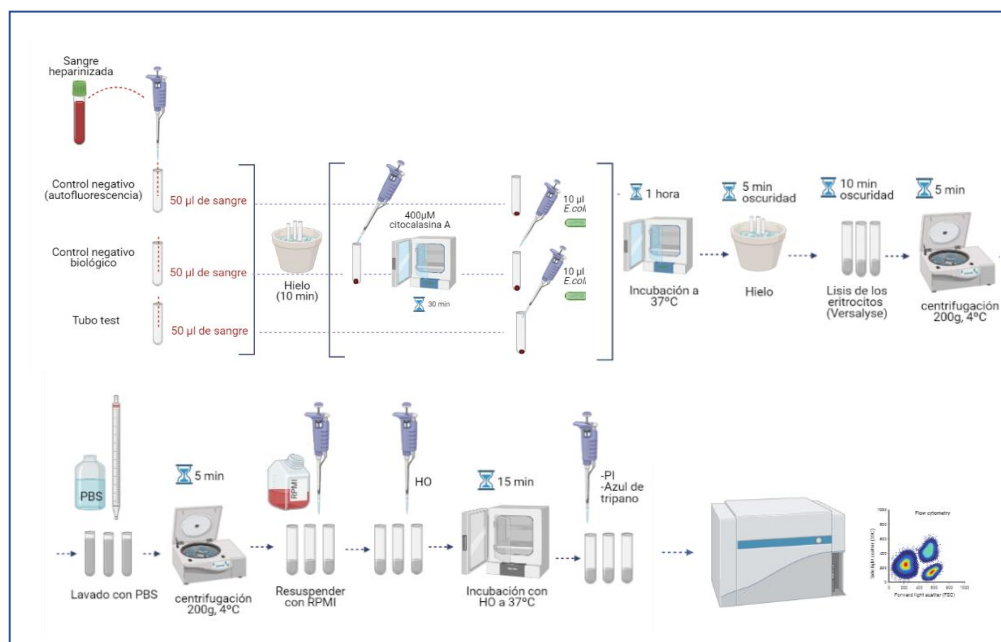


Figura 33. Protocolo para la evaluación de la capacidad fagocítica. Adaptación del IngoflowEx a mamíferos marinos.

El citómetro fue configurado para medir la señal de Forward Scatter (FSC) y de Side Scatter (SSC) así como las fluorescencias emitidas por la bacteria *E.coli*-FITC (exc 488 nm/em 525nm), Hoechst (exc 350 nm/em 461nm) y PI (exc 488nm/em 617nm). Para ello se emplearon los láseres azul (488nm) y violeta (405 nm).

La estrategia de selección de poblaciones se detalla en la Figura 34: Las células nucleadas se distinguieron de los eritrocitos no lisados y del debris celular utilizando la fluorescencia del Hoechst 33342 (detector exc.405 nm/em 450 nm, canal PB450, Fig. 34 A), seleccionando los eventos positivos para este marcador como células nucleadas o leucocitos. Las células muertas se descartaron en el canal ECD, donde se detecta la fluorescencia del PI (exc 561 nm/ 610nm), seleccionando como células vivas las negativas para este marcador (Fig. 34 B). Los agregados celulares se eliminaron electrónicamente utilizando las señales de área (FSC-A) y de pico (FSC-H) del FSC (Fig. 34 C). La estrategia de selección fue de leucocitos vivos e individuales, siguiendo las ventanas de la Fig. 34 A-C. Partiendo de los leucocitos individuales, se seleccionaron las células fagocíticas (monocitos y granulocitos) por morfología, según su tamaño relativo (FSC) y su complejidad interna (SSC), descartando así los linfocitos (Figura 34 D). Para el análisis de las células que habían fagocitado *E.coli*-FITC se utilizó el detector exc 488nm/ em 525 nm (canal FITC, Fig. 34 G). En el tubo negativo, las células fagocíticas no se expusieron a *E.coli*-FITC, por lo que ningún evento es positivo para dicha fluorescencia, marcando el límite entre las células positivas para FITC y las negativas (Figura 34 E). De forma similar, en el control con citocalasina A la fagocitosis fue inhibida, por lo que tampoco se observan células positivas para FITC (Figura 34 F). En el tubo positivo se observa el porcentaje de células fagocíticas que presentan la fluorescencia de la *E.coli*-FITC tras haberla ingerido (Figura 34 G).

Los resultados se analizaron con el programa CytExpert propio del equipo. El porcentaje final de células fagocíticas capaces de ingerir la bacteria se obtuvo restando el porcentaje de células obtenido en el control con citocalasina al del tubo test. El control negativo sirvió como control de la autofluorescencia de la muestra.

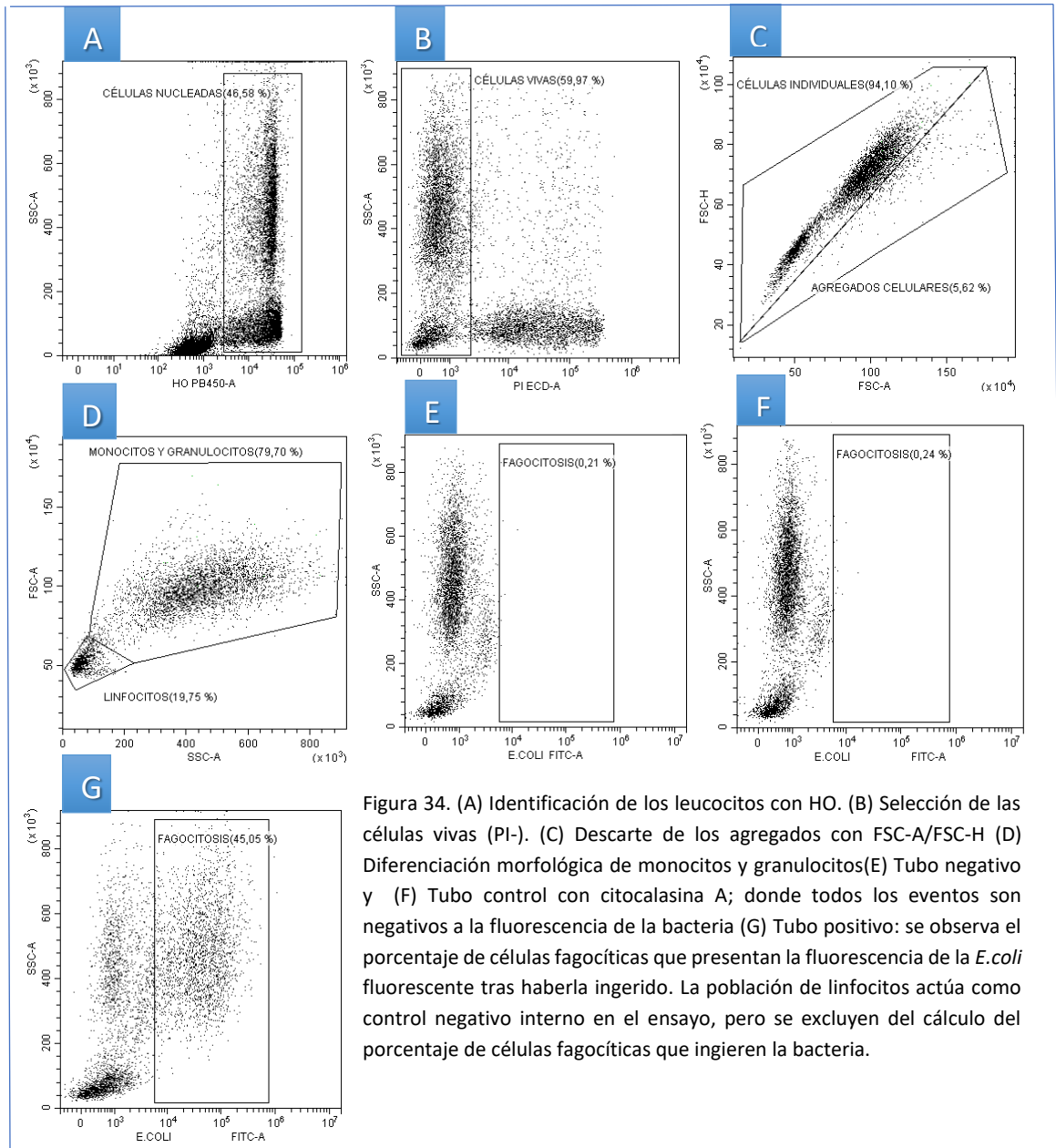


Figura 34. (A) Identificación de los leucocitos con HO. (B) Selección de las células vivas (PI-). (C) Descarte de los agregados con FSC-A/FSC-H (D) Diferenciación morfológica de monocitos y granulocitos (E) Tubo negativo y (F) Tubo control con citocalasina A; donde todos los eventos son negativos a la fluorescencia de la bacteria (G) Tubo positivo: se observa el porcentaje de células fagocíticas que presentan la fluorescencia de la *E.coli* fluorescente tras haberla ingerido. La población de linfocitos actúa como control negativo interno en el ensayo, pero se excluyen del cálculo del porcentaje de células fagocíticas que ingieren la bacteria.

#### **4.2.1.2 Adaptación del Kit IngoFlow para la determinación de la fagocitosis y el estallido respiratorio *in vitro*.**

##### a) Principio del ensayo:

Al ensayo del Kit IngoFlowEx, explicado en el apartado anterior, se añadió el uso de hidroetidina (HE), un indicador de superóxido que al ser oxidado durante el estallido respiratorio se intercala en el ADN celular y emite fluorescencia roja. De este modo se evaluó simultáneamente la capacidad de ingestión del patógeno por parte de las células fagocíticas (dada por la fluorescencia verde de la bacteria) y la producción del estallido respiratorio (dada por la fluorescencia roja de la HE).

Dado que la HE emite una fluorescencia similar a la del yoduro de propidio, en este caso se descartaron las células muertas morfológicamente.

##### b) Protocolo definitivo para la evaluación simultánea de la capacidad de ingestión y la producción del estallido respiratorio de monocitos y granulocitos en mamíferos marinos:

En este caso se prepararon los siguientes tubos:

1. Control negativo (sin *E.coli*-FITC ni HE), para evaluar la autofluorescencia de la muestra.
2. Control negativo biológico, en el que se añadieron tanto la bacteria como la HE, pero se inhibió la fagocitosis con citocalasina A.
3. Control del estado redox basal celular, en el que únicamente se añadió HE.
4. Control de la capacidad de ingestión, en el que únicamente se añadió *E.coli*-FITC.
5. Tubo test, en el que se añadieron tanto la *E.coli*-FITC como la HE, para la evaluación simultánea de la capacidad de ingestión y destrucción del patógeno por parte de las células fagocíticas.

Se siguió el mismo protocolo que el detallado en el apartado anterior (IngoFlowEx® Kit de Exbio), con la diferencia de que se añadió 0,3 µg/ml de hidroetidina a la muestra al mismo tiempo que se añadió el Hoechst 33342, incubándose ambos compuestos al mismo tiempo.

El citómetro se configuró para adquirir las mismas señales que en el protocolo IngoFlowEx® Kit de Exbio, eliminando el canal donde se detecta la señal del PI (canal ECD) y añadiendo el canal donde se detecta la de la HE (exc 561 nm/em 585 nm, canal PE).

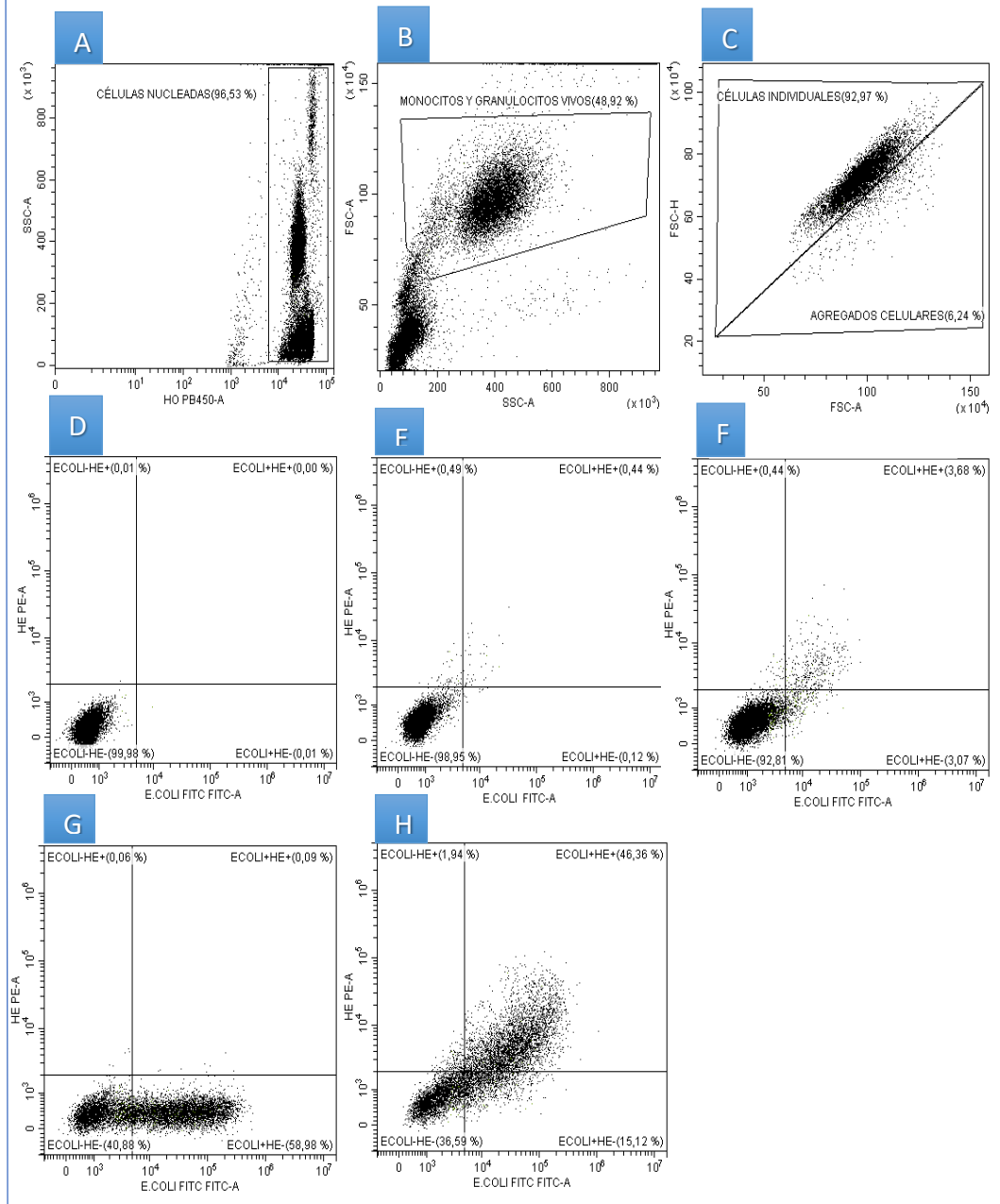
La estrategia de selección de poblaciones fue la misma que en el caso anterior (IngoFlowEx® Kit de Exbio), con dos diferencias. Por un lado, las células vivas se seleccionaron utilizando la morfología celular (FSC y SSC) (Figura 35 B), y las células capaces de generar el estallido oxidativo se seleccionaron utilizando el dotplot que enfrenta las señales de *E.coli*-FITC y de la HE (Figura 35 D-H).

Para el análisis de las muestras se valoraron dos parámetros: 1) El porcentaje de células que ingirieron el patógeno, que se calculó restando el porcentaje de las células positivas para la señal de *E.coli*-FITC en el tubo con citocalasina A al de las positivas en el tubo test. 2) El porcentaje de células capaces de generar el estallido oxidativo tras ingerir la bacteria, que se calculó restando el porcentaje de células *E.coli*+/*HE*+ en el tubo con citocalasina A al porcentaje de células *E.coli*+/*HE*+ en el tubo test. Este análisis se realizó utilizando el software FlowJo.

Figura 35. (A) Identificación de los leucocitos con HO. (B) Selección de los monocitos y granulocitos vivos por morfología (C) Descarte de agregados por FSC-A y FSC-H. (D) Tubo negativo: no se añade *E.coli*-FITC ni HE, por lo que todos los eventos son negativos a ambas fluorescencias. (E) Tubo control con HE: detectamos el estado redox basal de las células (F) Tubo control negativo con citocalasina A: la fagocitosis se inhibe, por lo que escasos eventos presentan las fluorescencias FITC y PE. (G) Tubo control con *E.coli*-FITC: se observa el porcentaje de células fagocíticas que presentan la fluorescencia de la *E.coli* fluorescente tras haberla ingerido.(H) Tubo test: observamos el porcentaje de células que no han ingerido ni destruido las bacterias (ECOLI-HE-), el porcentaje de células contienen bacterias en su interior pero aún no las han destruido (ECOLI+HE-) y el porcentaje de células que han ingerido bacterias y están produciendo el estallido respiratorio (ECOLI+HE+).







#### **4.2.1.3 Adaptación del Kit Fagoflow para la determinación de la producción del estallido respiratorio *in vitro*.**

##### a) Componentes del Kit FagoflowEx:

El kit FagoFlow está compuesto por los siguientes reactivos:

1. Suspensión de *E. coli*.
2. Dihidrorodamina 123 (DHR123, 10 mg/ml).
3. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).
4. Solución de lisis de eritrocitos y fijación de leucocitos.

##### b) Principio del ensayo:

El kit Fagoflow de Exbio sirve para evaluar la capacidad fagocítica de los monocitos y granulocitos midiendo el estallido oxidativo tras su estimulación con la bacteria *E.coli*. Para ello, se emplea DHR123, que al ser oxidada por las especies reactivas de oxígeno (ROS) resultantes de la acción de la NADPH oxidasa, se transforma en su producto rodamina 123 (RH123), que emite fluorescencia verde.

El PMA incluido en el kit como control positivo es un diéster de forbol que aumenta la producción de ROS en las células.

##### c) Modificaciones para su uso en mamíferos marinos:

Se aplicaron modificaciones similares a las adaptaciones llevadas a cabo en el Kit IngoflowEx:

1. Aumento del periodo de incubación: De 20 minutos (según fabricante) a 60 minutos de incubación.
2. Solución de lisis de eritrocitos no fijante: sustituimos la solución de lisis propia del Kit por VersaLyse Lysing Solution.
3. Discriminación entre células vivas y muertas: Empleamos HO33342 para identificar los leucocitos y PI para descartar del análisis las células muertas.
4. Uso de medio RPMI para conservar las células hasta la lectura en el citómetro.

En este protocolo se omitió el tubo con citocalasina A, el control negativo nos indicaba el estrés oxidativo basal de los monocitos y granulocitos del animal y resultó de mayor utilidad en este caso.

d) *Protocolo definitivo para la evaluación de la capacidad de producción del estallido respiratorio en monocitos y granulocitos de mamíferos marinos:*

Por cada muestra se prepararon tres tubos con 50  $\mu$ l de sangre periférica heparinizada. A continuación, se añadieron las soluciones correspondientes a cada tubo:

1. Control negativo (estado redox basal): 10  $\mu$ l de DHR123.
2. Control positivo: 10  $\mu$ l de DHR123 + 10  $\mu$ l de PMA.
3. Tubo test: 10  $\mu$ l de DHR123 + 10  $\mu$ l de la suspensión de *E.coli*.

Los tubos se agitaron con vórtex y se incubaron a 37°C en un incubador durante una hora. Tras la incubación, se lisaron los eritrocitos de las muestras con Versalyse Lysing Solution, añadiendo 500  $\mu$ l (cetáceos) o 1 ml (pinnípedos). Se dejó actuar durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, tras lo cual se lavaron 2 veces con 3 ml de PBS, centrifugando las muestras a 200 g durante 5 minutos. Finalmente, se retiró el sobrenadante y las muestras se resuspendieron en 300  $\mu$ l de RPMI atemperado. Se añadió HO33342 a 3  $\mu$ g/ml a cada tubo y se incubaron durante 15 minutos a 37°C. Previamente a su lectura en el citómetro de flujo, se añadió PI a 5  $\mu$ g/ml a cada tubo para descartar las células muertas. Las muestras se analizaron en el citómetro lo antes posible (Figura 36).

El citómetro fue configurado para medir la señal de FSC y de SSC, así como las fluorescencias emitidas por la rodamina 123 (exc 488 nm/em 525 nm), el Hoechst 33342 (exc 405 nm/em 450 nm) y del PI (exc 561 nm/em 610 nm).

Los leucocitos se identificaron empleando la señal SSC y la fluorescencia del Hoechst 33342 (canal PB450, Figura 37 A). Las células muertas se seleccionaron como células negativas para el PI (Figura 37 B), y los agregados se eliminaron seleccionando las células individuales utilizando las señales FSC-A y FSC-H (Figura 37 C). Los monocitos y granulocitos se distinguieron morfológicamente (FSC y SSC) (Figura 37 D) y su capacidad fagocítica se evaluó midiendo la fluorescencia verde de la RH123 (canal FITC) formada durante el estallido respiratorio. En el tubo negativo se observaron algunos eventos positivos en el canal de la RH123, resultado de la oxidación de la DHR123 por las ROS generadas por el metabolismo

celular (Figura 37 E). En el control positivo tratado con PMA, prácticamente la totalidad de las células oxidan la DHR123 debido al drástico aumento de las ROS que produce dicha molécula (Figura 37 F). En el tubo estimulado con *E.coli* observamos la respuesta de las células fagocíticas ante el patógeno, presentando un porcentaje de células que han oxidado la DHR123 intermedio entre el control negativo y el positivo (Figura 37 G).

Todos los resultados obtenidos con este Kit se analizaron con el programa CytExpert restando el porcentaje de células fagocíticas positivas a la fluorescencia verde de la RH123 del tubo negativo (estado redox basal) al porcentaje de células positivas a dicha fluorescencia en el tubo estimulado con *E.coli*

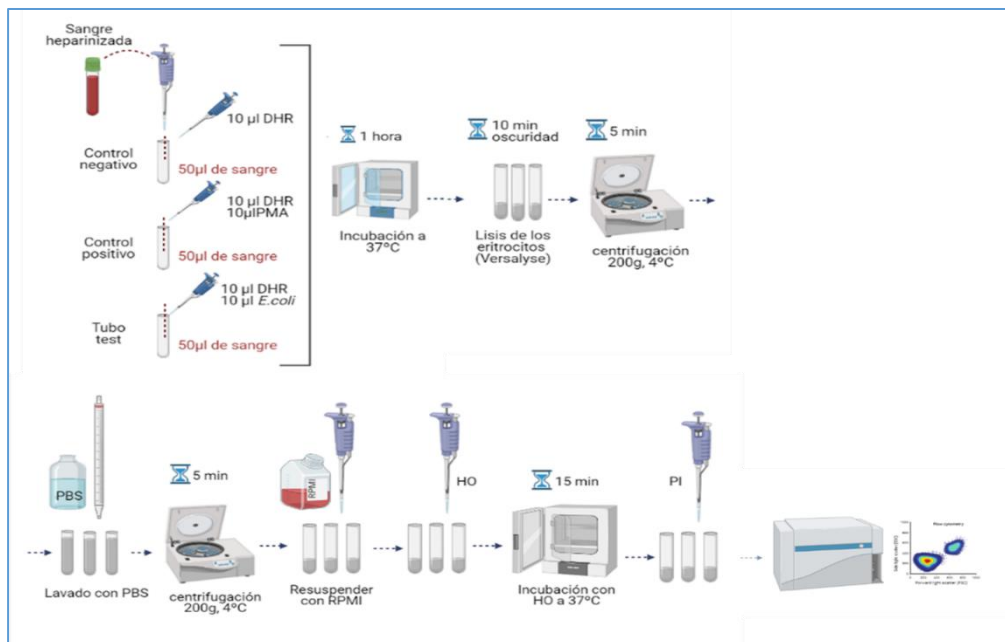


Figura 36. Protocolo para la evaluación de la capacidad de producción del estallido respiratorio. Adaptación del FagoflowEx a mamíferos marinos.

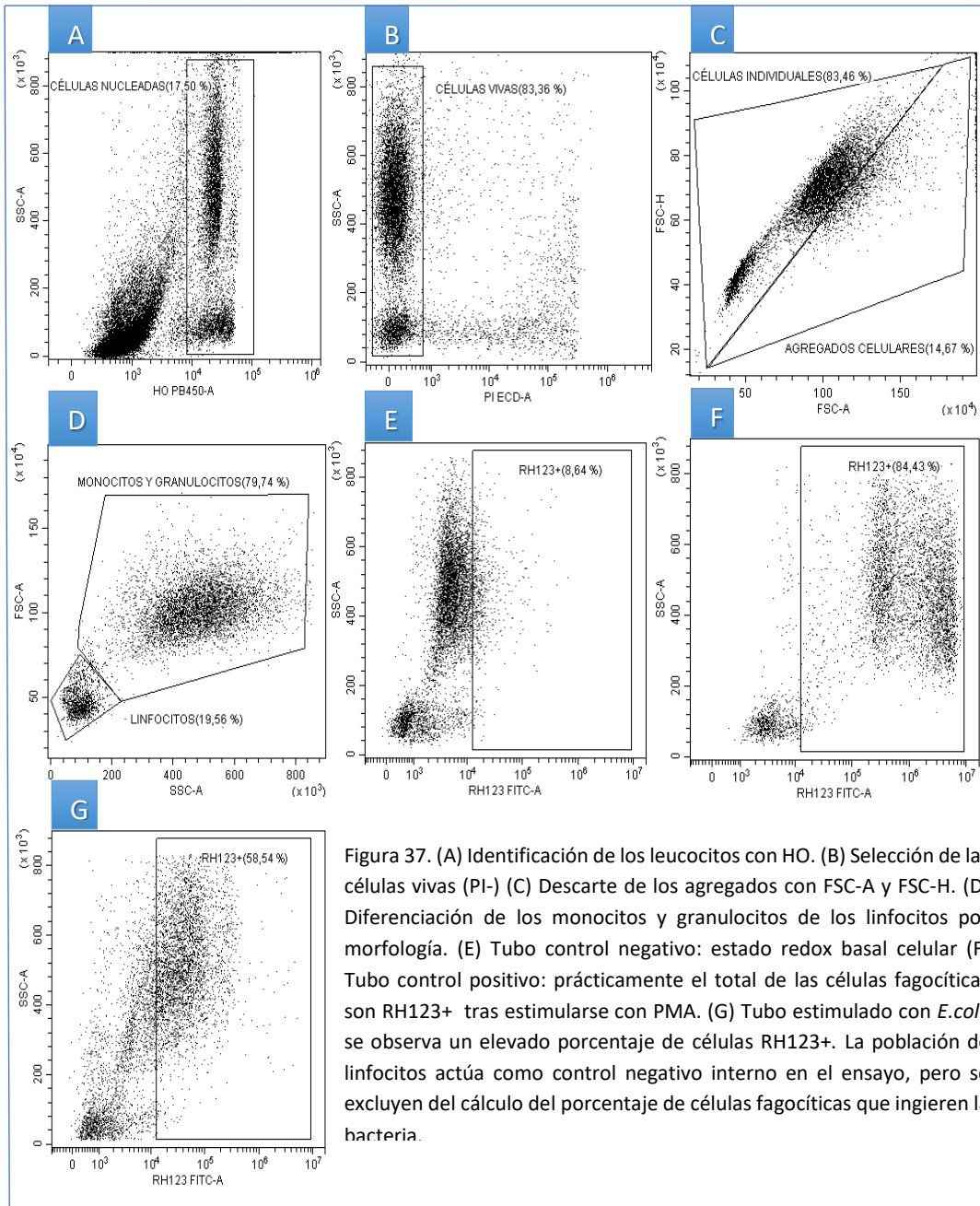


Figura 37. (A) Identificación de los leucocitos con HO. (B) Selección de las células vivas (PI-) (C) Descarte de los agregados con FSC-A y FSC-H. (D) Diferenciación de los monocitos y granulocitos de los linfocitos por morfología. (E) Tubo control negativo: estado redox basal celular (F) Tubo control positivo: prácticamente el total de las células fagocíticas son RH123+ tras estimarse con PMA. (G) Tubo estimulado con *E.coli*: se observa un elevado porcentaje de células RH123+. La población de linfocitos actúa como control negativo interno en el ensayo, pero se excluyen del cálculo del porcentaje de células fagocíticas que ingieren la bacteria.

#### 4.2.2 Evaluación de la capacidad proliferativa de los linfocitos T.

En este proyecto nos hemos centrado en estudiar la capacidad proliferativa de los linfocitos T empleando como mitógeno la concanavalina A (ConA). Para ello, nos hemos basado en un protocolo publicado en delfines anteriormente (Cámara-Pellisó et al., 2007). Todo el procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar para asegurar la esterilidad de la muestra.

En primer lugar, las células mononucleares (MNCs) fueron aisladas mediante gradiente de densidades diluyéndose la sangre heparinizada del animal en PBS estéril y filtrado en una proporción 1:1. Posteriormente se vertió cuidadosamente la dilución de sangre en un tubo con la mitad del volumen de Histopaque 1077 que de sangre diluida, evitando que ambas fases se mezclaran. El tubo se centrifugó a 800 g y 4°C durante media hora quitando el freno de la centrífuga, tras lo cual las MNCs, principalmente linfocitos, formaron un anillo entre el plasma sanguíneo y la solución de Histopaque 1077 (Figura 38).

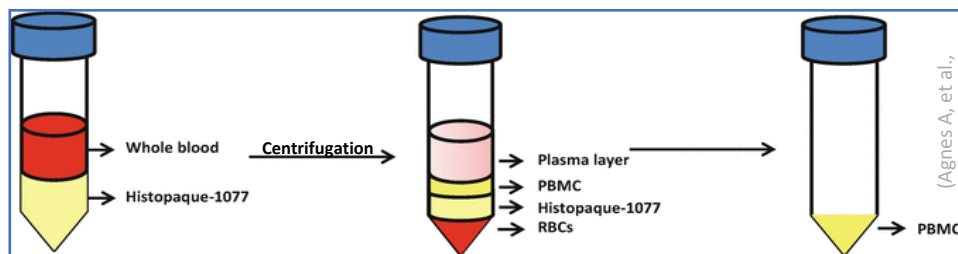


Figura 38. Aislamiento de los linfocitos por gradiente de densidad empleando Histopaque 1077.

Se recogieron cuidadosamente las células del anillo con una micropipeta y se colocaron en otro tubo, donde se enrasó la muestra hasta 10 ml con PBS estéril y filtrado para llevar a cabo los lavados. Para ello, se centrifugaron a 200 g y 4°C durante 10 minutos (activando de nuevo el freno de la centrífuga). Tras varios lavados con PBS, se eliminaron de la muestra posibles restos de otras fases y finalmente se resuspendió en 500  $\mu$ l de medio modificado para linfocitos. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular en la Cámara de Neubauer con azul de tripano y se ajustó la suspensión de MNCs a  $2,5 \times 10^6$  células vivas/ml.

A continuación, se dispuso una placa de 96 pocillos donde preparamos:

- 1- Pocillos test sin tóxico: Sirvieron para evaluar la capacidad proliferativa fisiológica de los linfocitos. Añadimos: 100 µl de muestra con células, 50 µl de medio modificado para linfocitos y 50 µl del stock de ConA para alcanzar la concentración final deseada de 10 µg/ml en el pocillo.
1. Pocillos test con tóxico: Sirvieron para evaluar alteraciones en la capacidad proliferativa linfocítica de los animales ante la exposición a un contaminante. Añadimos: 100 µl de muestra con células, 50 µl del contaminante bajo estudio a una concentración cuatro veces superior a la concentración final deseada (diluido en medio modificado para linfocitos) y 50 µl de ConA para alcanzar la concentración final deseada de 10 µg/ml en el pocillo.
2. Pocillo control negativo sin células: Se empleó como control interno del experimento. Preparamos dos tipos de controles: (a) Añadimos: 200 µl de medio y (b) Añadimos: 150 µl de medio y 50 µl de ConA.
3. Controles negativos con células: Se empleó como control interno del experimento. Añadimos: 100µl de muestra con células y 100 µl de medio modificado para linfocitos.

La placa se incubó a 37°C en un incubador CO<sub>2</sub> durante 48 horas, tras las cuales se añadieron a cada pocillo 20 µl de Alamar Blue y se dejaron incubar durante 24 horas más antes de su lectura en el espectrofotómetro. El Alamar Blue es un indicador de viabilidad celular basado en el poder reductor de las células vivas para transformar la resazurina del reactivo en resorufina, una molécula fluorescente. Las células vivas reducen constantemente la resazurina en resorufina, utilizándose como una medida cuantitativa de viabilidad y cantidad celular. Así pues, la intensidad del color rosa y fluorescencia detectables son indicadores del grado de proliferación celular de la muestra. Para detectar la reducción del Alamar Blue empleamos la función de espectrofotómetro del aparato VICTOR2™D midiendo la absorbancia de las muestras a 570nm y 620 nm.

Para determinar el porcentaje de reducción del AlamarBlue se aplicó la siguiente formula recomendada por el fabricante:

$$\% \text{ reducción} = \frac{117.216 \times T_{570} - 80.586 T_{600}}{155.677 \times C_{600} - 14.652 C_{570}} \times 100$$

Donde 117.216 es el coeficiente de extinción molar del Alamar Blue oxidado a 600 nm, 80,586 a 570 nm, el 155,677 el coeficiente de extinción molar del Alamar Blue reducido a 570 nm, y el 14,652 a 600 nm.  $T_{570}$  es la absorbancia a 570 nm de los pocillos test,  $T_{600}$ , a 600nm y  $C_{600}$  y  $C_{570}$  son las absorbancias a 600 y 570 nm de los pocillos control sin células (con medio, pero sin células).

Tras ello, para determinar la proliferación relativa de la muestra se dividió el % de reducción de los pocillos con mitógeno entre el % de reducción de los pocillos con células pero sin estimulación con mitógeno.

#### **4.2.3 Detección de citoquinas extracelulares.**

Para estudiar si diferentes contaminantes empleados en el estudio eran capaces de alterar la producción de citoquinas en delfines empleamos el Kit Quantibody® Dolphin Cytokine Array 1 (QAD-CYT-1- RayBiotech), un Kit específico para muestras de delfín capaz de medir 10 citoquinas diferentes (IFN gamma, IL-1 beta, IL-1ra, IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, IP10, TNF Alpha).

El Kit permite medir simultáneamente la concentración de todas las citoquinas en la muestra. Se proporciona un soporte que consiste en un portaobjetos dividido en 16 celdas. La base de cada celda está tapizada por múltiples spots o filas de anticuerpos. Cada fila está constituida por anticuerpos específicos para una citoquina en concreto, siendo su posición conocida, para el posterior análisis de los resultados (Figura 39). Puesto que disponíamos de 16 celdas, empleamos 8 de ellas para realizar la curva estándar y el control interno del Kit y 8 para nuestras muestras bajo estudio.

Para evaluar si ciertos contaminantes son capaces de alterar los niveles de citoquinas en sangre de delfín, incubamos la sangre con cada tóxico durante 24 horas a 37°C en un



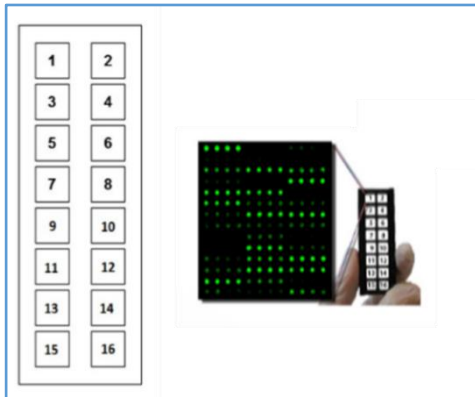


Figura 39. Representación de uno de los portaobjetos proporcionados por el Kit (con 16 pocillos) y detalle de los spots (lugares de unión de las citoquinas) presentes en cada pocillo.

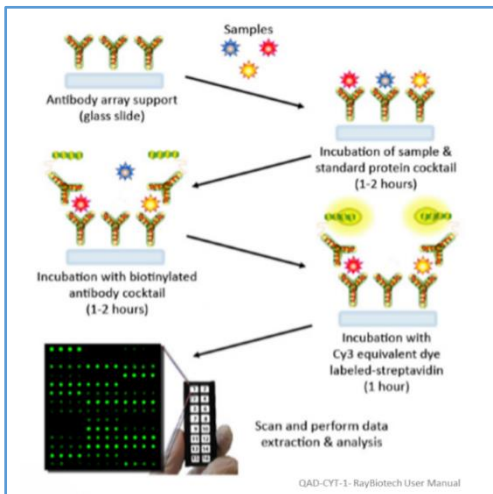


Figura 40. Fundamento del Kit Quantibody® Dolphin Cytokine Array 1.

incubador de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación obtuvimos el plasma de cada muestra y lo empleamos en el estudio de detección de citoquinas.

Añadimos 100 µl de las muestras (plasma) o los estándares a cada pocillo y las dejamos incubar a temperatura ambiente durante 2 horas. Durante este tiempo, las citoquinas presentes en cada muestra o estándar se unieron específicamente a sus anticuerpos unidos a la base del soporte. Tras la incubación, se realizaron varios lavados para eliminar los restos de la muestra no unidos específicamente al fondo y se añadió el cocktail de anticuerpos de detección proporcionado por el kit. Este cocktail está compuesto por anticuerpos específicos para las citoquinas pero capaces de unirse a otro epítipo diferente al que reconocen los anticuerpos de la base del soporte. Estos segundos anticuerpos van unidos a biotina. De esta manera, las citoquinas se reconocen por dos epítipos diferentes, cada uno de ellos reconocido por un anticuerpo diferente, formando una estructura similar a un “sandwich”. Se dejó incubar el porta durante toda la noche a 4°C para el correcto reconocimiento y unión de los

anticuerpos, tras lo cual se llevaron a cabo lavados para retirar el exceso de producto y se añadió estreptavidina (una proteína con gran afinidad por la biotina) conjugada con el

fluorocromo Cy3. Las muestras se dejaron incubar con la estreptavidina conjugada con el fluorocromo durante una hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, se retiró el exceso de producto y se realizaron lavados. Una vez secado el portaobjetos, se visualizó la imagen en el escáner y se analizaron los resultados con el programa GenePix® Pro 7 Microarray Acquisition & Analysis Software (Figura 40).

#### *4.2.4 Análisis del potencial de membrana mitocondrial (PMM) en sangre periférica.*

Para la detección del PMM se empleó el compuesto tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM), un fluorocromo lipofílico y catiónico que es permeable a las células. Una vez en el interior celular, las mitocondrias activas lo secuestran en proporción al PMM, exhibiendo el TMRM su fluorescencia roja. Esta fluorescencia, por tanto, es mayor cuanto mayor sea el PMM. Para no alterar la función mitocondrial al añadir este compuesto, se debe emplear a concentraciones menores a 1  $\mu\text{M}$  (Creed y Mckenzie, 2019). En concreto, estudiamos el potencial de membrana mitocondrial en los leucocitos de belugas, morsas y principalmente en delfines.

Para ello se añadieron 50 $\mu\text{l}$  de sangre heparinizada del animal en un tubo de citómetro y se lisaron con Versalyse Lysing Solution (500  $\mu\text{l}$  en cetáceos y 1 ml en pinnípedos). Tras los 10 minutos de incubación con el lisante, la muestra se lavó con 3 ml de PBS centrifugando a 200 g durante 5 minutos. Tras retirar el sobrenadante las células se resuspendieron en 300  $\mu\text{l}$  de RPMI con TMRM a 100 nM. Añadimos Vybrant Dye Cycle Green (VDC Green) a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . El VDC Green es un marcador nuclear permeable a las células vivas que nos permite distinguir los leucocitos de los restos de eritrocitos y del debrís celular. Las muestras se agitaron con vórtex y se incubaron a 37°C en un incubador durante 15 minutos. Finalmente se añadió 3  $\mu\text{g/ml}$  de DAPI previamente a la adquisición en el citómetro de flujo (Figura 41).

El citómetro fue configurado para medir la señal de Forward Scatter (FSC) y de side scatter (SSC) así como las fluorescencias emitidas por el VDC Green (exc 488nm/em 525nm, canal FITC), DAPI (exc 405 nm/em 450nm, canal PB450) y TMRM (exc 561nm/em 585-610nm, canales PE y ECD).

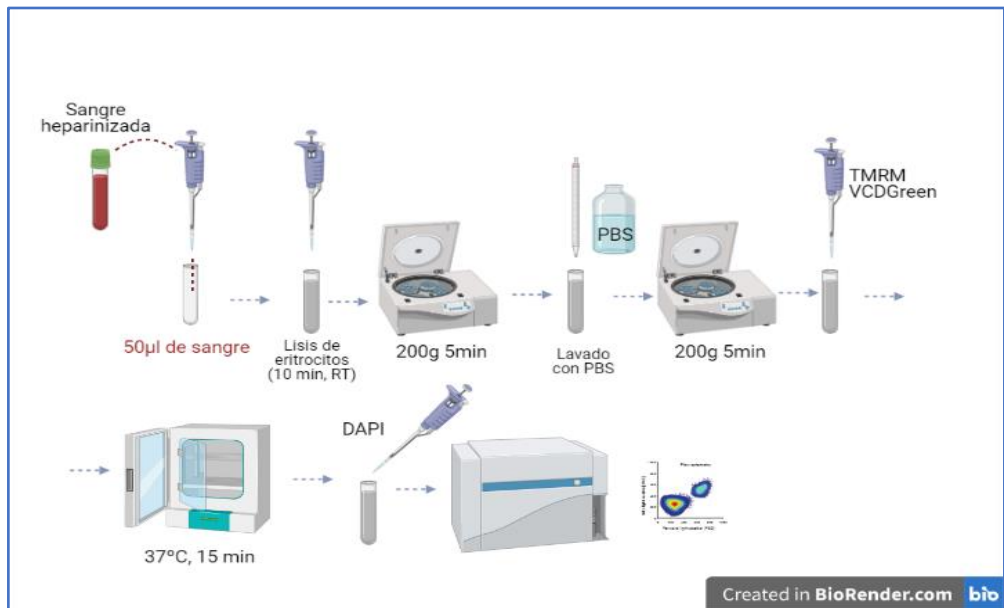


Figura 41. Protocolo adaptado a mamíferos marinos para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial leucocitario.

La selección de poblaciones se muestra en la Figura 42. Los leucocitos se identificaron empleando el marcador nuclear VDC-Green, considerándose las células positivas a la fluorescencia verde como células nucleadas (Figura 42 A). Las células muertas se descartaron seleccionando los eventos negativos a la fluorescencia del DAPI (Figura 42 B) y los agregados celulares se eliminaron enfrentando las señales de FSC-A y FSC-H (Figura 42 C). Posteriormente, se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) del TMRM en los leucocitos vivos y no agregados, empleando para ello el canal de fluorescencia PE (Figura 42 D). El análisis de los resultados se realizó con el programa CytExpert empleando los mismos gráficos que en la adquisición de muestras (Figura 41) y los resultados de cada animal se exportaron a una hoja Excel.

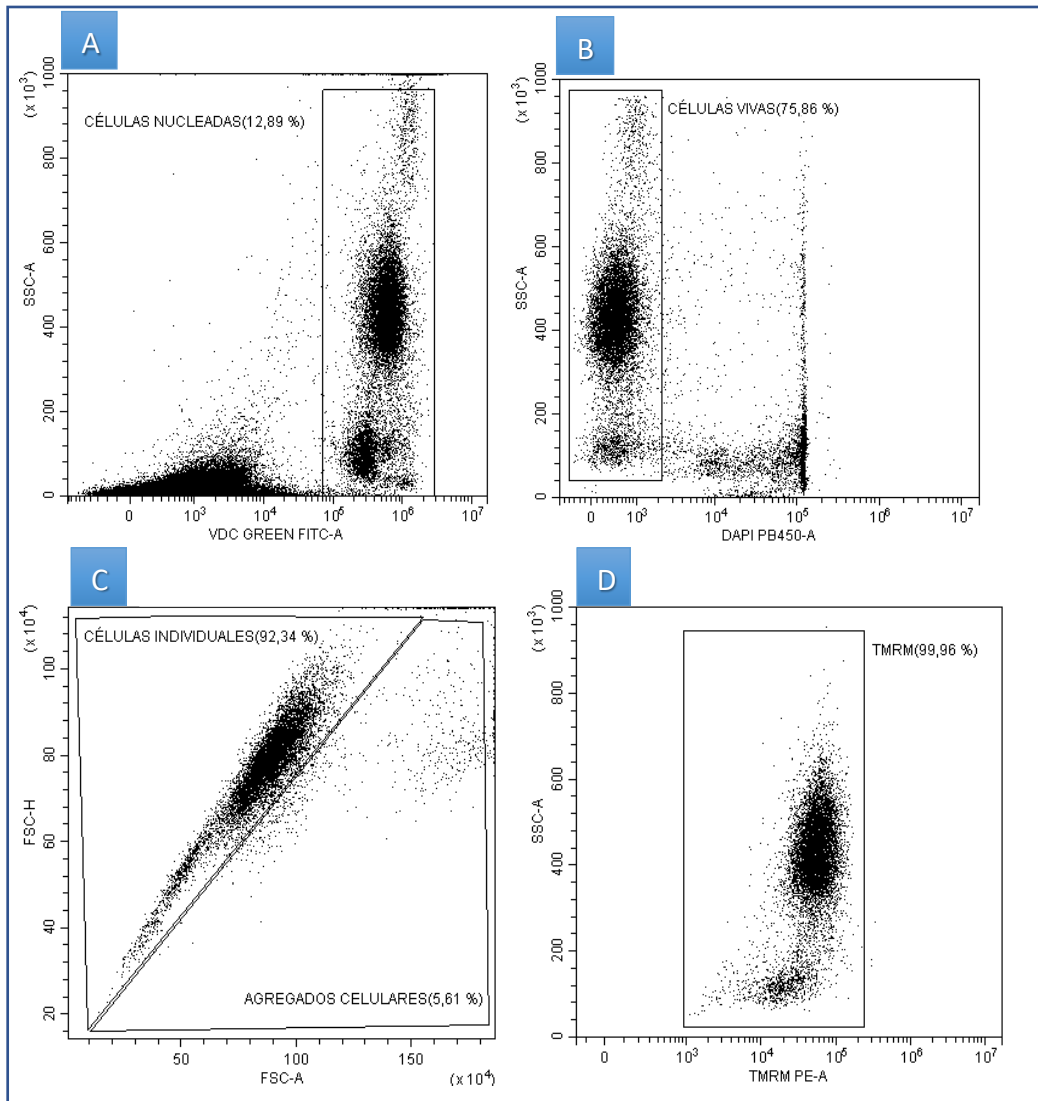


Figura 42. (A) Identificación de los leucocitos con VDC-Green. (B) Discriminación de las células vivas con DAPI. (C) Descarte de los agregados celulares. (D) Medida de la IMF del TMRM en el canal PE.

#### 4.2.5 Análisis de apoptosis y necrosis celular en sangre periférica.

Durante el proceso de apoptosis, las células exponen la fosfatidilserina (PS) a su superficie, tras lo cual, la membrana se va fragmentando, dejando el núcleo expuesto, hasta perderse por completo derivando en una necrosis secundaria (Figura 43).

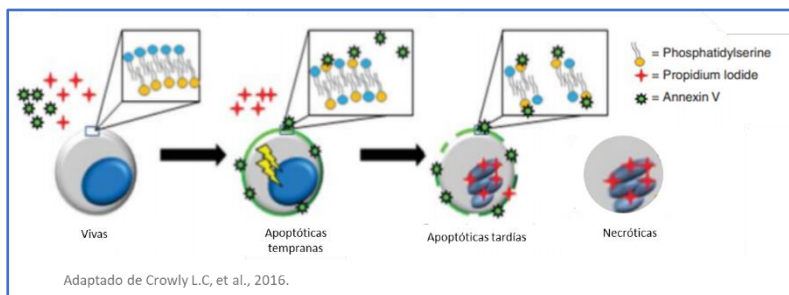


Figura 43. Proceso de apoptosis y necrosis secundaria. En apoptosis temprana la célula expone la PS pero su membrana permanece intacta. En apoptosis tardía esta se fragmenta dejando expuesto el núcleo, y acaba por perderse en las células necróticas.

En primer lugar, se lisaron 100  $\mu$ l de sangre con Versalyse Lysing Solution (500  $\mu$ l ó 1 ml según la especie). Tras 10 minutos a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con 3 ml de PBS centrifugando a 200 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de tampón de unión de anexina, se añadieron 2  $\mu$ l de Anexina V-FITC, 1  $\mu$ l de PI (proporcionados en el kit de Anexina V-FITC/PI) y 1  $\mu$ l de Hoechst 33342 (1 mg/ml). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos, tras lo cual se añadieron 200  $\mu$ l de tampón de anexina. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo lo antes posible, manteniéndose en hielo hasta ese momento (Figura 44).

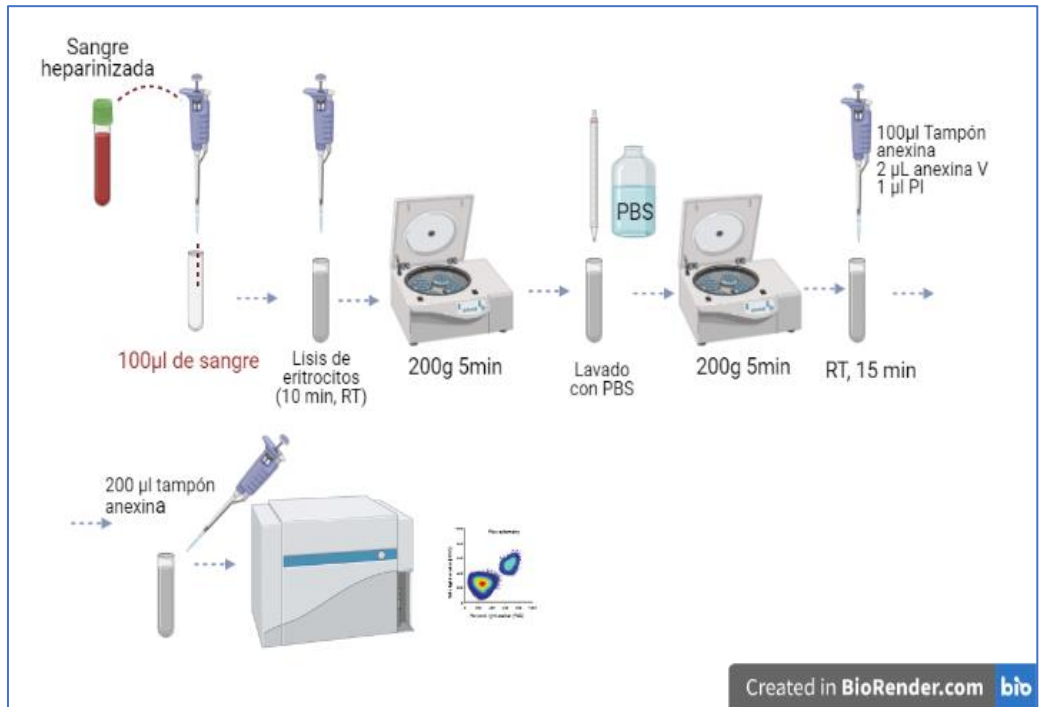


Figura 44. Protocolo para la evaluación de la viabilidad celular, apoptosis y necrosis de los leucocitos en mamíferos marinos.

El citómetro de flujo se configuró para medir las señales FSC, SSC, la fluorescencia de la Anexina V-FITC (exc 488nm/em 525 nm), la fluorescencia del PI (exc 561 nm/em 610 nm) y la fluorescencia de Hoechst (exc 405 nm/ em 450 nm).

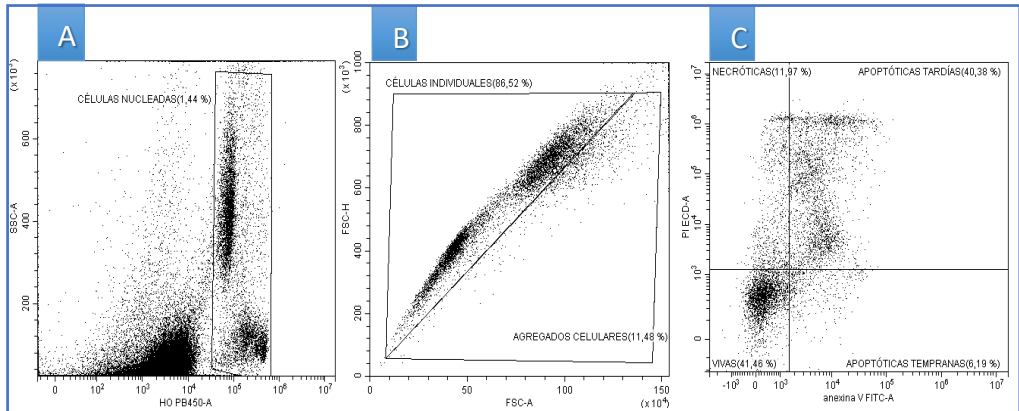


Figura 45. (A) Identificación de los leucocitos con Hoechst. (B) Descarte de los agregados celulares mediante FSC-A y FSC-H. (C) Seleccionando las células individuales: Identificación de las células vivas (Anex -/PI-), apoptóticas tempranas (Anex +/PI-), apoptóticas tardías (Anex +/PI+) y necróticas (Anex -/PI+).

En primer lugar, se identificaron los leucocitos como los eventos positivos a la fluorescencia del Hoechst 33342 (Figura 45 A). Seleccionando esta población, se eliminaron los agregados celulares utilizando las señales de FSC-A y FSC-H (Figura 45 B). Tras la selección de leucocitos individuales, se discriminaron las células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas en base a la expresión de PS en la cara externa de la membrana plasmática y al estado de su membrana celular. Las diferentes subpoblaciones se visualizaron en el dot plot de Anexina V-FITC y PI (Figura 45 C): las células vivas (Anexina -/ PI -) no expresan PS en la cara externa de su membrana y ésta es impermeable al PI, las células apoptóticas tempranas (Anexina +/ PI -) exponen la PS en la cara externa de su membrana, pero siguen siendo impermeables al PI. En la región de células Anexina +/ PI + encontramos una mezcla de células apoptóticas tardías, que exponen la PS en su cara externa y son permeables en mayor o menor medida al PI, y de necróticas, que son permeables al PI y pueden marcarse con Anexina V de forma inespecífica al poder penetrar a través de la membrana dañada y unirse a la PS que se encuentra en la cara interna de la membrana. La región de células Anexina-/PI+ son células necróticas, en las que los núcleos quedan desnudos al producirse la pérdida total de la membrana plasmática.

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa CytExpert, determinando el porcentaje de células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas en cada muestra. En los ensayos de inmunotoxicología, las muestras expuestas al contaminante se compararon con las muestras control para determinar si el xenobiótico produjo algún efecto en la viabilidad, apoptosis y/o necrosis celular.

### **4.3 Establecer un rango de valores de referencia para la capacidad fagocítica, el estado redox y el potencial de membrana mitocondrial fisiológicos en animales sanos de cada especie.**

Establecimos un rango de valores de referencia en animales sanos de cada una de las especies, para cada uno de los siguientes parámetros inmunitarios:

1. Capacidad de ingestión del patógeno por parte de las células fagocíticas
2. Capacidad de producción del estallido respiratorio por parte de las células fagocíticas
3. Estado redox basal de las células fagocíticas
4. PMM fisiológico de los leucocitos

Para ello, en primer lugar, en cada individuo se calculó la mediana de los resultados obtenidos durante los diferentes días en que fue muestreado, descartando los resultados obtenidos los días en que los animales presentaron algún problema de salud.

A partir del dato de la mediana de cada animal, para cada especie se calculó la media y el error estándar de los resultados obtenidos en toda la población, obteniendo así un rango de valores de referencia (media $\pm$ SEM) para cada parámetro en individuos sanos en cada una de las especies por separado.

A partir de los valores de referencia extraídos en este estudio con muestras de animales sanos se pudieron evaluar alteraciones en cada parámetro inmunitario ante la exposición a determinados contaminantes, patologías o estrés.



Los datos más robustos fueron obtenidos en delfines, puesto que el tamaño poblacional era el mayor, así como el número de muestras extraídas por individuo.

Esta metodología fue útil para el control interno de los animales del estudio, pero para extrapolar los resultados a otros acuarios sería conveniente realizar estudios rutinarios con poblaciones de animales albergadas en diferentes centros zoológicos.

## **5. Caracterización de la funcionalidad plaquetaria en animales sanos.**

Para evaluar si el estrés crónico, la exposición a algunos xenobióticos o determinadas patologías pueden alterar la funcionalidad plaquetaria en mamíferos marinos y por tanto predisponerlos a padecer problemas hemostáticos, debimos estudiar primero cómo funcionan las plaquetas en animales sanos. Para ello, el primer paso fue identificar un marcador plaquetario útil para cada una de las especies bajo estudio. Para la evaluación de la función plaquetaria se estudiaron dos fases de la activación de las plaquetas: el aumento de calcio citosólico y la liberación de micropartículas. Por otro lado, se puso a punto la metodología para detectar y cuantificar plaquetas reticuladas en delfines, belugas y leones marinos. Las plaquetas reticuladas o inmaduras se incrementan en sangre ante un proceso hemorrágico, suponiendo su identificación y cuantificación una herramienta muy útil en el diagnóstico precoz y seguimiento de la evolución de enfermedades de tipo hemorrágico. El estudio de la activación plaquetaria, la detección de micropartículas y de plaquetas reticuladas son técnicas totalmente novedosas en mamíferos marinos. Nunca antes se habían llevado a cabo estudios de este tipo en estas especies, lo cual supone un novedoso aporte al campo de la clínica veterinaria y la investigación de cetáceos y pinnípedos.

### **5.1 Evaluación de la activación plaquetaria a través del estudio de dos de sus fases en animales sanos.**

#### ***5.1.1 Identificación de un marcador plaquetario en mamíferos marinos adecuado para citometría de flujo.***

Como hemos mencionado anteriormente, no existen anticuerpos comerciales contra las células de estas especies, por lo que estudiamos si existía reactividad cruzada con anticuerpos comerciales contra células humanas. Para ello, se prepararon dos tubos; uno negativo (sin

anticuerpo) y otro positivo (con anticuerpo). En cada tubo se añadieron 100  $\mu$ l de sangre entera citratada y en el tubo positivo se añadió el volumen de anticuerpo especificado por el fabricante. Tras agitar los tubos durante unos segundos, se dejaron incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos. Finalmente, las muestras se diluyeron en una proporción 1:200 en PBS y se analizaron en el citómetro. El anticuerpo contra CD41-PE (Clon P2, Beckman Coulter) resultó útil para identificar las plaquetas en delfines, belugas, morsas, leones marinos y focas, como se muestra en la Figura 46.

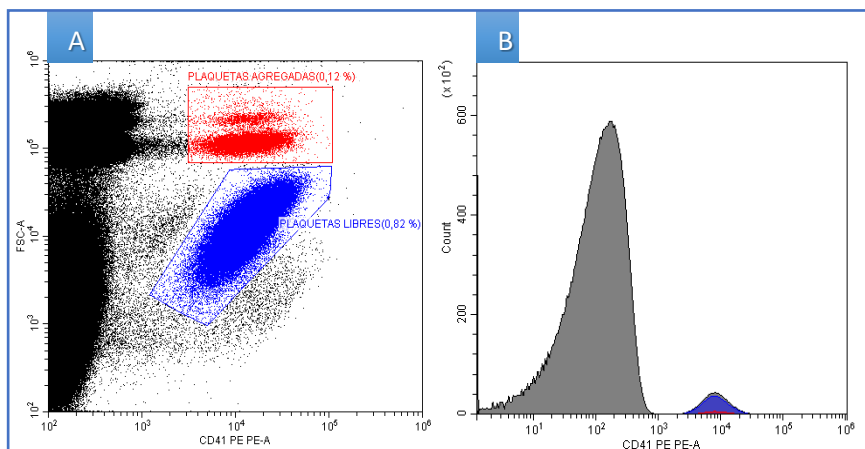


Figura 46. (A) Tubo marcado con el anticuerpo frente a CD41-PE (Clon P2, Beckman Coulter), donde se observa el marcaje positivo de las plaquetas. Por tamaño relativo (FSC), podemos distinguir las plaquetas libres y las plaquetas agregadas a otros tipos celulares como los leucocitos o eritrocitos. Los eventos con menor FSC se corresponden con plaquetas fragmentadas, restos plaquetarios e incluso micropartículas. (B) Histograma del marcaje con CD41.

### 5.1.2 Estudio de la movilización de calcio intraplaquetario.

Para desarrollar una técnica útil en el estudio de la movilización de calcio intraplaquetario en estas especies nos basamos en la metodología que puso a punto nuestro mismo grupo anteriormente para muestras humanas (Monteiro et al., 1999; Monteiro et al., 2003).

Previamente a la realización del protocolo con las muestras de los animales se preparó el tampón Tyrode modificado para la correcta conservación de las plaquetas durante el procesamiento de las muestras. Cada día antes de comenzar el experimento se preparó el tampón Tyrode rico en calcio. Dado que el tampón está libre de calcio, la mayoría del calcio que se moviliza hacia el citosol procede de los reservorios internos de la plaqueta, y no del espacio extracelular.

La sangre citratada del animal se diluyó en una proporción 1:10 con tampón Tyrode completo. A la dilución se añadió Fluo-4 AM a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ . Las muestras se agitaron cuidadosamente con los dedos para no dañar la integridad de las plaquetas y se incubaron a 37°C en un incubador durante 15 minutos. Transcurrido este período, se incubaron 25  $\mu\text{l}$  de la suspensión marcada con Fluo-4-AM con 5  $\mu\text{l}$  del anticuerpo CD41-PE durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por norma general se prepararon dos tubos por cada muestra original y en un primer momento se realizaron también controles negativos (Figura 48 D). Tras la incubación con el anticuerpo, las muestras se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de tampón Tyrode completo y se transfirieron a microtubos o tubos de 1,5 ml, quedando listas para su adquisición en el citómetro. Las muestras se analizaron lo antes posible, normalmente inmediatamente tras su preparación.

El citómetro de flujo se configuró para medir las señales FSC, SSC, la fluorescencia del Fluo-4 (exc 488nm/em 525 nm), la fluorescencia del CD41-PE (exc 561nm/em 585 nm) y el tiempo. Todas las señales se adquirieron en amplificación logarítmica.

Las plaquetas se identificaron empleando la señal de FSC y la fluorescencia del anticuerpo CD41-PE, considerando los eventos positivos a la PE y con menor señal de FSC las plaquetas no unidas a otras células. Aquellas con mayor señal de FSC se consideraron plaquetas unidas o coincidentes con leucocitos o eritrocitos (Figura 47 A). Los agregados plaquetarios se descartaron empleando las señales de pico y área del FSC (Figura 47 B). Tras seleccionar únicamente las plaquetas no agregadas, se evaluó la respuesta de éstas a la adición de ADP. En un principio, por cada animal se prepararon dos tubos de muestra para evaluar la estimulación con 12  $\mu\text{M}$  y 24  $\mu\text{M}$  de ADP por separado, basándonos de nuevo en la bibliografía previa (Monteiro et al., 1999). Para la obtención de los valores de referencia fisiológicos y los estudios de toxicología *in vitro* se empleó el ADP a 24  $\mu\text{M}$ . La movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en respuesta a la estimulación con ADP se evaluó cinéticamente,

observando los cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a lo largo de la adquisición de la muestra. Las muestras se adquirieron durante 10 minutos en el estudio de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico fisiológico en animales sanos y durante 5 minutos en los estudios de toxicología *in vitro*. Se registró la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 en el tiempo empleando un dot plot que enfrentara ambos parámetros (Figura 47 C). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico basal (sin estimular con ADP) se registró durante 20-50 segundos, tras los cuales se añadió el ADP mientras la muestra seguía adquiriéndose en el citómetro de flujo. Para ello, el ADP se introdujo en la muestra con una micropipeta y rápidamente se mezcló con ésta con ayuda de una pipeta Pasteur. En todo momento el citómetro siguió adquiriendo muestra, sin existir por tanto ninguna brecha temporal entre la adición del estímulo y la lectura del resultado. Tras la estimulación con ADP, el citómetro siguió adquiriendo la muestra hasta el tiempo final de adquisición, registrando los cambios en la fluorescencia de Fluo-4 a lo largo del tiempo.

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software Flowjo, utilizando la misma estrategia de selección mediante gates en los histogramas que en la adquisición de muestras. La movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario fue representada en un dot plot que enfrentó la señal de fluorescencia del Fluo-4 y el tiempo (Figura 48 A). Se establecieron ocho regiones rectangulares que dividían el dot plot para realizar un seguimiento de las variaciones de la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 en el tiempo. (Figura 48 B) La región 1 corresponde a la fluorescencia basal de Fluo-4 antes de activar las plaquetas con ADP. La región 2 incluye el pico de fluorescencia tras la estimulación plaquetaria con ADP debido al consiguiente aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Las regiones 3 a 7 miden los cambios en la intensidad media de fluorescencia de Fluo-4 con el tiempo y la región 8 proporciona la medida final tras los 5 ó 10 minutos de adquisición de la muestra.

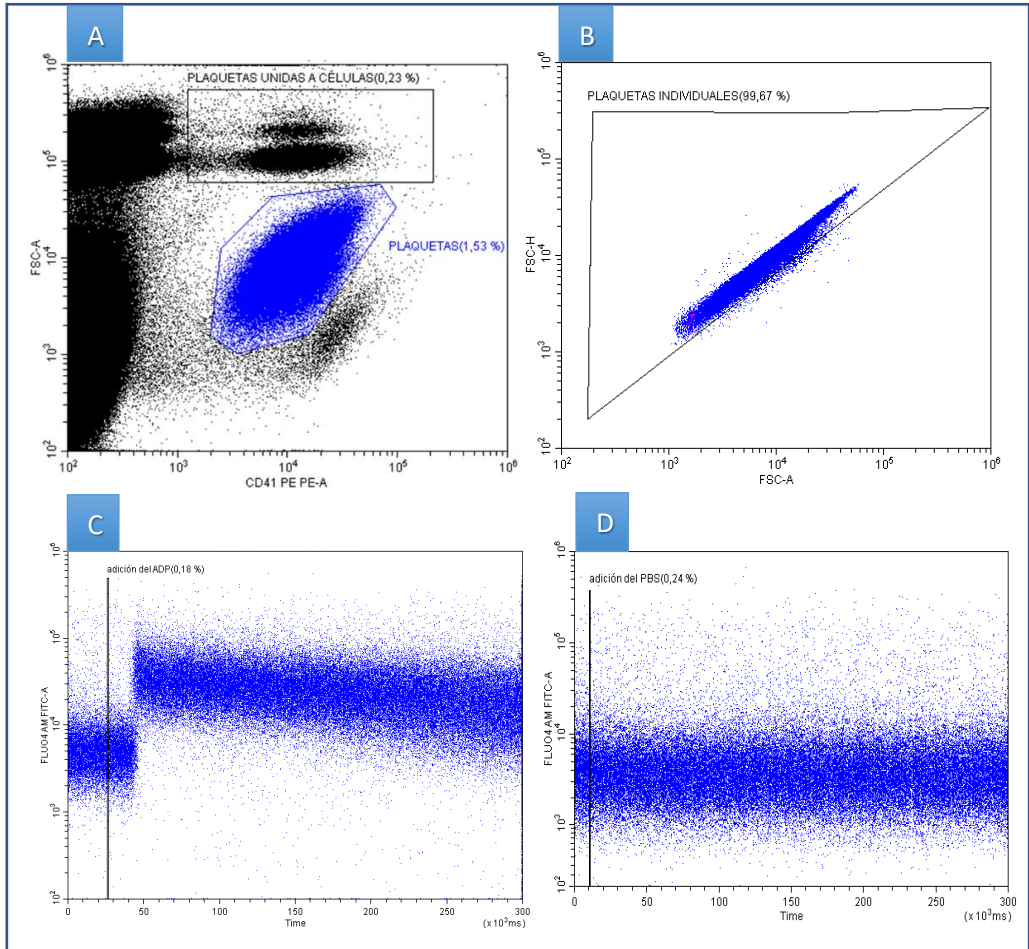


Figura 47. (A) Identificación de las plaquetas no unidas a eritrocitos o leucocitos empleando la señal de FSC y la fluorescencia del anticuerpo frente a CD41. (B) Descarte de las plaquetas agregadas a otras plaquetas enfrentando las señales de FSC-A y FSC-H. (C) Cinética de la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 en el tiempo antes y después de la adición de ADP en el segundo 25. (D) Control negativo adicionando PBS en lugar de ADP.

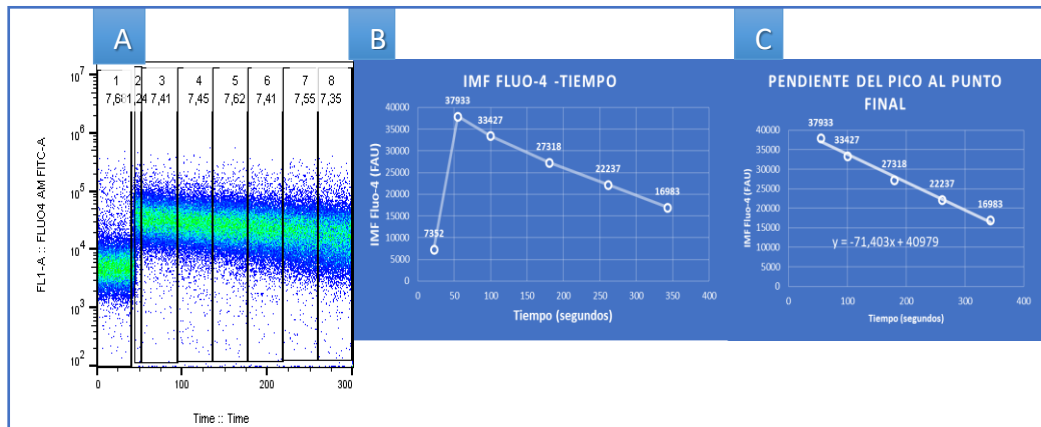


Figura 48. (A) Regiones 1 a 8 en el dot plot que enfrenta fluorescencia del Fluo-4/tiempo en Flowjo. (B) Gráfico de los valores de intensidad media de fluorescencia y de tiempo en cada región representados en una gráfica. (C) Pendiente de la recta desde el punto 2 al punto 8 (pico y punto final).

De cada región (1-8) se obtuvieron la media del tiempo y la media de la intensidad de fluorescencia del Fluo-4 (medida en FAU). Estos valores se representaron en un gráfico (Figura 48 B y C), a partir del cual se calcularon los siguientes valores:

- Parámetros relacionados con la activación plaquetaria tras la adición de ADP.
  - Ratio o cociente entre la intensidad media de fluorescencia de Fluo-4 en el pico y en el punto basal. Este parámetro nos informa de las veces que el  $Ca^{2+}$  citosólico se incrementa tras la estimulación con ADP en el punto máximo con respecto a la concentración basal de la plaqueta en reposo.
  - Delta o diferencial entre la intensidad media de fluorescencia de Fluo-4 en el pico y en el punto basal. Este parámetro nos informa de la diferencia entre la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico entre las plaquetas activadas en el punto máximo y las plaquetas en reposo empleando como medida la IMF del Fluo-4 (FAU).

- Tiempo desde la adición de ADP hasta el pico de fluorescencia de Fluo-4 (segundos). Este parámetro mide el tiempo de respuesta de las plaquetas tras el estímulo de ADP.
- Parámetros relacionados con la recuperación plaquetaria a su estado de reposo tras la estimulación con ADP.
  - Ratio o cociente entre la intensidad media fluorescencia de Fluo-4 en el punto final y en el punto basal. Este parámetro muestra las veces que aumenta el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que permanece en las plaquetas activadas tras los 10 minutos de adquisición con respecto a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  de las plaquetas en reposo.
  - Delta o diferencial entre la intensidad media de fluorescencia de Fluo-4 en el punto final y en el punto basal. Este parámetro indica la diferencia entre el  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que permanece en la plaqueta activada tras los 10 minutos de adquisición y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en las plaquetas en reposo empleando como medida la IMF del Fluo-4 (FAU).
  - Pendiente de la fluorescencia de Fluo-4 desde su pico hasta el punto final. Este parámetro mide la velocidad de recuperación de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la activación con ADP.

Por otro lado, también se registró la concentración de plaquetas en la muestra contabilizando las plaquetas individuales por microlitro.

Otro agonista fisiológico de las plaquetas es la trombina. El protocolo se puso a punto también con este agonista, aunque, rutinariamente las muestras se estimularon con ADP. En el caso de estimularse con trombina, se añadió el péptido GPRP a una concentración de 2,5 mM al tiempo que se adicionó el anticuerpo, incubándose conjuntamente. El GPRP es un inhibidor de la polimerización de la fibrina. En el momento de estimular la muestra se utilizó trombina a una concentración final de a 0,05 ó 0,5 U/ml. El resto del protocolo y del análisis se llevó a cabo del mismo modo que empleando ADP como estímulo.

### *5.1.3 Expresión de la superficie procoagulante y liberación de micropartículas plaquetarias (MPPs).*

La detección de MPPs y el seguimiento a tiempo real de la exposición de fosfatidilserina (PS) y formación de MPPs en cetáceos y pinnípedos suponen una nueva herramienta en estudios fisiopatológicos y toxicológicos en estas especies.

Para ello, se adaptó un protocolo previamente descrito en humanos (Ponomareva et al., 2017) a estas especies. En primer lugar, se preparó una dilución 1:10 de sangre citratada del animal diluida en tampón Tyrode completo. En un nuevo tubo se dispensaron 100  $\mu$ l de la dilución, a los que se añadieron 20  $\mu$ l del anticuerpo frente a CD41 (CD41-PE, clon P2), 2  $\mu$ l de Anexina V-FITC y 150  $\mu$ l de tampón de unión de anexina. Las muestras se incubaron a 37°C en un incubador de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos, tras los cuales se añadieron 2 ml de tampón de unión de anexina a cada tubo. Se dispensaron 500  $\mu$ l de la suspensión marcada a un microtubo, para su adquisición en el citómetro de flujo. La lectura de las muestras en el citómetro de flujo se llevó a cabo lo antes posible, siempre durante la primera hora tras su preparación.

El citómetro de flujo se configuró para medir las señales FSC, SSC, la fluorescencia de la Anexina V-FITC (exc 488nm/em 525 nm), la fluorescencia de CD41-PE (exc 561nm/em 585 nm) y el tiempo. Para optimizar la detección de las micropartículas plaquetarias, se utilizó la señal de SSC procedente de láser violeta (405 nm, VSSC), ya que esta señal facilita la amplificación de las diferencias en los índices de refracción entre las partículas y su medio circundante, aumentando la capacidad de detección de exosomas, microvesículas y nanopartículas. Todas las señales se adquirieron en amplificación logarítmica.

A partir de estas muestras se pudieron detectar los niveles de MPPs basales en la sangre del animal y se pudo evaluar la formación en tiempo real de micropartículas al estimular las plaquetas con agonistas como el ADP o el ionóforo de calcio A23187. Tras la activación, las plaquetas (eventos CD41 positivos) exponen PS en la cara externa de la membrana y liberan micropartículas plaquetarias, también con contenido en PS y positivas a la fluorescencia del anticuerpo CD41-PE. Esta PS es detectable mediante el uso de la Anexina V-FITC, que se une a ella y emite fluorescencia.

Así pues, las muestras se pudieron analizar de dos formas:



- Detección de los niveles de MPPs basales en la sangre del animal.

En las muestras que se emplearon para la detección de los niveles basales de micropartículas, se analizaron los resultados directamente, sin estimular la muestra con ningún agonista. En primer lugar, se identificaron los eventos positivos a la fluorescencia del anticuerpo frente a CD41 (Figura 49 A). Seleccionando únicamente los eventos marcados con el anticuerpo (plaquetas y MPPs), distinguimos el porcentaje de plaquetas en reposo, de plaquetas activadas y de MPPs. Las plaquetas y las micropartículas se distinguieron en base al tamaño relativo de los eventos, considerándose aquellos con mayor señal de FSC las plaquetas y los de menor señal de FSC las micropartículas. Entre las plaquetas se pudieron distinguir las plaquetas en reposo, que no presentan la PS expuesta en la superficie, y por tanto son negativas para la fluorescencia de la Anexina V, y las plaquetas activadas, que exponen la PS en la superficie y por tanto son Anexina V positivas. Por su parte, los eventos con menor FSC y positivos a la fluorescencia de la Anexina V se consideraron como MPPs (Figura 49 B).

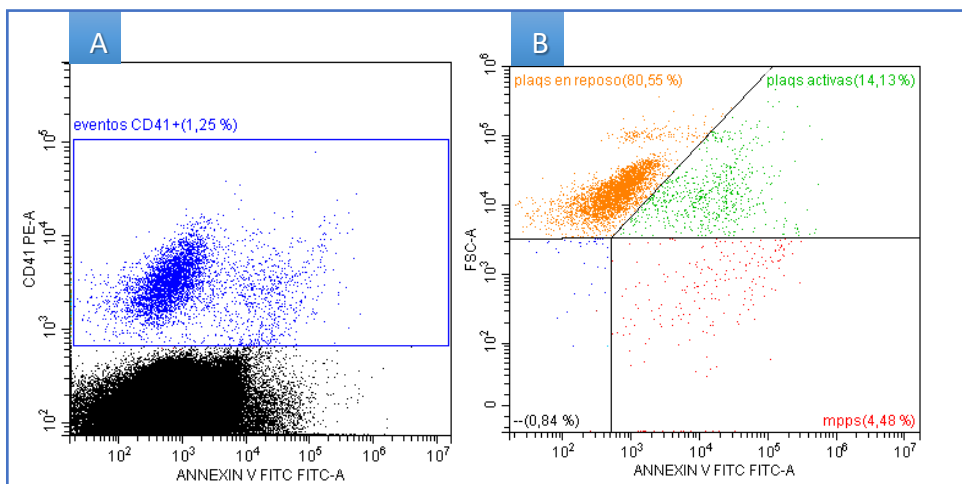


Figura 49. (A) Identificación de las plaquetas y las micropartículas plaquetarias mediante el uso del anticuerpo contra CD41. (B) A partir de los eventos positivos a CD41-PE, distinción entre plaquetas en reposo, plaquetas activadas y micropartículas plaquetarias en base al tamaño relativo (FSC) y a la exposición de fosfatidilserina (empleando la Anexina V como marcador de PS).

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa CytExpert, con el que se registró la concentración de plaquetas en reposo, plaquetas activas y MPPs en la muestra (eventos/ $\mu\text{l}$ ), los eventos totales tras 10 minutos de adquisición y el porcentaje de cada población respecto al total de eventos CD41 positivos (Figura 50). Para conocer el valor real en la sangre entera del animal se multiplicaron los resultados de concentración y eventos totales por el factor de dilución ( $\times 230$ ).




| Tube Name: LAZO CNT   |                          |        |          |
|---|--------------------------|--------|----------|
| Sample ID:  |                          |        |          |
| Population  | Events/ $\mu\text{L(V)}$ | Events | % Parent |
|  plaqs activas   | 33,45                    | 669    | 14,13 %  |
|  plaqs en reposo | 190,75                   | 3815   | 80,55 %  |
|  mpps            | 10,60                    | 212    | 4,48 %   |

Figura 50. Tras el análisis y diferenciación de las poblaciones de plaquetas activadas, en reposo y MPPs se llevó a cabo el registro de la concentración, los eventos totales y el porcentaje de cada población en la muestra empleando el programa CytExpert.

- Evaluación de la exposición de PS y liberación de MPPs a tiempo real tras estimular con un agonista.

En las muestras que se emplearon para la evaluación de la exposición de PS en las plaquetas y la liberación de MPPs, se empleó el ionóforo de calcio A23187 como agonista plaquetario. La respuesta ante el estímulo se registró a tiempo real durante 10 minutos, de forma similar a la empleada en el protocolo para el estudio de la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario detallado anteriormente.

En este caso, las plaquetas y MPPs se identificaron empleando la señal de SSC procedente del láser violeta (VSSC) y la fluorescencia del anticuerpo anti-human CD41-PE (Figura 51 A y D). Tras seleccionar la región CD41 positiva, se evaluó la respuesta de las plaquetas a tiempo real al ionóforo de calcio A23187 mediante el estudio cinético de la intensidad de fluorescencia de la Anexina V y de la señal de FSC en el tiempo. Las señales de Anexina V y FSC basales se registraron durante 20-50 segundos, tras los cuales se añadió  $1\mu\text{l}$  de A23187 (10 mg/ml en DMSO) mientras la muestra seguía adquiriéndose en el citómetro, del mismo

modo que el detallado en el apartado anterior. Los cambios a lo largo del tiempo de la intensidad de fluorescencia de la Anexina V (dados por la exposición de PS) y de la señal FSC (por la disminución de tamaño al producirse las micropartículas) se registraron durante 10 minutos (Figura 51 E y F). En el caso del tubo negativo, se añadió 1  $\mu$ l de DMSO en lugar del ionóforo, y no se observó ningún cambio en las señales de Anexina V y FSC (Figura 51 B y C).

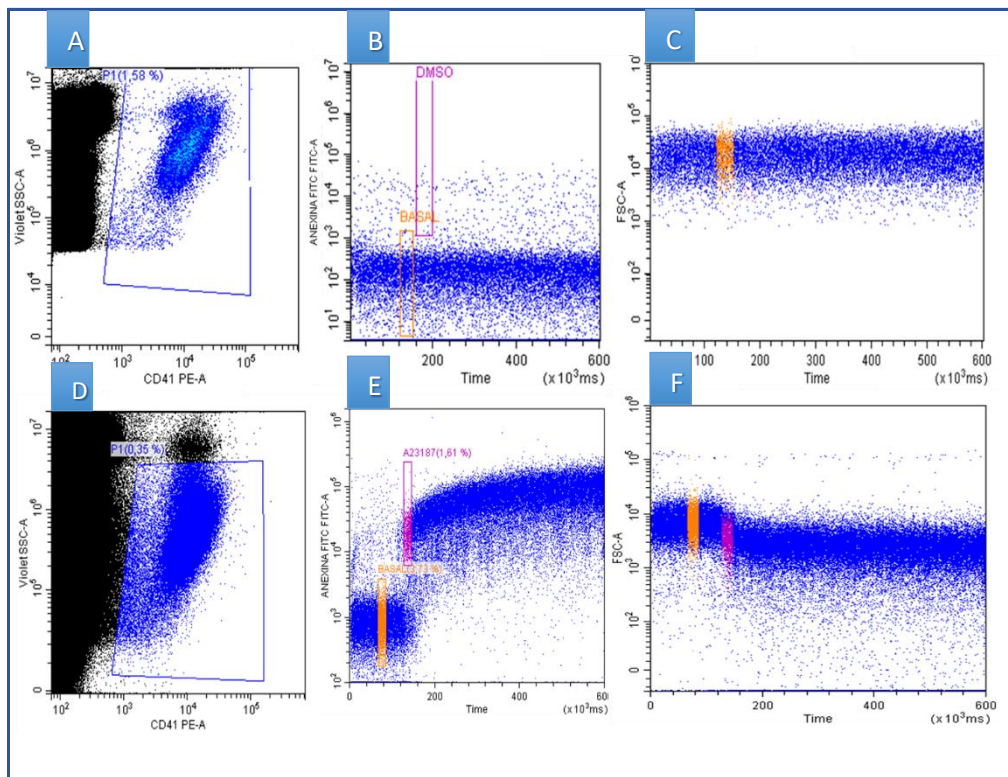


Figura 51. Tubo negativo: (A) Identificación de las plaquetas en sangre entera con CD41-PE. (B) Ausencia de exposición de la PS a la superficie plaquetaria y (C) ausencia de cambios en la señal FSC al añadir DMSO. Tubo positivo: (D) Identificación de plaquetas y MPPs marcadas con CD41-PE tras estimular con A23187. (E) Aumento en la exposición de PS y (F) disminución de la señal FSC al estimular con el ionóforo de calcio.

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el software Flowjo, utilizando la misma estrategia de selección mediante regiones que en la adquisición de muestras. Los cambios en las señales de Anexina V y de FSC en el tiempo fueron representados en dot plots. Se establecieron regiones rectangulares dividiendo estos dot plots para realizar un seguimiento de las variaciones de la intensidad de fluorescencia de la Anexina V y del FSC en el tiempo. En el caso del dot plot Anexina V/tiempo, la región A se corresponde con la intensidad de fluorescencia basal de Anexina V en las plaquetas en reposo. Tras estimular con el ionóforo, se observó un aumento en la intensidad media de fluorescencia de la Anexina V, debido a que las plaquetas se activaron y externalizaron la PS, uniéndose la Anexina V a ella e incrementándose su señal de fluorescencia. El pico de fluorescencia tras la estimulación se corresponde con la región B. A partir de ese momento, las regiones C a E registraron los cambios en la exposición de PS en el tiempo hasta los 10 minutos de adquisición (Figura 52 A). En el caso de la señal de FSC, la región 1 nos informa del tamaño relativo basal de las plaquetas antes de ser activadas por el ionóforo de calcio. Tras su estimulación con este agonista fuerte (no fisiológico), las plaquetas acabaron por fragmentarse en micropartículas de modo irreversible, por lo que el FSC disminuyó progresivamente con el tiempo. Estos cambios en el FSC se registraron empleando regiones (Figura 52 B).

A partir de estas regiones calculamos diferentes parámetros de la exposición de PS tras la estimulación de las plaquetas y de la liberación de MPPs.

En el caso de la cinética de la señal de FSC con el tiempo, se obtuvo para cada región (regiones 1 a 5) la media del valor de FSC y la media del tiempo en segundos. Estos valores se graficaron (Figura 52 D) y se calculó la pendiente de la recta que formaban, para cuantificar la velocidad de disminución del tamaño relativo de los eventos tras estimular las plaquetas con el ionóforo.

En el caso de la cinética de la intensidad de fluorescencia de la Anexina V con el tiempo, de cada región (A-E) extrajimos la media del tiempo y la media de la intensidad de fluorescencia de la Anexina V (medida en FAU). Estos valores se representaron en un gráfico (Figura 52 C), a partir del cual se calcularon los siguientes valores:

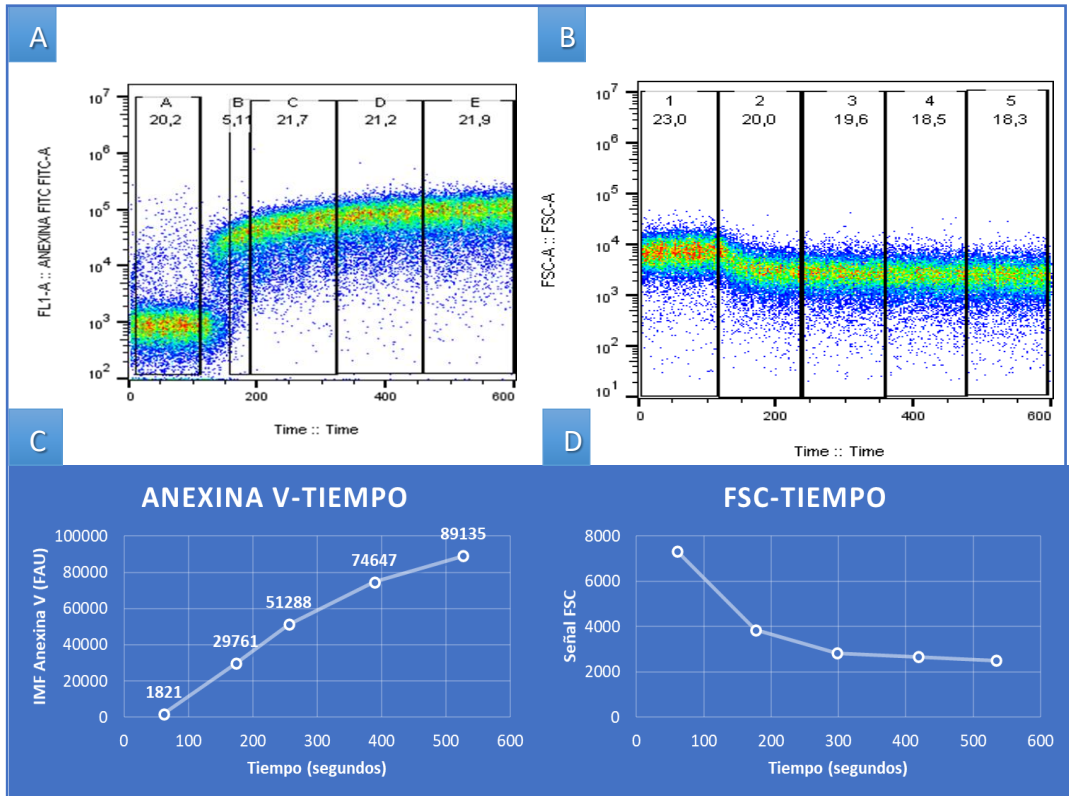


Figura 52. (A) Regiones A a E en el dot plot que enfrenta fluorescencia de la Anexina V/tiempo en Flowjo. (B) Regiones 1 a 5 en el dot plot que enfrenta FSC/tiempo en Flowjo. (C) Representación gráfica y pendiente de los valores de intensidad media de fluorescencia y de tiempo medio en cada región.(D) Representación gráfica y pendiente de los valores de señal FSC y de tiempo medio en cada región.

- Ratio o cociente entre la intensidad media de fluorescencia de Anexina V en el pico y en el punto basal. Este parámetro nos informa de las veces que la exposición de PS se incrementa en el punto máximo tras la estimulación con A23187 con respecto a la exposición en las plaquetas de la muestra no estimulada.
- Delta o diferencial entre la intensidad media de fluorescencia de Anexina V en el pico y en el punto basal. Este parámetro nos informa de la diferencia entre la exposición de PS entre las plaquetas de la muestra estimulada y las de la muestra sin estimular empleando como medida la IMF de la Anexina V (FAU).

- Tiempo desde la adición del A23187 hasta el pico de fluorescencia de Anexina V (segundos). Este parámetro mide el tiempo de respuesta de las plaquetas tras la adición del ionóforo de calcio.
- Ratio o cociente entre la intensidad media fluorescencia de Anexina V en el punto final y en el punto basal. Este parámetro muestra las veces que aumenta la exposición de PS tras la activación plaquetaria y formación de MPPs a los 10 minutos de adquisición con respecto a la exposición de PS en la muestra sin estimular.
- Delta o diferencial entre la intensidad media de fluorescencia de Anexina V en el punto final y en el punto basal. Este parámetro indica la diferencia entre la exposición PS tras la activación plaquetaria y formación de MPPs a los 10 minutos de adquisición y la exposición de PS en la muestra no estimulada.
- Pendiente de la fluorescencia de Anexina V desde su pico hasta el punto final. Este parámetro mide la velocidad de exposición de PS en las plaquetas tras ser estimuladas con el A23187.

## 5.2 Detección de los niveles de plaquetas reticuladas.

Las plaquetas reticuladas son plaquetas inmaduras que contienen ARN. Si bien en mamíferos marinos es posible distinguir la presencia de plaquetas inmaduras en un contador hematológico morfológicamente en base a su tamaño, la tinción de ARN por citometría de flujo no se ha llevado a cabo en estas especies anteriormente. La medida simultánea de ambos parámetros puede mejorar el diagnóstico de enfermedades incipientes y la monitorización de animales en recuperación.

Para ello, se adaptó por primera vez en estas especies un protocolo empleado en medicina humana (Hedley et al., 2015). Empleamos el naranja de tiazol (TO) del Kit BD Retic-Count™ de Becton Dickinson, que fue diseñado para detectar reticulocitos, pero resultó igualmente útil para detectar plaquetas reticuladas en mamíferos marinos.

Se prepararon dos tubos (control negativo y tubo positivo) y en cada uno se añadieron 5 µl de sangre entera citratada del animal, 2 µl del anticuerpo anti-human CD41-PE (clon P2) y 100 µl de PBS. Los tubos se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 15 minutos. Tras el marcaje con el anticuerpo, se añadió 1 ml de PBS al control

negativo y 1 ml de TO a una concentración de 0,002 µg/ml al tubo positivo. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos, tras lo cual se añadieron 250 µl de paraformaldehído (PFA) al 1% para fijar las células. Posteriormente, se diluyeron las muestras fijadas en PBS en una proporción 1:4. Las muestras se conservaron a 4°C y se analizaron en el citómetro de flujo 24 horas más tarde.

El citómetro de flujo se configuró para medir las señales FSC, SSC, la fluorescencia del TO (exc 488 nm/em 525 nm) y la fluorescencia del CD41-PE (exc 561nm/em 585 nm). Todas las señales se adquirieron en amplificación logarítmica.

En primer lugar, se seleccionaron las plaquetas como los eventos positivos a la fluorescencia del CD41-PE y menor señal de FSC. En base a estas señales se pudieron diferenciar también los restos celulares, los glóbulos rojos y las posibles coincidencias con eritrocitos que pudieran quedar tras eliminar los agregados (Figura 53 A). Posteriormente, se descartaron los agregados de plaquetas empleando las señales de pico y área del FSC (Figura 53 B). Tras seleccionar las plaquetas individuales, se determinó el porcentaje de plaquetas que contienen ARN empleando la fluorescencia del TO. En el tubo negativo no se aprecian eventos positivos a la tinción de TO (Figura 53 C y E). En el tubo positivo, se observa un pequeño porcentaje de plaquetas inmaduras en animales sanos (Figura 53 D), que se eleva en animales con trombocitopenia. En este caso mostramos la imagen de un animal recuperándose de una hemorragia crónica (Figura 53 F).

El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa CytExpert, determinando el porcentaje de plaquetas reticuladas en cada individuo comparando el tubo positivo con el control negativo.

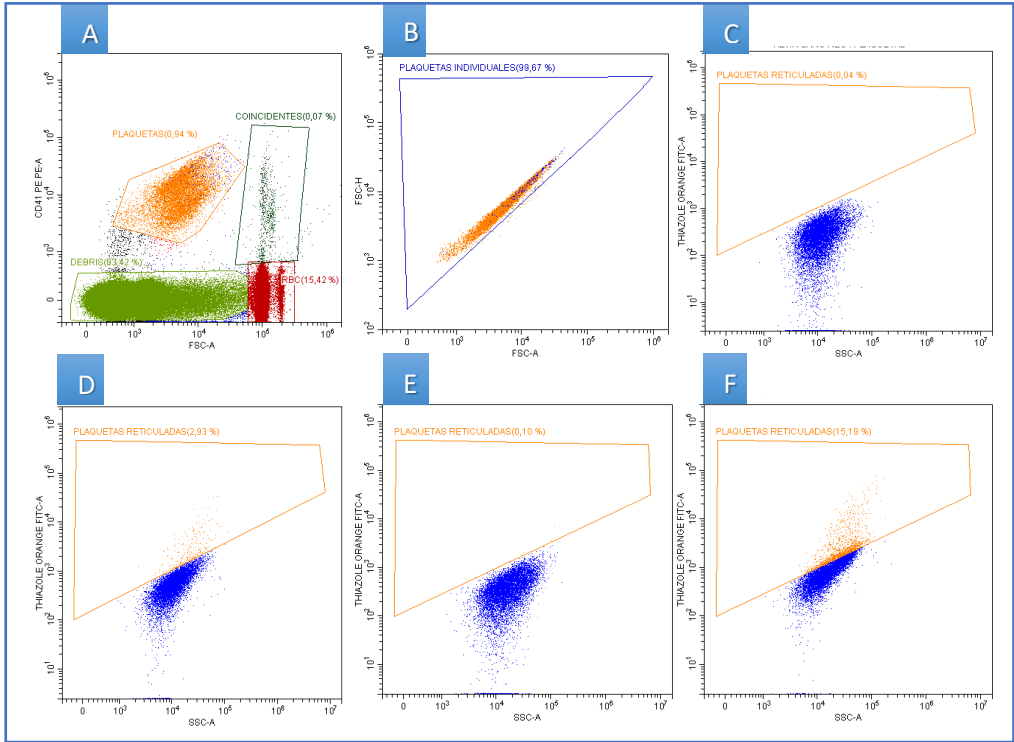


Figura 53. (A) Identificación de las plaquetas en base a su unión al anticuerpo frente a CD41 y a su tamaño relativo. También se diferencian debrís, otras células sanguíneas de mayor tamaño, principalmente eritrocitos y uniones entre células y plaquetas. (B) Descarte de los agregados enfrentando FSC-A y FSC-H. (C) Control negativo en un león marino sano, sin teñir con naranja de tiazol (NT). (D) Tubo positivo del animal sano, en el que se observa casi un 3% de las plaquetas con contenido de ARN (plaquetas inmaduras). (E) Control negativo en un león marino con hemorragia intestinal leve (F) Tubo positivo del animal enfermo, en el que se observa un 15% de plaquetas reticuladas, mostrando 5 veces más plaquetas inmaduras que el animal sano.



### 5.3 Establecimiento de un rango de valores de referencia para cada parámetro de función plaquetaria en animales sanos de cada especie.

Hemos establecido un rango de valores de referencia en animales sanos de cada una de las especies para cada uno de los parámetros de función plaquetaria, como se describe a continuación.

Para cada uno de los parámetros extraídos en el estudio de la movilización de calcio intraplaquetario, expresión de PS y liberación de micropartículas se calculó la mediana de los resultados de los diferentes días en cada animal, descartando los resultados obtenidos los días en que los animales presentaron algún problema de salud. Tomando las medianas de cada animal se calculó la media y error estándar para cada especie estudiada, obteniendo así un rango de valores de referencia ( $\text{media} \pm \text{SEM}$ ). Por otro lado, el porcentaje de plaquetas reticuladas se determinó en animales sanos y en dos animales enfermos (un delfín con gastritis ulcerativa y un león marino con hemorragia leve crónica). Con estos datos se observaron las diferencias entre individuos sanos y enfermos como un estudio piloto del uso de esta técnica como herramienta diagnóstica en estas especies. Posteriormente, a partir de los valores de referencia extraídos de animales sanos, se pudieron evaluar alteraciones en dichos parámetros cuando los animales enfermaron, revelándose como una metodología útil en la detección precoz y el seguimiento de ciertas patologías relacionadas con la hemostasia en estas especies. Como en el resto de estudios, los valores más consistentes se obtuvieron en delfines, dado el mayor tamaño muestral.

## 6. Evaluación de las alteraciones inducidas por contaminantes ambientales en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de mamíferos marinos.

### 6.1 Procesamiento de las muestras para la detección de contaminantes.

Para detectar la presencia de los contaminantes en los tejidos y muestras sanguíneas y plasmáticas de los animales se emplearon las muestras de animales salvajes varados muertos en la Comunidad Valenciana (tejidos) y de animales salvajes vivos de la Bahía de Sarasota (sangre entera y plasma). Su obtención se detalla en el apartado de “toma de muestras”.

La detección de los contaminantes en las diferentes matrices se llevó mediante una colaboración con el Área de Toxicología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Murcia, dirigido por el profesor Antonio J. García Fernández, cuyo equipo realizó el procesamiento de las muestras.

#### 6.1.1 *Procesamiento de las muestras de sangre periférica, plasma sanguíneo y tejidos.*

Para los análisis de elementos en sangre (excepto mercurio), 0.2 ml de muestra eran introducidos en un tubo de teflón (PTFE) de 40 ml y sometidos a digestión con un sistema de microondas UltraWave de Milestone, Inc. (Estados Unidos), operando a un máximo de 1500 W. Se analizaron los siguientes elementos: Cd, Pb, As, Cu, Zn, Cr, Na, Mg, P, K, Ca, Fe, Al, Ti, Sr, Ba, Mn, Co, V, Mo, Tl, U, Be y Ni. Tras el proceso de digestión, la detección y la cuantificación se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) usando el modelo 7900 de Agilent (Agilent Technologies, Tokio, Japón), equipado con un sistema de integrado de introducción de muestra (ISIS) configurado para muestreo discreto y con el sistema Ultra High Matrix Introduction (UHMI) configurado en modo robusto. El Octopole Reaction System (ORS4) trabajó con He para reducir interferencias poliatómicas.

Para el análisis de mercurio (Hg) se utilizaron 0.05 ml de muestra de sangre que se depositaron en una navecilla de níquel que fueron introducidas en el analizador directo de mercurio (DMA80, Milestone, USA) para su análisis por espectrofotometría de absorción atómica.

Los límites de detección y de cuantificación para cada compuesto fueron los siguientes (dados en ppb): Be (1,71-5,69), Na (0,01-0,03), Mg (0,01-0,02), Al (7,18-23,92), P (15,94-53,12), K (0,01-0,04)

Ca (0,05-0,17),Ti (0,15-0,49),V (0,02-0,05),Cr (0,14-0,46), Mn (0,38-1,26),Fe (0,00-0,00),Co (0,08-0,28),Ni (0,65-2,18),Cu (0,15 -0,51),Zn (0,71-2,35),As (0,18-0,59),Sr (0,08-0,28),Mo (0,03-0,11),Cd (0,01-0,05), Tl (0,02-0,05), Pb (0,19 -0,63), U(0,00-0,01), Hg (0,1-0,2). Estos análisis se llevaron a cabo por parte de Departamento de Toxicología de la Universidad de Murcia a modo de colaboración.

La prueba de concepto realizada con los tejidos de delfín se llevó a cabo en colaboración con el Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. En este caso también se llevó a cabo la digestión de los tejidos y se midieron los siguientes compuestos: ibuprofeno, keftoprofeno, cafeína y aspirina. En el caso del paracetamol se produjeron problemas con los estándares que impidieron su correcta medición. La técnica empleada fue la espectrometría de masas LC-MS/MS (triple-cuadrupol), empleando el software MassLynx para su análisis. Los estándares se prepararon para todos los compuestos a las siguientes concentraciones: 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM y 10 µM.

### **6.1.2 Tratamiento *in vitro* de sangre periférica con tóxicos.**

Para los estudios *in vitro* se emplearon placas de 96 pocillos, donde se expusieron la sangre o las células aisladas de los animales a diferentes concentraciones de cada contaminante bajo estudio durante 24 horas en todos los casos excepto en el protocolo para la evaluación de la proliferación de linfocitos (72 h). Tras la incubación, la función y viabilidad de las células inmunitarias y de las plaquetas se evaluó en las muestras control y en las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de compuesto. Por otro lado, también se estudió la respuesta aguda a ciertos contaminantes exponiendo la sangre al compuesto y midiendo los efectos inmediatos de éste.

Basándonos en los resultados obtenidos en las pruebas de detección de xenobióticos en tejidos, sangre y plasma de los delfines salvajes, seleccionamos los siguientes contaminantes para la realización de los estudios de inmunotoxicología y toxicología en plaquetas *in vitro*:

- Fármacos o xenobióticos:
  - Ibuprofeno
  - Cafeína
  - Paracetamol
  - Aspirina

Las concentraciones de los contaminantes empleadas en el estudio se seleccionaron en base a los resultados obtenidos en las pruebas de detección en diferentes matrices.

Las dosis utilizadas en los ensayos fueron:

1. Ibuprofeno : 3,2 mM, 1,6 mM, 800  $\mu$ M, 400  $\mu$ M y 200  $\mu$ M para los ensayos de viabilidad, función mitocondrial, fagocitosis, estado redox y activación plaquetaria. Para los ensayos de proliferación de linfocitos se emplearon las dosis de 3,2 mM y 200  $\mu$ M y para el ensayo de producción de citoquinas se empleó únicamente la dosis más alta.
2. Cafeína: 1,5 mM, 150  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M, 0,15  $\mu$ M y 0,015  $\mu$ M para los ensayos de viabilidad, función mitocondrial, fagocitosis, estado redox y activación plaquetaria. Para los ensayos de proliferación de linfocitos se emplearon las dosis de 1,5 mM y 0,015  $\mu$ M y para el ensayo de producción de citoquinas se empleó únicamente la dosis más alta.
3. Paracetamol: 0,01 $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M y 1 mM para los ensayos de viabilidad, función mitocondrial, fagocitosis, estado redox y activación plaquetaria. Para los ensayos de proliferación de linfocitos se emplearon las dosis de 1 mM y 0,01  $\mu$ M y para el ensayo de producción de citoquinas se empleó únicamente la dosis más alta.
4. Aspirina: 0,02 $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 20  $\mu$ M y 200  $\mu$ M para los ensayos de viabilidad, función mitocondrial, fagocitosis, estado redox y activación plaquetaria. Para los ensayos de proliferación de linfocitos se emplearon las dosis de 200  $\mu$ M y 0,02  $\mu$ M y para el ensayo de producción de citoquinas se empleó únicamente la dosis más alta.

En el caso del ibuprofeno, soluble en DMSO, las soluciones stock se prepararon en DMSO a una concentración 250 veces superior a las que se emplearon en el ensayo y se mantuvieron durante todo el estudio a -20°C. Para cada experimento, estos stocks se diluyeron en medio RPMI modificado para linfocitos a una proporción 1:125, obteniendo así los compuestos al doble de la concentración final requerida (2X) por pocillo. En cada pocillo se mezclaron 50  $\mu$ l de sangre entera (heparinizada o citratada según el tipo de estudio), 50  $\mu$ l de medio RPMI modificado para linfocitos y 100  $\mu$ l de la preparación de compuesto 2X. De este modo, al

diluirse 1:1 con la sangre y el medio, se alcanzó en cada pocillo la concentración final deseada. De esta forma todos los pocillos contenían la misma cantidad de DMSO, nunca superior a 1  $\mu$ l/200  $\mu$ l. A los pocillos control se les añadió la cantidad equivalente de DMSO

En el caso de compuestos solubles en agua (cafeína y paracetamol) cada día se preparó una solución stock en H<sub>2</sub>O destilada estéril, a partir de la cual se obtuvieron las diluciones 2X en medio modificado para linfocitos. En cada pocillo se mezclaron 50  $\mu$ l de sangre entera (heparinizada o citratada según el tipo de estudio), 50  $\mu$ l de medio RPMI modificado para linfocitos y 100  $\mu$ l de la preparación de compuesto 2X.

Los stocks de aspirina se prepararon cada día solubilizándola en etanol a concentraciones 200 veces superiores a las empleadas en el ensayo. Estos stocks se diluyeron en medio RPMI hasta la concentración final deseada para evitar una concentración de etanol superior a 1 $\mu$ l/200 $\mu$ l en cada pocillo. En cada pocillo se mezclaron 50  $\mu$ l de sangre entera (heparinizada o citratada según el tipo de estudio), 50  $\mu$ l de medio RPMI modificado para linfocitos y 100  $\mu$ l de la preparación de compuesto 2X.

Las muestras se incubaron en un incubador durante 24h-72h, dependiendo del experimento. Todos los ensayos, excepto el que se empleó para detectar la producción de citoquinas, se realizaron tomando toda la muestra de cada pocillo tras la incubación. Para observar la producción de citoquinas, en cambio, se empleó únicamente el plasma, que tras la incubación quedó en la fase superior de la muestra.

## 7. Evaluación de las alteraciones inducidas por estrés crónico en la funcionalidad inmunitaria de mamíferos marinos.

Para determinar qué animales presentaban características comportamentales compatibles con el padecimiento de estrés crónico, colaboramos con el Dr. Xavier Manteca Vilanova, experto en etología animal del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona y responsable de Bienestar Animal en múltiples núcleos zoológicos, entre ellos, el Oceanogràfic. En colaboración desarrollamos un formulario para determinar qué animales podían sufrir estrés crónico en base a su conducta según una estructura de 5 grandes factores, basándonos en un método previamente descrito (Highfill y Kuczaj, 2007; Goldberg, 1990). Los cinco grandes factores a evaluar fueron: apertura a experiencias (referente a si el animal es curioso o rutinario), diligencia (referente a su estado mental: en alerta, desconfiado, precavido, perezoso), extroversión (referente a si se trata de un animal tranquilo o activo), cooperatividad (referente a su obediencia, sociabilidad y flexibilidad en el grupo) y neuroticismo (referente a si se trata de un animal temperamental, agresivo o por el contrario, es relajado y pacífico). Para cada factor se evaluaron diferentes patrones de comportamiento, indicando en cada caso el grado en que presentaba dicha característica. La escala de evaluación de cada adjetivo fue de 0 (no presenta ese comportamiento) a 6 (presenta de forma exagerada ese comportamiento) (Tabla 8).

| GRADO 0                        | GRADO 1                                   | GRADO 2                               | GRADO 3                                | GRADO 4                               | GRADO 5                                   | GRADO 6                             |
|--------------------------------|---|---------------------------------------|--|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| <b>No presenta el comport.</b> | Presenta en un grado muy bajo el comport. | Presenta en un grado bajo el comport. | Presenta en un grado medio el comport. | Presenta en un grado alto el comport. | Presenta en un grado muy alto el comport. | Presenta exageradamente el comport. |

Tabla 9. Grados de presentación del patrón comportamental (comportamiento=comport.).

Para cada delfín de la población del Oceanogràfic, el formulario fue cumplimentado por dos evaluadores. Estos se correspondieron con los dos entrenadores principales de cada animal, con quien más vínculo afectivo poseían y por tanto, quienes más los conocían.

Cada uno de los adjetivos que se evaluaron dentro de cada factor se explicó detalladamente para facilitar el entendimiento por parte del evaluador y reducir la variabilidad en los resultados. De esta forma, las calificaciones obtenidas por parte de diferentes evaluadores para un mismo animal pudieron ser comparadas entre sí. Cada evaluador pudo, si lo

consideró necesario, añadió aclaraciones o amplió información sobre la evaluación de uno o varios de los adjetivos que se calificaron en el formulario.

Con dos formularios cumplimentados por cada uno de los quince delfines albergados en el acuario, seleccionamos, con la aprobación del experto en etología, los animales más predispuestos y menos a padecer estrés crónico.

## **8. Evaluación de las alteraciones inducidas por patologías en la funcionalidad inmunitaria o plaquetaria de mamíferos marinos.**

Como se ha detallado en la introducción, numerosas patologías pueden estar relacionadas con alteraciones en la funcionalidad inmunitaria, ya sea deprimiéndola o exacerbándola. Lo mismo ocurre en el caso de la funcionalidad plaquetaria. Estas enfermedades pueden ser de tipo infeccioso o consecuencia de peleas con otros animales, y en el caso de los animales salvajes también pueden estar derivadas de la pesca accidental.

A lo largo del proyecto de tesis, algunos animales del Oceanogràfic sufrieron procesos patológicos, ya sea de tipo infeccioso o por otras causas. En cada uno de estos animales estudiamos la función fagocítica, estado redox, potencial de membrana mitocondrial de los leucocitos y función plaquetaria en el momento de la enfermedad para evaluar la existencia de alteraciones a nivel inmunitario o hemostático en comparación con los valores de referencia.

## **9. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa Graphpad Prism 5, empleando los tests estadísticos ANOVA y T de Student (t-test). Se compararon los resultados obtenidos entre especies, y dentro de una misma especie entre sexos y edades. También se evaluó si existían diferencias en los valores de inmunidad y función plaquetaria entre los animales enfermos y sanos, entre los animales salvajes y bajo cuidado humano y entre las muestras expuestas a contaminantes y las muestras control.







Resultados y  
Discusión





## 1. Evaluación de la funcionalidad inmunitaria en animales sanos.

Como hemos detallado en el apartado de Material y Métodos, estudiamos la capacidad fagocítica, el estado redox basal y la bioenergética de los leucocitos de delfines, belugas, morsas, leones marinos y focas sanas.

Si bien en estas especies existen valores de referencia para el recuento celular en la analítica sanguínea, no es así para la función de las células. Los estudios de funcionalidad inmunitaria que se han llevado a cabo en mamíferos marinos previamente se han realizado en relación a la puesta a punto de las técnicas (Keogh et al., 2011; Noda et al., 2003) o al estudio de sus alteraciones inducidas por contaminantes ambientales (Desforges J.P, et al 2017; Peñín et al., 2018; Cámara-Pellissó et al., 2008; Frouin et al., 2008; Li et al., 2018...) o por situaciones estresantes ,como el transporte o el cambio de hábitat (Sokolova, 2004; Noda et al., 2006).

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada parámetro en las diferentes especies bajo estudio.

### 1.1 Capacidad fagocítica fisiológica en animales sanos.

#### *1.1.1 Puesta a punto de nuevos protocolos para la evaluación de la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos en mamíferos marinos.*

La adaptación de los Kits IngoFlowEx® y FagoFlowEx® a mamíferos marinos se considera un resultado en sí mismo, pudiéndose emplear en futuros estudios o como herramienta diagnóstica en la clínica veterinaria diaria de zoos y acuarios.

Los kits pasan controles de calidad exhaustivos antes de comercializarse a hospitales o centros de investigación, por lo que su uso supone una ventaja en la estandarización de los resultados entre estudios o individuos, e incluso entre muestras de un mismo individuo a diferentes tiempos. Además, los protocolos empleados en esta tesis son más sencillos que los empleados en estudios previos, en los que realizaban más pasos o preparaciones.

Por otro lado, se ha utilizado como estímulo la *E.coli* fluorescente proporcionada por el fabricante, con lo que se evita teñir el microorganismo manualmente como en otros estudios (Reif et al., 2009; Keogh et al., 2011; Li et al., 2018) o emplear opciones menos fieles biológicamente como el uso de microesferas de látex fluorescentes (De Guise et al., 1995;

Levin et al., 2005; Cámara-Pellissó et al., 2008; Fouin et al., 2008; Desforges et al., 2017). La bacteria *E.coli ssp.* es un buen modelo para estudios clínicos de fagocitosis *in vitro* ya que es capaz de infectar tanto a los mamíferos terrestres como a los marinos (Schaefer et al., 2011; Van Elk, et al., 2007; Fulham et al., 2018; Oppenheimer y Kelly, 1952) pudiendo incluso producirles la muerte (Gulland et al., 1996; Lockwood et al., 2006; Wilkinson et al., 2006).

### 1.1.2 Valores fisiológicos de capacidad fagocítica en animales sanos.

#### 1.1.2.1 Delfines mulares (*Tursiops truncatus*)

Se evaluó la capacidad fagocítica de los monocitos y granulocitos de delfines bajo cuidado humano (del Oceanogràfic de Valencia) y de delfines salvajes (de la Bahía de Sarasota), todos ellos en buen estado de salud. También se estudió si existían diferencias en dichos valores por sexo, edad o hábitat.

- *Delfines bajo cuidado humano:*

Se analizaron un total de 60 muestras procedentes de 15 delfines del Oceanogràfic. Los resultados obtenidos para la capacidad de ingestión del patógeno y de producción del estallido respiratorio en la población y subpoblaciones, así como los valores mínimos y máximos para cada parámetro se detallan en la Tabla 10. No se observaron diferencias por sexo o edad.

| Grupos  | % de células fagocíticas que ingirieron la <i>E.coli</i> (media±SEM) | % de células fagocíticas que produjeron el <i>burst</i> oxidativo (media±SEM) |
|---|--|---|
| Delfines bajo cuidado humano n=15                         | 59,6±1,27 (min:53; max:69)   | 34,2±3,6 (min:9; max:48,6)  |
| Adultos bajo cuidado humano n=12                          | 59,1±1,3   | 32±3,8  |
| Crías bajo cuidado humano n=3                             | 61,9±3,5   | 48,3±0,3  |
| Adultos bajo cuidado humano VS Crías bajo cuidado humano  | NDS  | NDS   |
| Machos bajo cuidado humano n=5                            | 60,3±2,7   | 42,4±2,15   |
| Hembras bajo cuidado humano n=10                          | 59,3±1,5   | 31±4,7  |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS  | NDS   |

Tabla 10. Rango de porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir y destruir al patógeno correctamente tras una hora de incubación en delfines bajo cuidado humano sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

- *Delfines salvajes:*

Se estudiaron muestras de 15 delfines salvajes de la Bahía de Sarasota (Florida, EEUU), en concreto, una muestra por animal. Los resultados obtenidos de capacidad fagocítica en esta población se detallan en la Tabla 11. No se observaron diferencias estadísticamente significativas por sexo o edad.

Si bien la capacidad de ingestión del patógeno fue similar en ambos grupos, los delfines bajo cuidado humano presentaron un porcentaje de células fagocíticas capaces de producir el estallido respiratorio significativamente superior a los delfines salvajes ( $p=0,034$ ) (Figura 54).

| Grupos                              | % de células fagocíticas que ingirieron la <i>E.coli</i> (media±SEM) | % de células fagocíticas que produjeron el <i>burst</i> oxidativo (media±SEM) |
|-------------------------------------|--|---|
| Delfines salvajes n=15              | 58,7±1,5 (min:47,6; max:69,1)  | 24,5±1,9 (min:14,3; max:36,8)   |
| Adultos salvajes n=10               | 58,6±1,2   | 26±2  |
| Crías salvajes n=5                  | 58,8±4   | 21,6±4,5  |
| Adultos salvajes VS Crías salvajes  | NDS  | NDS   |
| Machos salvajes n=7                 | 59,6±2,15  | 27±1,8  |
| Hembras salvajes n=8                | 57,9±2,1   | 21,8±3,2  |
| Machos salvajes VS Hembras salvajes | NDS  | NDS   |

Tabla 11. Rango de porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir y destruir al patógeno correctamente tras una hora de incubación en delfines salvajes sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

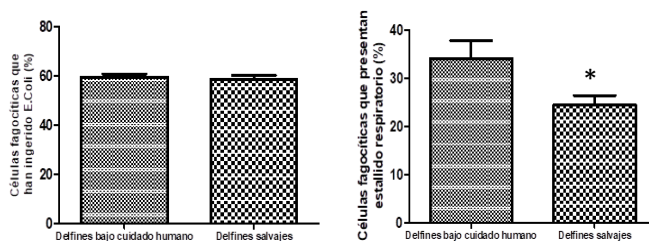


Figura 54. Comparación estadística entre la capacidad fagocítica (ingestión y producción del *burst* oxidativo por parte de las células fagocíticas) de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes ( $p=0,034^*$ ).

Esta diferencia puede deberse a múltiples factores. Por un lado, a la mayor exposición de los animales de vida libre a determinados contaminantes, como por ejemplo el mercurio, que es capaz de producir este efecto en seres humanos (Perlingeiro y Queiroz, 1995). De hecho, como se detallará más adelante, hallamos concentraciones más altas de este metal pesado en la sangre de los delfines salvajes que en la de los delfines bajo cuidado humano. Otra posible causa es el estrés de los animales salvajes en el momento del muestreo, pudiendo desencadenarse una liberación excesiva de adrenalina. Esto puede desembocar en alteraciones a nivel inmunitario. Las diferencias en el modo de vida, dieta y ambiente no deben pasarse por alto.

### **1.1.2.2 Belugas (*Delphinapterus leucas*)**

Se analizaron 19 muestras de tres animales de diferentes sexos y edades. Los resultados obtenidos se detallan a continuación (Tabla 12):

| Grupos                                   | % de células fagocíticas que ingirieron la <i>E.coli</i> | % de células fagocíticas que produjeron el <i>burst</i> oxidativo |
|--|--|---|
| <b>Belugas bajo cuidado humano n=3</b>   | <b>61,7±1,4 (min:52; max:74)</b>                         | <b>26,3±3,7 (min:5,8; max:57,2)</b>                               |
| <b>Belugas adultas n=2</b>               | 63,3±1,8   | 29,7±4,4  |
| <b>Cría de beluga n=1</b>                | 58±0,9   | 18,6±6,2  |
| <b>Belugas adultas VS Cría de beluga</b> | NDS  | NDS   |
| <b>Belugas macho n=2</b>                 | 58,7±0,75  | 22,6±4,5  |
| <b>Beluga hembra n=1</b>                 | 65±2,4   | 32±6,3  |
| <b>Belugas macho VS Beluga hembra</b>    | p=0,0175*  | NDS   |

Tabla 12. Rango de porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir y destruir al patógeno correctamente tras una hora de incubación en belugas sanas (p=0,015\*; NDS: p≥0,05).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la capacidad fagocítica en crías y adultos, sin embargo, la hembra presentó un porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir la *E.coli* significativamente mayor al de los machos (Tabla 12). Dado que solo dispusimos de muestras de una hembra, este hallazgo podría deberse simplemente a características intrínsecas del individuo, y no a su sexo. Para corroborar si el efecto es dependiente del género se requiere aumentar el tamaño poblacional.

### **1.1.2.3 Morsas (*Odobenus rosmarus*)**

Se analizaron 18 muestras de las tres morsas que albergaba el Oceanogràfic de Valencia. Puesto que las tres eran hembras de la misma edad, las diferencias por sexo o edad no se evaluaron. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre animales. A continuación, detallamos los valores fisiológicos de capacidad fagocítica observados en morsas sanas bajo cuidado humano (Tabla 13).

| Grupos                              | % de células fagocíticas que ingirieron la <i>E.coli</i> | % de células fagocíticas que produjeron el <i>burst</i> oxidativo |
|-------------------------------------|--|---|
| <b>Morsas bajo cuidado humano=3</b> | <b>62,6±2,17 (min:50; max:79)</b>                        | <b>36,3±4,3 (min:13; max:64)</b>                                  |

Tabla 13. Rango de porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir y destruir al patógeno correctamente tras una hora de incubación en morsas sanas.

### **1.1.2.4 Leones marinos (*Otaria flavescens*)**

Dada la mayor dificultad en la obtención de muestras en leones marinos, para esta parte del proyecto únicamente pudimos contar con muestras de cuatro animales adultos sanos (2 machos y dos hembras). Si bien el tamaño muestral es insuficiente para obtener valores fisiológicos de la población, a continuación, mostramos los datos obtenidos en el grupo, los cuales pueden ser orientativos de la especie (Tabla 14). Sería necesario ampliar el tamaño muestral en futuros estudios. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos.

| Grupos   | % de células fagocíticas que ingirieron la <i>E.coli</i> | % de células fagocíticas que produjeron el <i>burst</i> oxidativo |
|--|--|---|
| <b>Leones marinos bajo cuidado humano n=4</b>          | <b>57,5±4,3 (min:51; max:70)</b>                         | <b>40,8±10,2 (min:21; max:68)</b>                                 |
| <b>Leones marinos machos n=2</b>                       | 54,6±2,5   | 32,15±11,25   |
| <b>Leones marinos hembras n=2</b>                      | 60,5±9,5   | 49,5±18,5   |
| <b>Leones marinos machos VS Leones marinos hembras</b> | NDS  | NDS   |

Tabla 14. Rango de porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir y destruir al patógeno correctamente tras una hora de incubación en leones marinos sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

#### **1.1.2.5 Foca (*Phoca vitulina*)**

No se obtuvieron suficientes muestras de focas para realizar una estimación de los valores fisiológicos de capacidad fagocítica en la especie. No obstante, se adaptó el protocolo para posibilitar su utilización en futuros estudios.

#### ***1.1.3 Diferencias en la capacidad fagocítica de mamíferos marinos de diferentes especies.***

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre especies en la capacidad de los monocitos y granulocitos para ingerir o destruir al patógeno.

### **1.2 Estado redox fisiológico de los leucocitos en animales sanos.**

#### ***1.2.1 Puesta a punto del protocolo para la evaluación del estado redox leucocitario en mamíferos marinos.***

A pesar de que el estrés oxidativo había sido previamente evaluado en fibroblastos de delfines (Yu et.al.,2019), el estudio del estado redox basal de los leucocitos en mamíferos marinos es novedoso. En concreto, hemos evaluado el estado redox de los monocitos y granulocitos de los animales, empleando la hidroetidina como indicador de los niveles de anión superóxido.

#### ***1.2.2 Estado redox fisiológico en monocitos y granulocitos de animales sanos.***

##### **1.2.2.1 Delfines mulares (*Tursiops truncatus*)**

Para establecer el porcentaje de monocitos y granulocitos en reposo produciendo especies reactivas de oxígeno se analizaron un total de 40 muestras procedentes de 13 delfines del Oceanogràfic de Valencia. En la Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos en la población global, así como el desglose por sexo y edad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos de diferente sexo o edad.



| Grupos  | %células fagocíticas en reposo produciendo ROS |
|---|--|
| Delfines bajo cuidado humano n=13                         | 3,8±0,3 (min:1,7; max:5,95)                    |
| Adultos bajo cuidado humano n=10                          | 3,9±0,3  |
| Crías bajo cuidado humano n=3                             | 3,15±0,75                                      |
| Adultos bajo cuidado humano VS Crías bajo cuidado humano  | NDS  |
| Machos bajo cuidado humano n=5                            | 4,16±0,7                                       |
| Hembras bajo cuidado humano n=8                           | 3,6±0,3  |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS  |

Tabla 15. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en delfines bajo cuidado humano sanos. (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

#### **1.2.2.2 Belugas (*Delphinapterus leucas*)**

Se estudiaron 12 muestras de 3 belugas sanas, de forma equitativa entre individuos. En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos en la población global y su desglose por sexo y edad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos de diferente sexo o edad.

| Grupos  | %células fagocíticas en reposo produciendo ROS |
|---|--|
| Belugas bajo cuidado humano n=3                           | 4,6±0,7 (min:1; max:9)                         |
| Adultos bajo cuidado humano n=2                           | 5±0,88   |
| Crías bajo cuidado humano n=1                             | 3,2±0,005                                      |
| Adultos bajo cuidado humano VS Crías bajo cuidado humano  | NDS  |
| Machos bajo cuidado humano n=2                            | 4,78±0,11                                      |
| Hembras bajo cuidado humano n=1                           | 4,56±1,1                                       |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS  |

Tabla 16. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en belugas bajo cuidado humano sanas (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### **1.2.2.3 Morsas (*Odobenus rosmarus*)**

Se analizaron 15 muestras de los tres animales (5 de cada morsa). La media $\pm$ SEM, mínimo y máximo obtenidos para este parámetro en morsas se detallan en la Tabla 17.

| Grupos                         | %células fagocíticas en reposo produciendo ROS |
|--------------------------------|--|
| Morsas bajo cuidado humano n=3 | 11,44 $\pm$ 1,5 (min:4; max:24)                |

Tabla 17. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en morsas sanas bajo cuidado humano.

### **1.2.2.4 Leones marinos (*Otaria flavescens*)**

En este estudio se incluyeron cuatro leones marinos adultos. Los resultados obtenidos de estado redox leucocitario en leones marinos sanos se detallan en la Tabla 18. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos de diferente sexo.

| Grupos  | %células fagocíticas en reposo produciendo ROS |
|---|--|
| Leones marinos bajo cuidado humano n=4                    | 7,88 $\pm$ 1,77 (min:4; max:14)                |
| Machos bajo cuidado humano n=2                            | 7,1 $\pm$ 1,1                                  |
| Hembras bajo cuidado humano n=2                           | 9 $\pm$ 5                                      |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS  |

Tabla 18. Rango de porcentaje de células fagocíticas en reposo que producen superóxido en leones marinos sanos bajo cuidado humano (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### **1.2.3 Diferencias en el estado redox leucocitario entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.**

Los pinnípedos mostraron un mayor porcentaje de células produciendo ROS de forma fisiológica que los cetáceos, en especial las morsas, cuyos valores basales son significativamente superiores al de los delfines y las belugas. Los leones marinos, presentaron un estado redox y una producción de ROS significativamente superior al de los delfines (Figura 55).

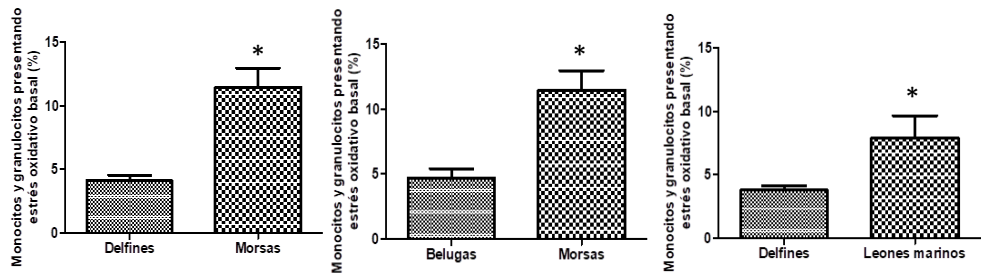


Figura 55. El estado redox basal de monocitos y granulocitos en morsas fue significativamente superior que en delfines ( $p < 0,0001^{***}$ ) y belugas ( $p = 0,0015^{**}$ ). El estado redox basal de las células de los leones marinos fue significativamente mayor al de los delfines ( $p = 0,0033^{**}$ ).

### 1.3 Potencial de membrana mitocondrial de los leucocitos en animales sanos.

#### 1.3.1 Puesta a punto de un nuevo protocolo para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (PMM) en mamíferos marinos.

La puesta a punto del protocolo en delfines, belugas, morsas, leones marinos y focas se considera un resultado en sí mismo, pudiendo ser útil en futuros trabajos en mamíferos marinos.

Los estudios de la funcionalidad mitocondrial son relativamente novedosos en delfines, habiéndose evaluado antes únicamente en sus fibroblastos empleando el fluorocromo JC-1 como indicador del PMM (Yu et al., 2019). No hemos encontrado estudios anteriores sobre el potencial de membrana mitocondrial en leucocitos en estas especies.

#### 1.3.2 Valores fisiológicos de potencial de membrana mitocondrial leucocitario en animales sanos.

En este caso, únicamente se obtuvieron valores fisiológicos del PMM en delfines. Para ello, se estudiaron delfines bajo cuidado humano (del Oceanogràfic y de Mundomar), y delfines salvajes de la Bahía de Sarasota.

Como se ha detallado en el apartado de Material y Métodos, se midió la intensidad media de fluorescencia de TMRM como indicador directo del potencial de membrana mitocondrial. A continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada grupo de delfines.

En primer lugar, para poder considerar los animales procedentes de los dos acuarios como una única población (delfines bajo cuidado humano), comprobamos que no existían diferencias en el PMM de los leucocitos entre ambos grupos (Tabla 19). Posteriormente, calculamos la media de los resultados de la población y evaluamos si existían diferencias por sexo o edad. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19. Puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el PMM leucocitario de los delfines procedentes de diferentes acuarios, se pudieron considerar como una única población. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos de diferente sexo o edad.

| Grupos   | PMM (IMF TMRM-FAU)                     |
|--|--|
| <b>Delfines del Oceanogràfic n=5</b>                             | 3230±750                               |
| <b>Delfines de Mundomar n=5</b>                                  | 4992±284                               |
| <b>Delfines Oceanogràfic VS Delfines Mundomar</b>                | NDS                                    |
| <b>Delfines bajo cuidado humano n=10</b>                         | <b>4111±478,7 (min:2184; max:6177)</b> |
| <b>Adultos bajo cuidado humano n=9</b>                           | 3881±469,6                             |
| <b>Crías bajo cuidado humano n=1</b>                             | 6177                                   |
| <b>Adultos bajo cuidado humano VS Crías bajo cuidado humano</b>  | NDS                                    |
| <b>Machos bajo cuidado humano n=3</b>                            | 4757±1289                              |
| <b>Hembras bajo cuidado humano n=7</b>                           | 3834±459,4                             |
| <b>Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano</b> | NDS                                    |

Tabla 19. Rango fisiológico de IMF de TMRM como indicador del PMM leucocitario en la población (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

También evaluamos la bioenergética de las células inmunitarias de delfines salvajes para estudiar si existían diferencias con respecto a la de los delfines bajo cuidado humano producidas por las variaciones en el hábitat, dieta, actividad física, exposición a agentes estresantes o contaminantes. En la Tabla 20 detallamos los resultados obtenidos de PMM en

los delfines salvajes, así como su desglose por sexo y edad. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre individuos de diferente sexo o edad.

| Grupos                              | PMM (IMF TMRM-FAU)                 |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| Delfines salvajes n=16              | 90069±9238 (min:25942; max:149366) |
| Adultos salvajes n=11               | 95502±9730                         |
| Crías salvajes n=5                  | 78115±21249                        |
| Adultos salvajes VS Crías salvajes  | NDS                                |
| Machos salvajes n=7                 | 94120±8934                         |
| Hembras salvajes n=9                | 86918±15333                        |
| Machos salvajes VS Hembras salvajes | NDS                                |

Tabla 20. Rango fisiológico de IMF del TMRM como indicador del PMM leucocitario en delfines salvajes sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

Se observó que las mitocondrias de los leucocitos de los delfines salvajes presentaban un PMM más de 20 veces superior al de los delfines bajo cuidado humano (Figura 56).

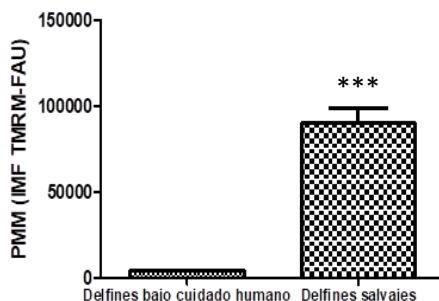


Figura 56. Los delfines salvajes presentaron un PMM leucocitario significativamente mayor al de los delfines en cautividad ( $p < 0,0001$ \*\*\*).

En ciertas situaciones, el estrés puede aumentar el potencial de membrana mitocondrial (Kikusato M y Toyomizu M, 2013). Además, al contrario que los animales en cautividad, los delfines salvajes están expuestos de forma continua a patógenos ambientales, por lo que es posible que sus leucocitos tengan un nivel basal de producción de energía mayor.

## **2. Evaluación de la funcionalidad plaquetaria en animales sanos.**

Como se ha mencionado en el apartado de Material y Métodos, la funcionalidad de las plaquetas se evaluó mediante el estudio de su capacidad para activarse correctamente tras su estimulación *in vitro* con agonistas específicos. Se evaluaron la movilización de calcio intraplaquetario tras la activación de las plaquetas con ADP y la expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas en respuesta al ionóforo de calcio A23187. Por otro lado, se ha determinado la concentración de plaquetas reticuladas en muestras de animales sanos.

### **2.1 Puesta a punto de nuevos protocolos para la evaluación de la funcionalidad plaquetaria en mamíferos marinos.**

Aunque existen estudios previos en relación a la activación plaquetaria en elefantes marinos y orcas (Field et al., 2012; Patterson et al., 1993), estos se han enfocado en otros aspectos del proceso, por lo que la metodología empleada por nuestro grupo supone una nueva aportación a este campo de estudio. Las técnicas utilizadas anteriormente para evaluar la activación plaquetaria en mamíferos marinos incluyen agregometría, análisis morfológico, microscopía electrónica, cromatografía para determinar la composición lipídica de la membrana plaquetaria o ensayos con radioisótopos para detectar la producción de tromboxano (Field et al., 2012; Field et al., 2001; Patterson et al., 1993). Estas técnicas requieren de la centrifugación y el lavado de las muestras e incluso, en ocasiones, de su fijación, por lo que pueden ser procedimientos muy invasivos capaces de alterar la estructura y función de las plaquetas. La metodología puesta a punto en esta tesis evita la realización de este tipo de manejos agresivos para las plaquetas. Empleamos sangre entera muy diluida con un buffer respetuoso con las plaquetas, sobre las cuales aplicamos tinciones fluorescentes que no alteran su funcionalidad para detectar el parámetro de interés. Además, el hallazgo de un anticuerpo capaz de marcar las plaquetas en mamíferos marinos por reactividad cruzada supone una nueva herramienta en los estudios de la hemostasia de estas especies.

#### **2.1.1 Estudio de la movilización del calcio intraplaquetario en mamíferos marinos.**

Como hemos mencionado en el apartado de Material y Métodos, hemos adaptado el protocolo puesto a punto en seres humanos por nuestro propio grupo en 1999 (Monteiro et al., 1999). Numerosos trabajos emplean metodologías similares para el estudio de la

movilización de calcio intraplaquetario en humanos, ya sea a punto final (Labiós et al., 2006; Pasalic et al., 2017; García-Martínez et al.,2004) o a modo de cinética (Yadav et al., 2019). Pero la puesta a punto de este protocolo en mamíferos marinos puede considerarse un resultado en sí mismo.

El sustrato fluorogénico Fluo-4-AM funcionó con éxito en mamíferos marinos como indicador de la concentración de calcio en la plaqueta, y las variaciones en su intensidad de fluorescencia en el tiempo tras estimular las plaquetas fueron similares a las observadas en seres humanos (Monteiro et al.,1999).

### ***2.1.2 Estudio de la expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas en mamíferos marinos.***

La puesta a punto del protocolo en estas especies es ya de por sí un resultado más de esta tesis. La Anexina-V funcionó correctamente como marcador de fosfatidilserina (PS) en mamíferos marinos. El proceso de expresión de PS hacia la cara externa de la membrana plaquetaria y posterior formación de micropartículas fue similar al observado en seres humanos (Arraud et al.,2016).

### ***2.1.3 Detección de plaquetas reticuladas en mamíferos marinos.***

Consideramos la puesta a punto de este protocolo en mamíferos marinos como un resultado en sí mismo. Las analíticas generales que se realizan en estas especies abarcan el estudio del recuento de plaquetas y del volumen plaquetario medio (VPM). Cuando este último parámetro se encuentra elevado indica que se están liberando plaquetas inmaduras al torrente sanguíneo, cuyo tamaño es mayor al de las plaquetas normales. Sin embargo, un leve aumento en los niveles de plaquetas inmaduras podría ser imperceptible empleando esta medida, ya que se puede enmascarar al realizar la media de los volúmenes plaquetarios de las plaquetas inmaduras y las maduras. Con este protocolo evaluamos los niveles de plaquetas reticuladas identificando aquellas que aún conservan el ARN, suponiendo una herramienta útil en el diagnóstico precoz de enfermedades trombocitopénicas y en su posterior monitorización

En conclusión, las diferentes metodologías adaptadas en esta tesis para el estudio de la funcionalidad plaquetaria en mamíferos marinos pueden resultar útiles en la detección

precoz y seguimiento de ciertas alteraciones hemostáticas, ya sean derivadas de patologías, estrés o exposición a contaminantes.

## 2.2 Valores fisiológicos de funcionalidad plaquetaria en animales sanos.

### 2.2.1 Movilización de calcio intraplaquetario en animales sanos.

Todas las muestras presentaron un patrón similar de activación plaquetaria empleando el ADP como estímulo. En primer lugar, las plaquetas mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia del Fluo-4, indicando un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Fisiológicamente, este mecanismo conlleva cambios en la morfología plaquetaria, agregación de las plaquetas y secreción de moléculas activas, gránulos y vesículas (Monteiro et al.,1999). A continuación, se observa un ligero y progresivo descenso en la fluorescencia del Fluo-4, que representa el retorno del  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio extracelular y a sus reservorios internos.

#### 2.2.1.1 Delfines mulares (*Tursiops truncatus*)

Para obtener los valores de referencia de la movilización de calcio intraplaquetario en delfines bajo cuidado humano sanos, analizamos las muestras de los delfines del Oceanogràfic y de Mundomar. Puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre delfines procedentes de diferentes acuarios, se pudieron considerar como una única población de delfines bajo cuidado humano. Tampoco se observaron diferencias significativas entre individuos de diferentes acuarios del mismo sexo o edad (Tabla 21). En concreto, se analizaron 60 muestras de los 15 delfines del Oceanogràfic y 6 muestras de 5 delfines de Mundomar, calculando las medianas de los resultados de cada individuo como se detalla en el apartado de Material y Métodos. El parámetro “tiempo de estimulación”, referente al tiempo desde la adición del ADP hasta el pico de fluorescencia de Fluo-4 (segundos), solo se midió en delfines del Oceanogràfic, por lo que no se incluye en esta comparación.



| Grupos   | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final |
|--|--|---|---|---|---|--|
| <b>Delfines Oceanográfico n=15</b>                                 | 54000 $\pm$ 4800                         | 3,45 $\pm$ 0,25   | 1,97 $\pm$ 0,12   | 31243 $\pm$ 3889  | 11321 $\pm$ 1272  | -38,4 $\pm$ 6                                      |
| <b>Delfines Mundomar n=5</b>                                       | 38000 $\pm$ 5600                         | 3,4 $\pm$ 0,7   | 1,6 $\pm$ 0,1   | 42430 $\pm$ 8621  | 17881 $\pm$ 7616  | -66,5 $\pm$ 20                                     |
| <b>Delfines Oceanográfico VS Delfines Mundomar</b>                 | NDS                                      | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  |
| <b>Delfines Adultos Oceanográfico n=11</b>                         | 49000 $\pm$ 5200                         | 3,5 $\pm$ 0,3   | 1,9 $\pm$ 0,1   | 35485 $\pm$ 4376  | 13024 $\pm$ 1317  | -54 $\pm$ 9,5                                      |
| <b>Delfines Adultos Mundomar n=5</b>                               | 38000 $\pm$ 5600                         | 3,4 $\pm$ 0,7   | 1,6 $\pm$ 0,1   | 39187 $\pm$ 10313   | 10387 $\pm$ 1747  | -66,5 $\pm$ 20                                     |
| <b>Delfines Adultos Oceanográfico VS Delfines Adultos Mundomar</b> | NDS                                      | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  |
| <b>Crías Oceanográfico VS Crías Mundomar</b>                       | (*)                                      | (*)   | (*)   | (*)   | (*)   | (*)  |
| <b>Hembras Oceanográfico n=9</b>                                   | 50000 $\pm$ 5600                         | 3,5 $\pm$ 0,3   | 1,8 $\pm$ 0,2   | 36071 $\pm$ 5247  | 12054 $\pm$ 1651  | -47 $\pm$ 11                                       |
| <b>Hembras Mundomar n=4</b>  | 38000 $\pm$ 5600                         | 3,4 $\pm$ 0,7   | 1,7 $\pm$ 0,4   | 39187 $\pm$ 10313   | 10387 $\pm$ 1747  | -66,5 $\pm$ 20                                     |
| <b>Hembras Oceanográfico VS Hembras Mundomar</b>                   | NDS                                      | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  |
| <b>Machos Oceanográfico VS Machos Mundomar</b>                     | (*)                                      | (*)   | (*)   | (*)   | (*)   | (*)  |

Tabla 21. Comparación en la movilización de calcio intraplaquetario entre delfines procedentes de diferentes acuarios, globalmente o por sexo y edad (NDS:  $p \geq 0,05$ ). (\*) No hay muestras representativas de crías y machos de Mundomar.

Tomando los animales de ambos acuarios como una sola población, los valores de cada parámetro estudiado en la población de delfines bajo cuidado humano, así como los resultados desglosados por sexo o edad, se detallan en la Tabla 22. Se observaron diferencias significativas entre crías y adultos en el recuento plaquetario y en el delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal, aunque esta diferencia es muy pequeña y desaparece empleando las medias en lugar de las medianas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre animales de diferente sexo.

| Grupos  | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l      | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segs)          |
|---|---|---|---|---|---|--|--|
| Delfines bajo cuidado humano n=20                         | 50800 $\pm$ 4200<br>(min:22746;<br>max:93400) | 3,4 $\pm$ 0,2<br>(min:1,8;<br>max:4,2)                    | 1,9 $\pm$ 0,1<br>(min:1,28;<br>max:3,1)                   | 34040 $\pm$ 3675<br>(min: 6720;<br>max:67517)                   | 12954 $\pm$ 2091<br>(min:2576;<br>max:47859)                  | -50 $\pm$ 7<br>(min:-10;<br>max:-135)              | 19,6 $\pm$ 1,3<br>(min:13;<br>max: 26) |
| Crías bajo cuidado humano n=4                             | 68400 $\pm$ 8600                              | 3,3 $\pm$ 0,3   | 1,9 $\pm$ 0,3   | 19578 $\pm$ 5219  | 6606 $\pm$ 1529   | -24,5 $\pm$ 17                                     | 15 $\pm$ 1,5                           |
| Adultos bajo cuidado humano n=16                          | 46200 $\pm$ 4200                              | 3,5 $\pm$ 0,3   | 1,9 $\pm$ 0,1   | 37655 $\pm$<br>3957   | 14542 $\pm$ 2443  | -49 $\pm$ 7  | 21,5 $\pm$ 1                           |
| Crías bajo cuidado humano VS Adultos bajo cuidado humano  | p=0,028*                                      | NDS   | NDS   | p=0,046*<br>(*)   | NDS   | NDS  | NDS                                    |
| Machos bajo cuidado humano n=7                            | 60400 $\pm$ 8600                              | 3,3 $\pm$ 0,2   | 1,57 $\pm$ 0,2  | 28488 $\pm$ 6003  | 15579 $\pm$<br>5663   | -31 $\pm$ 9  | 19 $\pm$ 3                             |
| Hembras bajo cuidado humano n=13                          | 46400 $\pm$ 4400                              | 3,5 $\pm$ 0,3   | 1,7 $\pm$ 0,1   | 37029 $\pm$<br>4589   | 11541 $\pm$ 1242  | -60 $\pm$ 9  | 20 $\pm$ 0,9                           |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | NDS                                    |

Tabla 22. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en delfines bajo cuidado humano. Se observaron diferencias significativas entre crías y adultos en dos de los parámetros ( $p \leq 0,05^*$ )(\*) *Esta diferencia es muy pequeña.* (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

La concentración de plaquetas en sangre fue significativamente mayor en las crías que en los adultos. Esto no es un hallazgo sorprendente. Varios trabajos anteriores a esta tesis han descrito recuentos plaquetarios superiores en crías de delfín que en adultos, o rangos de valores más amplios y con un límite superior más elevado (De Mello y Da Silva, 2019; Hall et al., 2007).

Por otro lado, los delfines adultos presentaron un aumento máximo de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico tras estimular con ADP significativamente superior a las crías (delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal). En este caso, la diferencia es muy pequeña. Tanto es así que, empleando las medias de los datos de cada animal en lugar de las medianas, la diferencia no es significativa (Crías:  $20024 \pm 5513$ ; Adultos:  $37021 \pm 4008$ ;  $p \geq 0,05$ ). Para aclarar este resultado sería conveniente tomar un mayor tamaño muestral.

Los valores descritos en la Tabla 22 informan del tipo de respuesta que presentan las plaquetas de delfines sanos tras ser estimuladas con ADP ( $24 \mu\text{M}$ ). Una respuesta plaquetaria muy alejada de los valores facilitados puede ser indicativa de la presencia de problemas hemostáticos en el animal.

Por otro lado, se evaluó la activación plaquetaria en 16 delfines salvajes sanos (una muestra por animal). A continuación, se detallan los resultados de cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario obtenidos en el grupo y las diferencias por sexos o edades (Tabla 23).

Las hembras salvajes presentaron un recuento plaquetario significativamente mayor al de los machos. Si bien sobre este aspecto no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre crías y adultos, la concentración de plaquetas en sangre de las crías es notablemente superior a la de los adultos, de forma similar a la observada en delfines bajo cuidado humano (De Mello y Da Silva, 2019; Hall et al., 2007). Cabe destacar que la mayoría de las hembras salvajes eran crías o animales muy jóvenes, con una media de edad de 5,8 años, mientras que la mayoría de los machos eran adultos, con una media de edad de 18,8 años. De hecho, el recuento plaquetario de las crías y las hembras es muy similar, al igual que el de los machos y los adultos.

| Grupos                              | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segs)  |
|-------------------------------------|--|---|---|---|---|--|--------------------------------|
| Delfines salvajes sanos<br>n=16     | 54000±6600<br>(min:37040;<br>max:101300) | 3,3±0,5<br>(min:2,5;<br>max:4,4)                          | 1,3±0,1<br>(min:0,99;<br>max:1,5)                         | 41885±2887<br>(min:25225;<br>max:59080)                         | 5222±1178<br>(min:-272;<br>max:9706)                          | -79±7<br>(min:-35;<br>max:-107,6)                  | 20±1,6<br>(min:14;<br>max:28). |
| Crias salvajes<br>n=6               | 63800±13200                              | 3,4±0,4   | 1,36±0,07   | 42729±5565  | 6815±1657   | -75,3±11   | 20±3                           |
| Adultos salvajes<br>n=10            | 47600±6200                               | 3,2±0,2   | 1,24±0,09   | 41323±3530  | 4168±1582   | -81±10   | 20±2,2                         |
| Crias salvajes VS Adultos salvajes  | NDS                                      | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | NDS                            |
| Machos salvajes<br>n=7              | 41400±2200                               | 3,1±0,2   | 1,2±0,1   | 40041±4522  | 4082±1910   | -80±12   | 20±1,5                         |
| Hembras salvajes<br>n=9             | 66600±10400                              | 3,56±0,3  | 1,3±0,07  | 43730±3918  | 6362±1396   | -77±9  | 20±3                           |
| Machos salvajes VS Hembras salvajes | p=0,04*                                  | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | NDS                            |

Tabla 23. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en delfines salvajes sanos. Las hembras presentaron un recuento plaquetario mayor al de los machos ( $p=0,04^*$ )(NDS:  $p \geq 0,05$ ).

Para averiguar si las diferentes formas de vida, hábitat, alimentación o exposición a contaminantes o agentes estresantes entre otras cosas, podían generar cambios en la activación plaquetaria, estudiamos si existían diferencias en la movilización de  $Ca^{2+}$  intraplaquetario entre delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes. Evaluamos las diferencias entre ambos grupos globalmente y por sexos y edades. Las diferencias observadas entre grupos se resumen en la Tabla 24.

| Grupos   | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segundos) |
|--|--|---|---|---|---|--|-----------------------------------|
| <b>Delfines salvajes VS Delfines bajo cuidado humano (BCH)</b> | NDS                                      | NDS   | Salvajes< BCH<br>p=0,0003***                                  | NDS   | Salvajes< BCH<br>p=0,018 *                                    | Salvajes> BCH<br>p=0,018*                          | NDS                               |
| <b>Delfines salvajes adultos VS Delfines BCH adultos</b>       | NDS                                      | NDS   | Salvajes< BCH<br>p=0,0019**                                   | NDS   | Salvajes< BCH<br>p=0,02*                                      | Salvajes> BCH<br>p=0,02*                           | NDS                               |
| <b>Crías salvajes VS Crías BCH</b>                             | NDS                                      | NDS   | NDS   | Salvajes>BCH<br>p=0,02*   | NDS   | Salvajes> BCH<br>p=0,048*                          | NDS                               |
| <b>Hembras salvajes VS Hembras BCH</b>                         | Salvajes> BCH<br>p=0,048*                | NDS   | NDS (*)   | NDS   | Salvajes< BCH<br>p=0,03*                                      | NDS  | NDS                               |
| <b>Machos salvajes VS Machos BCH</b>                           | NDS                                      | NDS   | NDS (*)   | NDS   | NDS   | Salvajes> BCH<br>p=0,0032**                        | NDS                               |

Tabla 24. Diferencias observadas en la movilización de calcio intraplaquetario entre delfines salvajes y delfines bajo cuidado humano globalmente y por género y edad. Tanto entre las poblaciones globales como entre las poblaciones de adultos, la recaptación del calcio hacia sus reservorios internos o espacio extracelular fue más rápida y eficaz en los animales salvajes que en los delfines BCH. Esta diferencia se conserva solo parcialmente entre los grupos de crías y entre sexos. (\*) Empleando las medias en lugar de las medianas, las diferencias son significativas. (NDS:  $p \geq 0,05$ ;  $p \leq 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ).

a) Diferencias entre delfines salvajes y delfines bajo cuidado humano:

Tras la activación, las plaquetas de los delfines salvajes mostraron una recuperación del  $Ca^{2+}$  hacia sus reservorios intraplaquetarios y espacio extracelular significativamente más rápida y eficaz que las de los delfines bajo cuidado humano. En concreto, los delfines salvajes presentaron un menor ratio y delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal y una pendiente de recuperación más acusada (Tabla 24). Este efecto viene dado por diferentes factores:

1. La concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico basal en las plaquetas en reposo fue superior en delfines salvajes que en delfines bajo cuidado humano (Figura 57 y 58).

- Al activar las plaquetas, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico ocurrió de forma similar en ambos grupos. Esto queda constatado al no observarse diferencias significativas en el ratio y el delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y punto basal (Tabla 24).
- En el punto máximo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en las plaquetas de los delfines salvajes fue significativamente mayor a la de los delfines en cautividad, debido a que partían de una concentración basal superior (Figura 57 y 58).
- Tras la estimulación plaquetaria, hubo una mayor y más rápida redistribución del  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol hacia sus reservorios intraplaquetarios o hacia el medio extracelular en animales salvajes que en animales bajo cuidado humano (Tabla 24). La pendiente de recuperación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico a su estado basal fue más pronunciada en los animales salvajes, dado que presentaban una concentración máxima de  $\text{Ca}^{2+}$  mayor que los animales en cautividad, pero una concentración final similar a ellos (Figura 57 y 58).

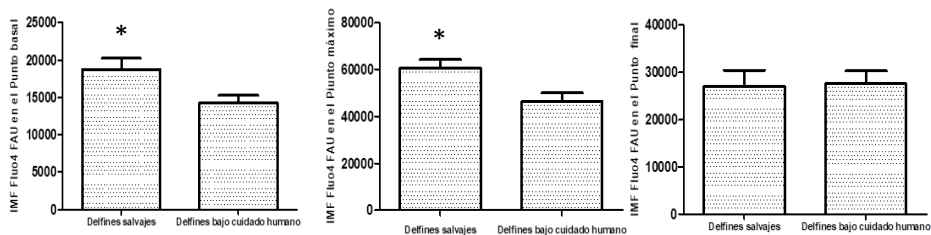


Figura 57. La IMF del Fluo-4 en los puntos basal y punto máximo (pico) fue significativamente mayor en delfines salvajes que en delfines bajo cuidado humano ( $p=0,017$  y  $p=0,018$  respectivamente). En el punto final no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (NDS: $p \geq 0,05$ ).

#### b) Diferencias entre delfines salvajes y bajo cuidado humano por edades:

En los delfines adultos encontramos las mismas diferencias entre animales salvajes y en cautividad que en las poblaciones globales, detalladas en el apartado (a). En las crías, estas diferencias se conservan, aunque únicamente son estadísticamente significativas las diferencias en la pendiente de recuperación (Tabla 24). Posiblemente esto sea consecuencia de haber reducido el tamaño muestral dividiendo la población por hábitats y edades.

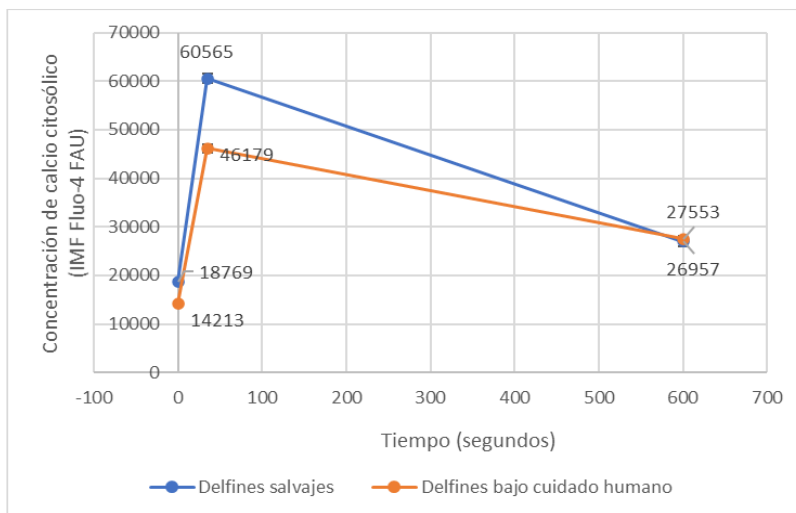


Figura 58. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo al activar las plaquetas en delfines salvajes (azul) y delfines bajo cuidado humano (naranja). La gráfica muestra la IMF del Fluo-4 media de cada población en el punto basal (0 segs), pico (35 segs) y final (600 segs). Se empleó la media de los tiempos en cada punto.

Por otro lado, observamos que el aumento máximo de calcio citosólico tras estimular las plaquetas (delta entre la IMF del Fluo-4 pico y basal) es significativamente mayor en las crías salvajes que en las albergadas en acuarios. Esta diferencia se debe a que, en crías salvajes, la concentración de calcio citosólico en los puntos basal y máximo son significativamente superiores a la de las crías en cautividad, pero en especial en el punto máximo ( $p=0,025$  y  $p=0,0099$  respectivamente). La concentración final de  $Ca^{2+}$ , por el contrario, se mantiene similar en ambos grupos. Para conocer las causas de este efecto sería necesario profundizar más en el estudio y aumentar el tamaño muestral.

### c) Diferencias entre delfines salvajes y bajo cuidado humano por sexos:

Las diferencias detalladas en el apartado (a) se conservan entre sexos, aunque no todas de manera significativa, posiblemente debido a la reducción del tamaño muestral al dividir la población en subpoblaciones. Las diferencias que se conservaron estadísticamente

significativas fueron: En el caso de las hembras, el delta entre IMF del Fluo-4 en el punto final y basal; y en el caso de los machos, la pendiente de recuperación (Tabla 24). En ambos casos (machos y hembras), empleando las medias en lugar de las medianas de los datos, las diferencias serían también significativas para el ratio entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (Machos:  $p=0,018$ ; Hembras:  $p=0,0066$ ).

Además, las hembras salvajes presentaron un mayor recuento plaquetario que las hembras bajo cuidado humano, posiblemente debido a que la mayoría de las hembras salvajes eran crías (edad media de 5,8 años) y la mayoría de las hembras bajo cuidado humano eran adultas (edad media de 21,4 años).

En vista de estos resultados, la diferencia en la concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico basal en las plaquetas entre ambos grupos podría deberse a diferentes factores. Nuestras principales hipótesis sobre las posibles causas son que los delfines salvajes pueden estar expuestos a determinados contaminantes ambientales que potencian la activación plaquetaria, o bien que podrían haber sufrido estrés durante el muestreo, ya que los animales de vida libre no están desensibilizados a la extracción de sangre.

Respecto a la primera hipótesis, se ha demostrado la capacidad de determinados xenobióticos para potenciar la activación de las plaquetas tanto en seres humanos como en ratas. Entre ellos, se encuentran algunos metales pesados, como el Cd, que puede activar las plaquetas mediante el aumento del calcio citosólico (Mukhopadhyay et al., 1988). Mujeres adultas expuestas de forma crónica al Cd presentaron una activación y reactividad plaquetaria basal superior a los controles no expuestos (Nontarach et al., 2015). Por otro lado, la deficiencia en Zn dificulta la entrada de calcio desde el medio extracelular al citosol plaquetario y en consecuencia reduce la agregación de las plaquetas inducida por el ADP (Emery y O'Dell, 1993). También la deficiencia de Cu afectó negativamente a la movilización de calcio intraplaquetario en ratas (Johnson y Dufault, 1993). Otros metales pesados, como el As, el Mn o el Hg se han relacionado con el aumento en la activación plaquetaria de forma dosis-dependiente (Bae et al., 2008; Kostka et al., 1997; van Rensburg, et al., 2018). Algunos PCBs también son capaces de modular dicha activación (Raulf y Konig, 1991).

Por contra, otros contaminantes inhiben la activación de las plaquetas. Algunos ejemplos serían pesticidas como el DDE (Lundholm y Bartonek, 1991) o fármacos presentes en los mares y océanos en concentraciones significativas, como el paracetamol, la aspirina o el



ibuprofeno (Driver et al., 2019). En esta tesis estudiamos los efectos de estos fármacos sobre las plaquetas de delfines. Los resultados se detallan en el apartado 5, pero en su mayoría concuerdan con los estudios previos realizados en humanos.

Como hemos mencionado anteriormente, realizamos un estudio toxicológico de diferentes matrices (tejidos, plasma y sangre entera) de delfines salvajes y bajo cuidado humano. En la sangre de los delfines salvajes encontramos concentraciones de Cd, As, Mn y Hg superiores a las halladas en las muestras de delfines bajo cuidado humano. Estos resultados se detallarán con más detalle en el apartado 5, pero pueden suponer un interesante soporte a esta hipótesis.

Por otro lado, respecto a la segunda hipótesis, como se ha detallado en la introducción, durante un proceso de estrés agudo la adrenalina y la noradrenalina se liberan al torrente sanguíneo. La adrenalina actúa inhibiendo la liberación de AMPc e induciendo la movilización de calcio en la plaqueta (Alarayed et al., 1997; Zoccarato et al., 1991). Este aumento es temporal, aunque dependiente de la concentración de la catecolamina. Por ejemplo, en humanos, la adrenalina a 16  $\mu\text{M}$  produce un aumento de calcio citosólico en la plaqueta durante al menos 5 minutos (Alarayed et al., 1997). La noradrenalina también tiene un efecto activador, aunque de forma menos notable (Hjemdahl y Wallen, 1997). Tanto es así que ambas catecolaminas se emplean como agonistas plaquetarios en estudios *in vitro* (Butt et al 2005; Cimminiello et al., 1989; Feoktistov et al 1992).

Ambas hipótesis podrían ser válidas, ya que no son excluyentes.

Los valores fisiológicos de activación plaquetaria obtenidos en delfines salvajes sanos pueden servir como referencia para los datos extraídos en delfines varados en las costas valencianas, ya que viven en unas condiciones más similares a ellos que los delfines bajo cuidado humano.

#### **2.2.1.2 Belugas (*Delphinapterus leucas*)**

Se analizaron 20 muestras de los tres animales disponibles (5 de la cría, 9 de la hembra y 6 del macho adulto). En la Tabla 25 se detallan los resultados de cada parámetro de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario obtenidos en el grupo y las diferencias por sexos o edades.

| Grupos                           | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l       | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segs)       |
|----------------------------------|--|---|---|---|---|--|-------------------------------------|
| Belugas bajo cuidado humano n=3  | 77320 $\pm$ 5452<br>(min:54880;<br>max:118360) | 3,6 $\pm$ 0,3<br>(min:1,07;<br>max:5,4)                   | 2,5 $\pm$ 0,2<br>(min:1,1;<br>max:4,4)                    | 27136 $\pm$ 3068<br>(min:15762;<br>max:50514)                   | 14738,3 $\pm$ 2816<br>(min:3459;<br>max:45226)                | -34,7 $\pm$ 4,8<br>(min:-10 ;<br>max:-91,4)        | 31 $\pm$ 1,5<br>(min:28;<br>Max:40) |
| Belugas crías n=1                | 98000 $\pm$ 12000                              | 3,7 $\pm$ 0,5   | 2,3 $\pm$ 0,4   | 21630 $\pm$ 5359  | 9987 $\pm$ 3181   | -30,2 $\pm$ 9,4                                    | 34 $\pm$ 6                          |
| Belugas adultas n=2              | 69600 $\pm$ 4120                               | 3,6 $\pm$ 0,4   | 2,58 $\pm$ 0,3  | 28971 $\pm$ 3651  | 16322 $\pm$ 3559  | -36,2 $\pm$ 5,8                                    | 30 $\pm$ 0,2                        |
| Belugas crías VS Belugas adultas | p=0,0145*                                      | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | NDS                                 |
| Belugas machos n=2               | 79040 $\pm$ 8400                               | 3,8 $\pm$ 0,4   | 2,68 $\pm$ 0,4  | 27740 $\pm$ 4803  | 4182 $\pm$ 3912   | -36,2 $\pm$ 8                                      | 32 $\pm$ 2,7                        |
| Beluga hembra n=1                | 73480 $\pm$ 6560                               | 3,5 $\pm$ 0,5   | 2,4 $\pm$ 0,3   | 26397 $\pm$ 3789  | 15419 $\pm$ 4289  | -32,8 $\pm$ 5                                      | 30 $\pm$ 0,4                        |
| Belugas crías VS Belugas adultas | NDS  | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | NDS                                 |

Tabla 25. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en belugas sanas. Las crías presentaron un recuento plaquetario significativamente superior al de los adultos (p=0,014\*) (NDS: p $\geq$ 0,05).

Al igual que en el caso de los delfines, la cría presentó un recuento plaquetario por microlitro significativamente superior al de los adultos (Tabla 25). En todos los casos, este parámetro se mantuvo en el rango de referencia establecido para la especie (Choczynski, 2007). No se observaron diferencias significativas entre machos y hembra.

Estos datos nos permiten detectar alteraciones en la funcionalidad plaquetaria en estos tres individuos como una herramienta diagnóstica prácticamente personalizada. Para extrapolar estos resultados a animales de otros acuarios sería necesario tomar muestras de individuos procedentes de otros núcleos zoológicos.

### **2.2.1.3 Morsas (*Odobenus Rosmarus*)**

Se estudiaron 5 muestras de cada morsa en diferentes días, obteniendo un total de quince muestras de esta especie. La tres eran hembras de la misma edad. Los resultados obtenidos para cada parámetro de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario se muestran en la Tabla 26.

| Grupos                            | Recuento de plaquetas libres por $\mu\text{l}$ | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segundos) |
|-----------------------------------|--|---|---|---|---|--|-----------------------------------|
| Morsas bajo cuidado humano<br>n=3 | 70460±4622<br>(min:48600;<br>max:98600)        | 3,5±0,3<br>(min: 2,1;<br>max:5,6)                         | 1,8±0,1<br>(min:1,3;<br>max:2,5)                          | 70062,5±699<br>4<br>(min:45341;<br>max:124328)                  | 23554,2±346<br>0<br>(min:10159;<br>max:49171)                 | -111±14,6<br>(min:64,6;<br>max:-<br>203,4)         | 31,6±2,8<br>(min:30;<br>max: 35)  |

Tabla 26. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en morsas sanas.

### **2.2.1.4 Leones marinos (*Otaria flavescens*)**

Para determinar los valores fisiológicos de activación plaquetaria en leones marinos, se obtuvieron muestras de individuos del Oceanogràfic y de Mundomar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario entre leones marinos procedentes de diferentes acuarios, por lo que se pudieron considerar como una única población. Tampoco se observaron diferencias significativas entre machos y hembras (Tabla 27). El tiempo de estimulación no se evaluó en esta especie.

Se analizaron 11 muestras totales procedentes de 8 leones marinos adultos. Los valores fisiológicos de movilización de calcio intraplaquetario en la población y los resultados desglosados por sexo se muestran en la Tabla 27.

| Grupos  | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l      | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final |
|---|---|---|---|---|---|--|
| Leones marinos Oceanográfico n=6                        | 77200 $\pm$ 8860                              | 4,9 $\pm$ 0,4   | 1,6 $\pm$ 0,2   | 36875 $\pm$ 4590  | 5800 $\pm$ 2379   | -164 $\pm$ 16                                      |
| Leones marinos Mundomar n=2                             | 84400 $\pm$ 200                               | 4 $\pm$ 0,2   | 1,7 $\pm$ 0,15  | 22729 $\pm$ 727   | 5537 $\pm$ 1409   | -114,6 $\pm$ 18,7                                  |
| Leones marinos Oceanográfico VS Leones marinos Mundomar | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  |
| Leones marinos bajo cuidado humano n=8                  | 71120 $\pm$ 9440<br>(min:33600;<br>max:99400) | 4,6 $\pm$ 0,35<br>(min:3,4;<br>max:6,5)                   | 1,6 $\pm$ 0,1<br>(min:1,6;<br>max:2,4)                    | 31362 $\pm$ 3693<br>(min:15149;<br>max:51589)                   | 5413 $\pm$ 1414<br>(min:1666;<br>max:17417)                   | -148 $\pm$ 13,26<br>(min:-93;<br>max:-236)         |
| Leones marinos machos n=3                               | 62800 $\pm$ 100                               | 4,5 $\pm$ 0,4   | 1,4 $\pm$ 0,1   | 34674 $\pm$ 8606  | 3366 $\pm$ 427  | -154 $\pm$ 15                                      |
| Leones marinos hembras n=5                              | 82600 $\pm$ 7400                              | 4,7 $\pm$ 0,5   | 1,7 $\pm$ 0,2   | 32537 $\pm$ 4901  | 7156 $\pm$ 2701   | -150,2 $\pm$ 23                                    |
| Leones marinos machos VS Leonas marinas hembras         | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  |

Tabla 27. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de movilización de calcio intraplaquetario en leones marinos sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### 2.2.1.5 Focas comunes (*Phoca vitulina*)

Dada la dificultad en la obtención de muestras en focas, en la Tabla 28 se muestran los resultados de activación plaquetaria observados en una foca sana. Como es lógico, estos resultados son anecdóticos y no se pueden tomar como representativos de la población, pero permiten estimar cómo funciona en pequeños pinnípedos este proceso.

| Grupos | Recuento de plaquetas libres por $\mu$ l | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final |
|--------|--|---|---|---|---|--|
| Neus   | 79700                                    | 2,41  | 1,32  | 11513   | 2640  | -73,24   |

Tabla 28. Valores de movilización de calcio intraplaquetario obtenidos en una foca sana.

### 2.2.2 Diferencias en la movilización de calcio intraplaquetario entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.

Las diferencias observadas en la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario entre las diferentes especies de mamíferos marinos se detallan en la Tabla 29. Las distintas respuestas plaquetarias ante el estímulo entre especies se grafican en la Figura 59.

A continuación, resumimos las diferencias observadas en la movilización de calcio intraplaquetario entre especies (Tabla 29):

- *Diferencias entre delfines y belugas:*
  - Los delfines mostraron una menor concentración de plaquetas en sangre que belugas y que el resto de especies.
  - La activación de las plaquetas fue una media de 11,4 segundos más rápida en delfines que en belugas.
- *Diferencias entre delfines y morsas:*
  - Los delfines presentaron un menor recuento plaquetario por  $\mu\text{l}$  que las morsas.
  - Las plaquetas de los delfines se activaron una media de 12 segundos más rápido que las de las morsas.
  - El aumento de calcio citosólico tras estimular las plaquetas con ADP fue inferior en delfines que en morsas (delta entre la IMF del Fluo-4 entre el pico y el basal).
  - La posterior recuperación del calcio hacia sus reservorios fue más lenta en delfines que en morsas (delta entre la IMF del Fluo-4 entre los puntos final y basal y pendiente de la recta).

Estas diferencias no son visibles empleando los ratios de las IMF de cada punto, lo cual puede indicar que las diferencias no son muy notables biológicamente. La concentración de calcio citosólico basal, máxima y final son significativamente superiores en las morsas que en los delfines ( $p=0,0007$  \*\*\*,  $p=0,0036$  \*\* y  $p=0,015$  \* respectivamente) especialmente en los puntos basal y pico, lo que explica las diferencias observadas entre ambas especies (Figura 59).

| Comparación entre grupos   | Recuento de plaquetas por $\mu$ l | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final | Tiempo de estimulación (segundos) |
|----------------------------|-----------------------------------|---|---|---|---|--|-----------------------------------|
| Delfines vs Belugas        | p=0,0007 ***<br>Delfines< Belugas | NDS   | NDS   | NDS   | NDS   | NDS  | p<0,0001 ***<br>Delfines< Belugas |
| Delfines vs Morsas         | p=0,005 **<br>Delfines< Morsas    | NDS   | NDS   | p<0,0001 ***<br>Delfines< Morsas                      | p=0,009 **<br>Delfines< Morsas                                | p=0,0005 ***<br>Delfines< Morsas                   | p=0,0007 ***<br>Delfines< Morsas  |
| Delfines vs Leones marinos | p=0,037 *<br>Delfines< Leones     | p=0,003 **<br>Delfines< Leones                            | p=0,049 *<br>Delfines> Leones                           | NDS (-)   | p=0,02 *<br>Delfines> Leones                                  | p<0,0001 ***<br>Delfines< Leones                   | (--)                              |
| Delfines vs Focas          | p=0,015 *<br>Delfines< Focas      | NDS (-)   | p=0,03 *<br>Delfines> Focas                             | p=0,03 *<br>Delfines< Focas                           | NDS (-)   | NDS (-)  | (--)                              |
| Belugas vs Morsas          | NDS                               | NDS   | p=0,039 *<br>Belugas> Morsas                            | p<0,0001 ***<br>Belugas< Morsas                       | NDS   | p<0,0001 ***<br>Belugas< Morsas                    | NDS                               |
| Belugas vs Leones marinos  | NDS                               | NDS   | p=0,018 *<br>Belugas> Leones                            | NDS   | p=0,03 *<br>Belugas> Leones                                   | p<0,0001 ***<br>Belugas< Leones                    | (--)                              |
| Belugas vs focas           | NDS                               | NDS   | NDS (-)   | NDS   | NDS (-)   | p=0,0068 **<br>Belugas< Focas                      | (--)                              |
| Morsas vs Leones marinos   | NDS                               | p=0,02 *<br>Morsas< Leones                                | NDS   | p=0,0002 ***<br>Morsas> Leones                        | p=0,0002 ***<br>Morsas> Leones                                | NDS  | (--)                              |
| Morsas vs Focas            | NDS                               | NDS   | p=0,025 *<br>Morsas > Focas                             | p=0,0013 **<br>Morsas> Focas                          | p=0,01 *<br>Morsas> Focas                                     | NDS  | (--)                              |
| Leones marinos vs Focas    | NDS                               | p=0,0023 **<br>Leones> Focas                              | NDS   | p=0,015 *<br>Leones> Focas                            | NDS   | p=0,012 *<br>Leones> Focas                         | (--)                              |

Tabla 29. Comparación por pares en la movilización de calcio intraplaquetario entre las diferentes especies bajo cuidado humano (t-test).NDS (-): en estos casos posiblemente no se observan diferencias significativas debido al reducido tamaño poblacional. (--): El tiempo de estimulación no se evaluó en al menos en una de las especies. NDS:  $p \geq 0,05$ .

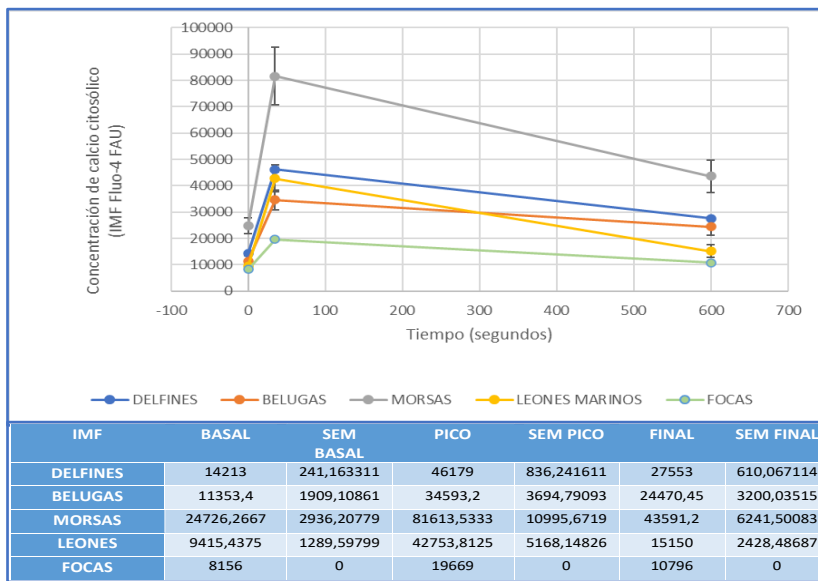


Figura 59. Evolución de la IMF del Fluo-4 en el tiempo en las diferentes especies bajo cuidado humano. Se detalla la IMF-Fluo-4 media y SEM de cada población en el punto basal, pico y final. Estos puntos se corresponden con los tiempos 0 segs, 35 segs y 600 segs (media de los tiempos en cada punto). *Los datos obtenidos en focas deben tomarse con cautela, debido a que están tomados de un solo animal.*

- *Diferencias entre delfines y leones marinos:*
  - Los delfines presentaron una menor concentración de plaquetas en sangre que los leones marinos.
  - Al estimular con ADP, las plaquetas de los leones marinos presentaron una mayor liberación de calcio hacia el citosol que los delfines (ratio entre la IMF de Fluo-4 en el punto máximo y basal).
  - Posteriormente, la recuperación del calcio hacia sus reservorios internos en el retorno de la plaqueta al estado de reposo fue menor y más lenta en delfines que en leones

marinos (ratio y delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal y pendiente de la recta).

Los delfines presentaban concentraciones de calcio basales y finales significativamente superiores a los leones marinos ( $p=0,018^*$  y  $p=0,012^*$  respectivamente), pero una similar concentración máxima, lo que explica que los leones marinos liberaran más calcio desde sus organelas internas hacia el citosol que los cetáceos y una mayor recuperación de los niveles basales posterior (Figura 59).

▪ *Diferencias entre belugas y morsas:*

- Tras ser activadas, las plaquetas de las morsas mostraron una mayor liberación de calcio hacia el citosol que las plaquetas de las morsas (delta entre la IMF del Fluo-4 en los puntos máximo y basal)
- Por otro lado, las belugas presentaron una recuperación del calcio hacia sus reservorios más lenta que las morsas (ratio entre la IMF-Fluo4 de los puntos final y basal y pendiente).

Este último efecto viene dado porque la concentración de calcio citosólico en la plaqueta en los puntos basal, máximo y final fue significativamente mayor en morsas que en belugas ( $p=0,0004^{***}$ ,  $p<0,0001^{***}$  y  $p=0,006^{**}$  respectivamente), siendo la diferencia menos significativa en el punto final.

▪ *Diferencias entre belugas y leones marinos:*

- Los leones marinos mostraron una recuperación del calcio hacia sus reservorios internos más rápida y eficaz que las belugas, mostrando una pendiente de recuperación significativamente más pronunciada y una concentración final de calcio citosólico inferior con respecto a la concentración basal (ratio y el delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal y pendiente).

▪ *Diferencias entre morsas y leones marinos:*

- Al activarse, las plaquetas de los leones marinos liberaron más calcio al citosol que las plaquetas de las morsas (ratio entre la IMF de Fluo-4 en el pico y el punto basal).



- La posterior recuperación del calcio hacia los reservorios internos fue más eficaz en leones marinos que en morsas (delta entre la IMF del Fluo-4 entre el pico y el punto final). Este efecto viene dado porque, en proporción, la concentración de calcio que permanece en el citosol de la plaqueta a tiempo final es mayor en morsas que en leones marinos. Además, a pesar de que la pendiente no es estadísticamente diferente entre ambas especies, es superior en leones marinos.
- La concentración de calcio citosólico es mayor en morsas que en leones marinos en los puntos basal, máximo y final ( $p=0,0014^{**}$ ,  $p=0,02^*$ ,  $p=0,004^{**}$  respectivamente) (Figura 59).

Puesto que los datos aportados sobre la movilización de calcio intraplaquetario en focas son anecdóticos, no pudimos tomarlos como unos valores representativos de la especie. En la Tabla 29 se comparan estadísticamente con los resultados obtenidos en delfines, belugas, morsas y leones marinos, aunque estos datos deben tomarse con cautela.

Las diferencias en la cinética de movilización de calcio intraplaquetario entre especies se aprecian fácilmente por la forma de la curva, especialmente entre cetáceos y pinnípedos (Figura 60).

En resumen, principalmente encontramos diferencias en la movilización de calcio intraplaquetario entre cetáceos y pinnípedos, mostrando estos últimos una mayor liberación de calcio desde los reservorios intraplaquetarios al citosol que los cetáceos al estimular las plaquetas con ADP, así como una posterior recuperación de los niveles basales más rápida y eficaz. En concreto, las morsas mostraron concentraciones de calcio citosólico superiores al resto de las especies en todos los puntos de la curva. Los delfines, por su parte, mostraron una concentración de calcio citosólico basal inferior al resto de las especies, pero un tiempo de estimulación menor al resto de las especies. La morfología de la curva fue similar entre familias, pero algo distinta entre cetáceos y pinnípedos. Dentro de cada familia existen diferencias interespecíficas.

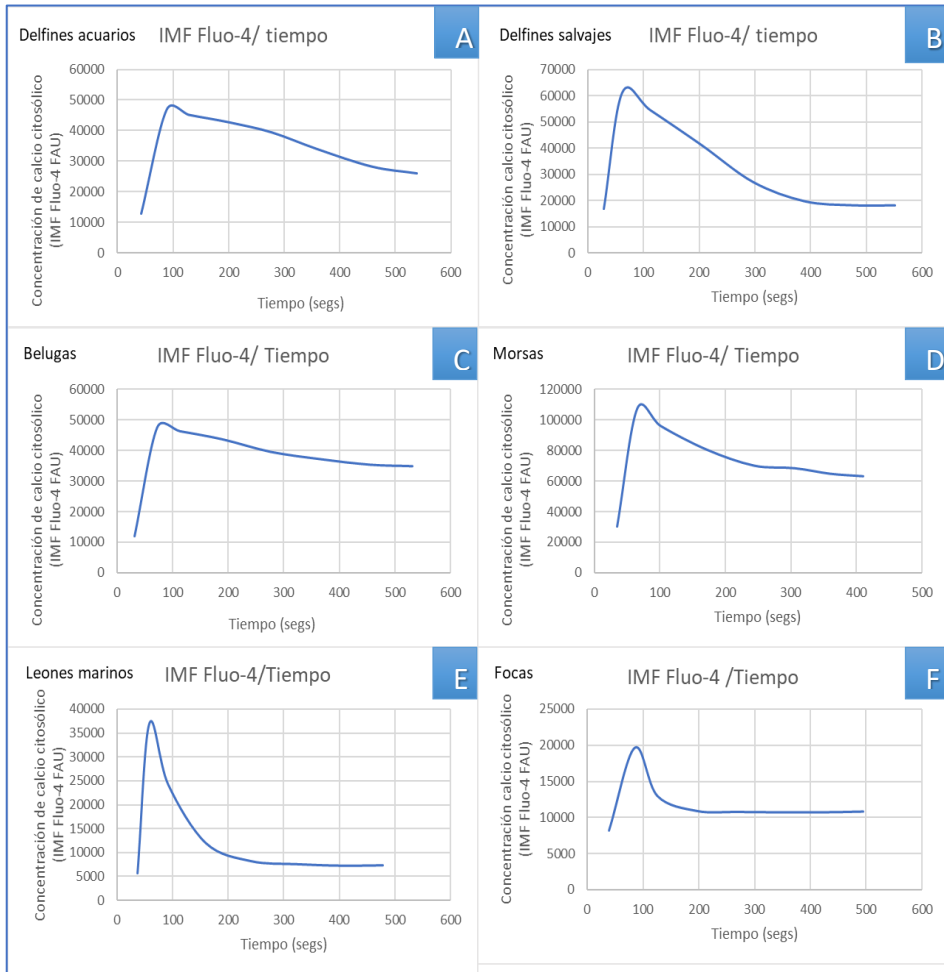


Figura 60. Ejemplo de la morfología de la curva que describe la concentración de calcio citosólico al estimular con ADP en las diferentes especies. Se trata de muestras puntuales de un animal de cada especie que son representativas de la población. (A) Delfines bajo cuidado humano; (B) Delfines salvajes; (C) Belugas; (D) Morsas; (E) Leones marinos; (F) Focas.

### 2.2.3 Expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas en animales sanos.

Al estimular las plaquetas, estas mostraron un aumento progresivo e irreversible de la exposición de fosfatidilserina en la membrana plaquetaria (fluorescencia de Anexina-V) y de la liberación de micropartículas (señal FSC), también portadoras de PS. Puesto que el ionóforo de calcio es un estímulo fuerte no fisiológico, desencadena una fragmentación plaquetaria en múltiples micropartículas, perdiendo su morfología original. Este proceso es artificial, ya que en el organismo las plaquetas liberan una reducida cantidad de micropartículas al activarse, sin alterarse su estructura y función. Es por este motivo, que el aumento en la exposición de PS y la reducción de FSC son progresivamente mayores con el tiempo.

#### 2.2.3.1 Delfines mulares (*Tursiops truncatus*)

Para obtener los valores de referencia de la exposición de la PS y producción de MPPs en delfines bajo cuidado humano sanos, analizamos las muestras de 11 animales del Oceanográfico. A continuación, mostramos los resultados obtenidos en la población y su desglose por sexo o edad (Tabla 30).

| Grupos                                  | Pendiente FSC                      | Ratio entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF Anexina-V en los puntos final y basal | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto final y basal (FAU) | Pendiente Anexina-V desde el pico al punto final |
|---|------------------------------------|--|--|--|--|--|
| Delfines bajo cuidado humano (BCH) n=11 | -18,5±1,5<br>(min:-27;<br>max:-12) | 41,7±15,6<br>(min:1,5;<br>max:182)                       | 19,5±5(min:1,<br>6; max:51)                              | 23932±2876<br>(min:11271;<br>max:41804)              | 16809±1326<br>(min:8601;<br>max:23384)                       | 13±5,6<br>(min:-38;<br>max: 33)                  |
| Crías BCH n=3                           | -15±1,8                            | 77±35  | 35±15  | 25890±4885   | 19316±1170   | 25±8   |
| Adultos BCH n=11                        | -19±1,3                            | 23,7±5,6   | 23,5±5   | 20835±2124   | 19322±1666   | 22,5±3   |
| Crías BCH VS Adultos BCH                | NDS                                | p=0,02*  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |
| Machos BCH n=5                          | -17,8±1,5                          | 57±23  | 28±9   | 24378±2808   | 19116±814  | 23±4,6   |
| Hembras BCH n=9                         | -16,7±1,4                          | 23±7   | 25±6   | 20552±2622   | 19434±2042   | 23±4   |
| Machos BCH VS Hembras BCH               | NDS                                | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |

Tabla 30. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en delfines bajo cuidado humano. Se observaron diferencias significativas entre crías y adultos en el aumento de exposición de PS tras la estimulación con ionóforo de calcio A23187 ( $p \leq 0,05^*$ ) (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### 2.2.3.2 Belugas (*Delphinapterus leucas*)

Se analizaron 11 muestras totales de las tres belugas del Oceanográfico (3 de la cría, 5 de la hembra y 3 del macho adulto). Los individuos adultos presentaron una formación de MPPs más rápida que la cría tras la estimulación de las plaquetas (Tabla 31).

| Grupos           | Pendiente FSC                    | Ratio entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF Anexina-V en los puntos final y basal | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto final y basal (FAU) | Pendiente Anexina-V desde el pico al punto final |
|------------------|----------------------------------|--|--|--|--|--|
| Belugas n=3      | -12±0,5<br>(min:-14;<br>max: -9) | 63±14(<br>min:3,3;<br>max:163)                           | 29,5±4<br>(min:15;<br>max:60)                            | 24055±3335<br>(min:1142;<br>max:42076)               | 12248±1190<br>(min:5289;<br>max:17256)                       | -2±5<br>(min:-25;<br>max:26)                     |
| Adultos n=2      | -13,00 ± 0,3                     | 74,16 ± 17,7   | 32,93 ± 5  | 27367 ± 3241   | 13343 ± 1317   | -4,3 ± 5,6                                       |
| Cría n=1         | -9,667 ± 0,3                     | 33,44 ± 15   | 20,64 ± 3,7  | 15224 ± 7083   | 9329 ± 1915  | 4,333 ± 11                                       |
| Cría vs Adultos  | p=0,0003***                      | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |
| Machos n=2       | -11,50 ± 0,8                     | 47,41 ± 13,5   | 28,72 ± 4,7  | 20608 ± 5456   | 12380 ± 1696   | 4,5 ± 6,2  |
| Hembra n=1       | -12,80 ± 0,5                     | 81,83 ± 26,3   | 30,61 ± 7,6  | 28191 ± 2840   | 12090 ± 1841   | -9,8 ± 7   |
| Machos vs hembra | NDS                              | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |

Tabla 31. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en belugas bajo cuidado humano. Se observaron diferencias significativas entre crías y adultos la velocidad de disminución de la señal FSC tras la estimulación con ionóforo de calcio A23187 ( $p=0,0003***$ ) (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### 2.2.3.3 Morsas (*Odobenus Rosmarus*)

Se estudiaron 4 muestras de cada morsa en diferentes días, obteniendo un total de doce muestras de esta especie. La tres eran hembras de la misma edad. Los resultados obtenidos para cada parámetro de exposición de PS y liberación de MPPs se muestran en la Tabla 32.

| Grupos        | Pendiente FSC                  | Ratio entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF Anexina-V en los puntos final y basal | Delta entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto final y basal (FAU) | Pendiente Anexina-V desde el pico al punto final |
|---------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|
| Morsas<br>n=3 | -11,6±0,7<br>(min:-15; max:-7) | 71,7±17,5<br>(min:13; max:226)                           | 39,7±4<br>(min:13; max:67)                               | 26019±3171<br>(min:11247; max:41778)                           | 18320,5±2622<br>(min:9021; max:37630)                        | 14,6±7,8<br>(min:-25; max:51)                    |

Tabla 32. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en morsas bajo cuidado humano.

### **2.2.3.4 Leones marinos (*Otaria flavescens*).**

En este caso, únicamente se analizaron 4 muestras de 4 individuos adultos del Oceanogràfic y Mundomar. La media de los resultados obtenidos para cada parámetro en la población se detalla en la Tabla 33. Estos datos deben tomarse con cautela, debido al reducido tamaño muestral.

| Grupos             | Pendiente FSC                  | Ratio entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF Anexina-V en los puntos final y basal | Delta entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto final y basal (FAU) | Pendiente Anexina-V desde el pico al punto final |
|--------------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|
| Leones marinos n=4 | -18,7±3<br>(min: -27; max:-14) | 22±8 (min:5; max: 43)                                    | 30±9<br>(min:7; max:46)                                  | 14005±1976<br>(min:9664; max:17883)                            | 20344±3980<br>(min:15431; max:32149)                         | 31,75±10<br>(min:18; max: 62)                    |

Tabla 33. Rango de valores fisiológicos para cada parámetro de exposición de PS en leones marinos bajo cuidado humano.

### **2.2.3.5 Focas comunes (*Phoca vitulina*)**

Dada la dificultad en la obtención de muestras en focas, en esta especie se puso a punto la técnica pero no se obtuvieron datos en individuos sanos en más de un animal.

### 2.2.4 Diferencias en la expresión de fosfatidilserina y liberación de micropartículas entre mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.

Las diferencias observadas en la expresión de PS y liberación de MPPs entre las diferentes especies de mamíferos marinos se detallan en la Tabla 34. Los leones marinos y las focas quedan excluidos de la comparación debido a su reducido tamaño muestral.

| Grupos              | Pendiente FSC                  | Ratio entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF Anexina-V en los puntos final y basal | Delta entre la IMF Anexina-V en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF Anexina-V en el punto final y basal (FAU) | Pendiente Anexina-V desde el pico al punto final |
|---------------------|--------------------------------|--|--|--|--|--|
| Delfines vs Belugas | Delfines> Belugas<br>p≤0,01 ** | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |
| Delfines vs Morsas  | Delfines> Morsas<br>p≤0,01 **  | NDS  | Morsas > Delfines<br>p≤0,01 **                           | NDS  | NDS  | NDS  |
| Belugas vs Morsas   | NDS                            | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  | NDS  |

Tabla 34. Comparación por pares en la expresión de PS y producción de MPPs entre las diferentes especies bajo cuidado humano (ANOVA)(NDS: p≥0,05).

Los delfines presentaron una formación de MPPs más rápida que las belugas y las morsas, dada por la velocidad a la que la señal FSC de los eventos disminuía en el tiempo. Por otro lado, las morsas llegaron a exponer una concentración de PS a punto final significativamente superior a los delfines (dado por el ratio entre la IMF de la Anexina-V entre el punto final y basal).

Puesto que este es el primer estudio sobre la formación de MPPs en mamíferos marinos, no existe bibliografía previa con la que discutir estos hallazgos.

### 2.2.5 Fracción de plaquetas inmaduras (FPI) en animales sanos.

Los niveles de plaquetas reticuladas en sangre se emplean para cuantificar la fracción de plaquetas inmaduras (FPI). Este valor indica el porcentaje de plaquetas inmaduras respecto al total de plaquetas. La adaptación de este protocolo a mamíferos marinos es un resultado en sí mismo. A continuación, mostramos los resultados obtenidos en las diferentes especies bajo estudio para este parámetro.

#### 2.2.5.1 Delfines mulares (*Tursiops truncatus*)

Se han obtenido muestras de delfines bajo cuidado humano (del Oceanogràfic de Valencia) y de delfines salvajes de la Bahía de Sarasota.

Para evaluar el FPI fisiológico en delfines sanos bajo cuidado humano se analizaron muestras de 10 animales. No se observaron diferencias estadísticamente significativas según su sexo o edad. Los resultados se detallan en la Tabla 35.

| Grupos  | Fracción de plaquetas inmaduras (FPI) |
|---|---------------------------------------|
| <b>Delfines bajo cuidado humano n=10</b>                  | <b>5,3±0,3 (min:3,8; max:6,5)</b>     |
| Crías bajo cuidado humano n=3                             | 5,1±0,7                               |
| Adultos bajo cuidado humano n=7                           | 5,3±0,27                              |
| Crías bajo cuidado humano VS Adultos bajo cuidado humano  | NDS                                   |
| Machos bajo cuidado humano n=5                            | 5,2±0,5                               |
| Hembras bajo cuidado humano n=5                           | 5,3±0,3                               |
| Machos bajo cuidado humano VS Hembras bajo cuidado humano | NDS                                   |

Tabla 35. Rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en delfines sanos bajo cuidado humano (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

Por otro lado, se analizaron muestras de 16 delfines salvajes sanos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas según su sexo o edad. Los resultados se detallan en la Tabla 36.

| Grupos                              | Fracción de plaquetas inmaduras (FPI) |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Delfines salvajes n=16              | 3,6±0,4 (min:1,4; max:6,3)            |
| Crías salvajes n=5                  | 4,3±0,8 %                             |
| Adultos salvajes n=11               | 3,2±0,5 %                             |
| Crías salvajes VS Adultos salvajes  | NDS                                   |
| Machos salvajes n=7                 | 3,6±0,7 %                             |
| Hembras salvajes n=9                | 3,6±0,5 %                             |
| Machos salvajes VS Hembras salvajes | NDS                                   |

Tabla 36. Rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en delfines salvajes sanos (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

Los delfines bajo cuidado humano presentaron un porcentaje de plaquetas inmaduras basal significativamente mayor al de los delfines salvajes (Figura 61).

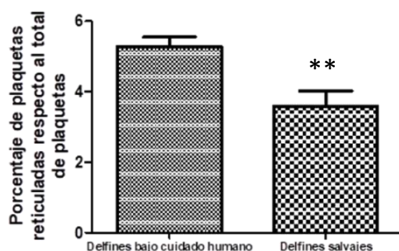


Figura 61. Los delfines bajo cuidado humano mostraron un porcentaje de plaquetas reticuladas basal significativamente superior a los delfines salvajes ( $p=0,0093^{**}$ ).

En humanos, el rango normal de %FPI varía según el laboratorio de análisis que consultemos, pero existe consenso en que suele oscilar entre un 1% y un 7% en individuos sanos (Cambiazzo, 2017). Teniendo en cuenta estos valores, y si ocurre de forma similar en delfines, tanto los animales salvajes como los que se encuentran bajo cuidado humano entrarían dentro de la normalidad.



Aumentos en los niveles de plaquetas inmaduras se relacionan con el aumento de consumo de estas y su posterior recuperación por parte de la médula, y la disminución en sus niveles puede indicar la presencia de trombocitopenias de origen central.

#### **2.2.5.2 Belugas (*Delphinapterus leucas*), morsas (*Odobenus rosmarus*), leones marinos (*Otaria flavescens*) y focas (*Phoca vitulina*).**

En estas especies el protocolo se puso a punto exitosamente, sin embargo, el tamaño muestral obtenido fue muy reducido, por lo que no se pudo extraer un rango de valores de referencia. Sin embargo, la adaptación de la técnica amplía las posibilidades en el control sanitario de estas especies. En la Tabla 37 se muestran los resultados preliminares obtenidos en belugas, leones marinos y morsas.

| Grupo              | Fracción de plaquetas inmaduras (FPI) |
|--------------------|---------------------------------------|
| Belugas n=2        | 1,5±0,3                               |
| Leones marinos n=2 | 2,95±0,05                             |
| Morsas n=1         | 2,7                                   |

Tabla 37. Estudio piloto del rango de porcentajes de plaquetas reticuladas respecto al total de plaquetas en belugas, leones marinos y morsas.

#### ***2.2.4 Diferencias entre la fracción de plaquetas inmaduras (%FPI) de mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies.***

A continuación, como estudio preliminar, se detallan las diferencias por especies en los niveles fisiológicos de plaquetas inmaduras en animales sanos (Tabla 38), siempre teniendo en cuenta que el tamaño muestral de las belugas y los pinnípedos es escaso y debería ampliarse para obtener resultados más fiables.

El porcentaje basal de plaquetas inmaduras fue significativamente superior en delfines que en el resto de las especies y significativamente mayor en leones marinos que en belugas.

| FPI                             | Delfines<br>(5,3±0,3 %) | Belugas<br>(1,5±0,3 %)             | Morsas<br>(2,7%)                  | Leones marinos<br>(2,95±0,05 %)   |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Delfines<br>(5,3±0,3 %)         | -                       | p=0,0002<br>***<br>Delines>Belugas | p=0,0022<br>**<br>Delines>Belugas | p=0,0042<br>**<br>Delines>Belugas |
| Belugas<br>(1,5±0,3 %)          | -                       | -                                  | NDS                               | p=0,04<br>*<br>Leones>Belugas     |
| Morsas<br>(2,7%)                | -                       | -                                  | -                                 | NDS                               |
| Leones marinos<br>(2,95±0,05 %) | -                       | -                                  | -                                 | -                                 |

Tabla 38. Diferencias entre el %FPI de mamíferos marinos bajo cuidado humano de diferentes especies. Los delfines mostraron un %FPI significativamente mayor al del resto de las especies. Los leones marinos mostraron un %FPI significativamente mayor al de las belugas. En el resto de comparaciones estadísticas no se observaron diferencias significativas (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

### 3. Efectos del estrés en la función inmunitaria y plaquetaria de los delfines.

Como se ha comentado en la Introducción, tanto el estrés agudo como el crónico pueden desencadenar alteraciones de la función del sistema inmunitario y la función plaquetaria en mamíferos. En esta tesis evaluamos si alguno de los delfines del Oceanogràfic sufría estrés crónico y en su caso, si existían alteraciones en la funcionalidad de sus leucocitos o plaquetas con respecto a las de sus compañeros.

Para ello, llevamos a cabo un estudio etológico de los individuos y evaluamos si los animales más susceptibles al estrés mostraban diferentes capacidad fagocítica o activación plaquetaria a la media de la población.

#### 3.1 Estudio etológico.

Según el estudio de su comportamiento, los animales más nerviosos, con una menor estabilidad social en el grupo y con reacciones más alarmistas ante los cambios fueron los

siguientes: Apolo, Pfizer, Kuni, Nico y Billy. Por otro lado, los delfines más estables socialmente, sosegados y tranquilos, se correspondieron precisamente con los individuos más dominantes del grupo: Josué, Grisell y Elly.

## **3.2 Relación entre el estrés crónico y la función fagocítica y plaquetaria de los animales.**

Tomamos la mediana ( $\pm$ SEM) de los valores de capacidad fagocítica (como medida de la inmunocompetencia) y de movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  intraplaquetario (como medida de funcionalidad plaquetaria) de cada uno de los animales. Posteriormente evaluamos si existían diferencias significativas entre los animales más estresables y los animales más estables.

### **3.2.1 Relación entre el estrés crónico y la función fagocítica en delfines.**

Los animales fueron ordenados de menor a mayor nivel de inmunocompetencia, en función a dos parámetros: capacidad de ingestión del patógeno por parte de las células fagocíticas y capacidad de destrucción del patógeno mediante el *burst* oxidativo (Tabla 39).

Observamos una relación inversa gradual entre el estrés crónico y la capacidad de ingestión del patógeno por parte de las células fagocíticas de los animales. Los delfines más susceptibles al estrés presentaron una menor capacidad fagocítica que el resto de animales, mientras que los animales más estables socialmente presentaron los valores de inmunocompetencia más elevados.

Sin embargo, parecen existir dos excepciones: Venus y Nala. En el caso de Venus, se trata de uno de los animales más estresables, sin embargo, sí que es un animal cauteloso y sumiso, lejos de ser uno de los animales dominantes del grupo. Sería interesante estudiar en mayor profundidad a este individuo. En cuanto a Nala, como se detallará en el apartado 4, es una delfina con infección respiratoria fúngica crónica, lo que ha producido que presente de forma habitual valores de función fagocítica superiores a la media de la población. Es por ello que encabeza la lista de capacidad fagocítica. Además, se trata de un animal bastante estable socialmente.

| % de células fagocíticas que<br>ingirieron la <i>E.coli</i> |               | % de células fagocíticas que<br>produjeron el <i>burst</i> oxidativo |               |
|---|---------------|--|---------------|
| ANIMALES  | (mediana±SEM) | ANIMALES   | (mediana±SEM) |
| NICO  | 44±0,001      | NALA   | 10±0,01       |
| VENUS   | 50±4          | VENUS  | 14±1,37       |
| APOLO   | 51±0,001      | BILLY  | 30±0,01       |
| PFIZZER   | 52,5±0,03     | ELLY   | 33±0,01       |
| KUNI  | 53±3          | PFIZZER  | 36,5±0,01     |
| BILLY   | 54±6          | LAZO   | 38±8,7        |
| LEIA  | 55±2          | GRISELL  | 40±7,35       |
| NIKA  | 56±3          | JOSUE  | 40,4±5,5      |
| NEPTUNO   | 56±2          | NEPTUNO  | 43,2±3,7      |
| LAZO  | 59±4          | LEIA   | 43,7±0,01     |
| VIRKIN  | 60±5          | NIKA   | 45±4,9        |
| GRISELL   | 61±4          | APOLO  | 48±0,01       |
| JOSUE   | 61,5±0,03     | VIRKIN   | 48,6±3,5      |
| ELLY  | 63±2          |  |               |
| NALA  | 70±2          |  |               |

Tabla 39. Orden de los animales según dos parámetros de inmunocompetencia: capacidad de ingestión y destrucción del patógeno. Los animales más estresables aparecen marcados en naranja y los animales más estables, en verde.

Empleando ANOVA, no encontramos diferencias significativas entre la capacidad fagocítica de los animales, ya que las diferencias entre un individuo y el siguiente de la lista son pequeñas, sin embargo, si comparamos los valores de capacidad de ingestión del patógeno de los animales más y menos inmunocompetentes (Nico y Elly), las diferencias son muy significativas (Figura 62). Además, las diferencias entre el conjunto de valores de los animales con más estrés (Apolo, Pfizer, Kuni, Nico y Billy) y el de los animales más estables (Josué, Elly y Grisell) son todavía más significativas (Figura 62). Por el contrario, la capacidad para generar el estallido respiratorio por parte de las células fagocíticas no pareció tener una relación directa con la susceptibilidad al estrés de los animales (Tabla 39).

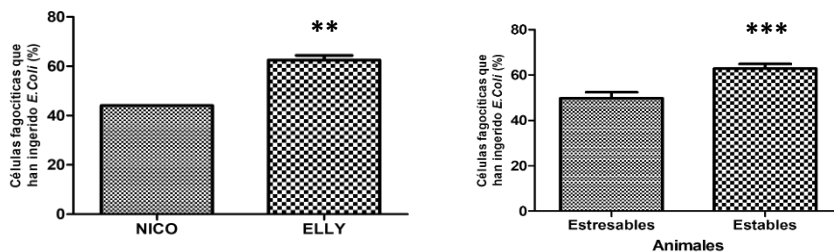


Figura 62. Nico, el animal menos inmunocompetente, perteneciente al grupo de los animales más estresables, presentó una mediana de células fagocíticas capaces de ingerir al patógeno significativamente inferior a la que presentó Elly, el animal sano más inmunocompetente, perteneciente al grupo de los delfines dominantes ( $p=0,0026^{**}$ ). En su conjunto, los animales menos estresables presentaron una mayor capacidad fagocítica (ingestión del patógeno) que los animales más estresables ( $p=0,0006^{***}$ ).

El efecto del estrés crónico sobre la función inmunitaria en delfines, concuerda con el observado en otras especies, como la humana. Como hemos detallado en la Introducción, los procesos de estrés producen incrementos en los niveles de glucocorticoides y catecolaminas en sangre. Estas moléculas se unen a sus receptores específicos leucocitarios, alterando la producción de citoquinas e inhibiendo la maduración y movilización celular. Concretamente, los glucocorticoides actúan sobre los órganos linfoides primarios y secundarios, linfocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos, que presentan receptores para glucocorticoides tipo II en su citoplasma. Cuando el cortisol se une al receptor, este se trasloca al núcleo de la célula, donde altera la producción de numerosas proteínas, entre las que se encuentran el interferón gamma ( $IFN\gamma$ ), las interleucinas IL-1, IL-2 e IL-6 o el factor de necrosis tumoral ( $TNF\alpha$ ), esenciales para una correcta respuesta inmunitaria (Gómez-González y Escobar, 2006).

### 3.2.2 Relación entre el estrés crónico y la función plaquetaria en delfines.

Empleamos el valor del aumento máximo de calcio citosólico en las plaquetas tras su activación con ADP como medida de la funcionalidad plaquetaria. En la Tabla 40 se muestran las medianas ( $\pm$ SEM) de los valores obtenidos en cada animal, ordenados de menor a mayor. De nuevo, se destacan los animales más susceptibles al estrés y los más estables desde el punto de vista del comportamiento.

| ANIMALES | Aumento máximo de concentración de calcio citosólico (mediana±SEM) |
|----------|--|
| PFIZZER  | 1,885±0,5  |
| LAZO     | 2,61±0,37  |
| BILLY    | 2,705±0,01   |
| NICO     | 2,775±1  |
| KUNI     | 3,12±0,4   |
| VENUS    | 3,175±0,54   |
| NEPTUNO  | 3,2±0,42   |
| VIRKIN   | 3,335±0,56   |
| NIKA     | 3,45±0,4   |
| NALA     | 3,815±0,32   |
| APOLO    | 4,1±0,76   |
| JOSUE    | 4,29±1   |
| GRISELL  | 4,31±0,74  |
| ELLY     | 5,305±0,4  |
| LEIA     | 5,57±0,67  |

Tabla 40. Orden de los animales según su capacidad para movilizar el calcio plaquetario tras su estimulación con ADP. En naranja, los animales más estresables, en verde los más estables.

Los animales con más estrés presentan una menor liberación de  $Ca^{2+}$  en las plaquetas que los animales más estables, que presentan valores superiores a la media de la especie (Tabla 40 y Figura 63). El caso de Apolo es explicable, ya que, como se detallará en el apartado 4 de esta tesis, este animal sufrió estrés agudo en numerosas ocasiones, acompañándose de gastritis ulcerativa o disputas con otros animales. Los casos de Lazo y de Leia deberían estudiarse más a fondo, ya que ambos son animales bastante estables en el grupo, sin ser los animales más tranquilos o dominantes de la población. En definitiva, parece que el estrés crónico también afecta a la función plaquetaria de los delfines.

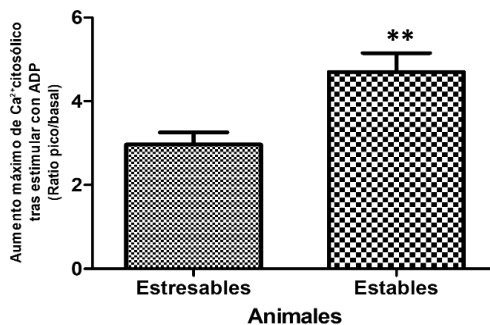


Figura 63. En su conjunto, los animales más estables comportamentalmente (menos estresables) presentaron una mayor capacidad para activar las plaquetas que los animales más estresables ( $p=0,003^{**}$ ).

Tanto el estrés agudo como el crónico se relacionan con aumentos en la activación plaquetaria. En el caso del estrés agudo, como sabemos, la adrenalina juega un papel fundamental, produciendo una mayor movilización de calcio intraplaquetario como consecuencia de la inhibición del AMPc en la plaqueta (Alarayed et al., 1997; Zoccarato et al., 1991). El estrés crónico parece generar una mayor agregación plaquetaria en mamíferos

como humanos y ratones, sin embargo, este proceso se produce mediante otras vías, de forma independiente al aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico en la plaqueta (Matsuhisa F et al., 2014; Koudouovoh-Tripp P et al., 2020 ), por lo que, en este caso no observamos un aumento en dicho parámetro en los animales más estresables. Curiosamente, observamos la tendencia contraria, y sería conveniente profundizar más en este campo de estudio, empleando también técnicas como la agregometría.

#### **4. Evaluación de la función inmunitaria y plaquetaria en animales enfermos. Casos clínicos.**

Como prueba de concepto de la eficacia de las técnicas puestas a punto, las hemos aplicado para detectar alteraciones en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria en mamíferos marinos con patologías relevantes para el estudio.

##### **4.1 Nala, delfina con infección fúngica respiratoria recurrente.**

Se trata de una hembra adulta que sufre de forma crónica intermitente infecciones respiratorias por el hongo *Rhizopus microsporus*. Este hongo pertenece a la clase de los Zigomicetos, que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. El modo más frecuente de infección es por la inhalación de esporas que viajan en el aire. Las primeras barreras defensivas contra los zigomicetos son las mucosas y el endotelio, pudiendo algunas esporas invadirlo. Entonces las células fagocíticas actúan contra el hongo evitando su germinación y la proliferación de las hifas (Arias y Garzón, 2010). Normalmente, las esporas son fácilmente combatidas por las células fagocíticas del hospedador, sin embargo, si la carga de esporas es muy elevada o el animal se encuentra inmunodeprimido, las esporas consiguen desarrollar hifas y producir lesiones en la zona.

A continuación, se presentan los valores de capacidad fagocítica de Nala durante tres episodios diferentes de infección por *Rhizopus microsporus*. En los tres casos, Nala mostró un porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir el patógeno significativamente superior a la media de la población. Además, durante uno de los episodios también mostró un aumento en el porcentaje de células que producían el estallido respiratorio (Figura 64).

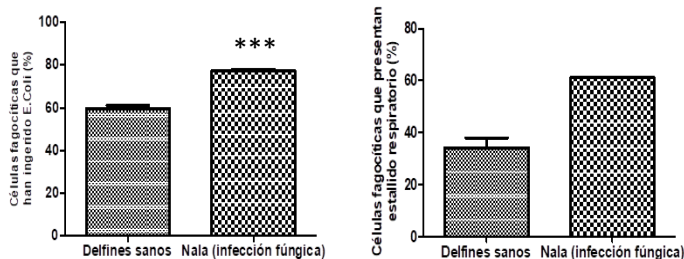


Figura 64. Durante los episodios (ep) de infección fúngica, Nala presentó valores de capacidad de ingestión del patógeno significativamente superiores a la media de la población ( $p < 0,0001^{***}$ ; ep 1:79%; ep 2: 76,6% y ep 3:76% ; media±SEM: 77,2±0,9 %; Delfines sanos: 59,6±1,27 %). Durante uno de esos episodios, también presentó una capacidad para generar el estallido respiratorio superior a la media de la población (Nala: 61%; Delfines sanos: 34,2±3,6 %).

## 4.2 Pfizer, animal con inmunodepresión y posterior cuadro digestivo por levaduras.

Tras realizar uno de los muestreos rutinarios en los animales, observamos que tanto la capacidad de ingestión como la de producción del estallido respiratorio de las células fagocíticas de Pfizer se encontraban por debajo de la media de la población sana (Figura 65). Aparentemente el animal se encontraba bien y no existía ningún indicio de enfermedad. Sin embargo, pocos días después Pfizer comenzó a desarrollar un cuadro digestivo cuya sintomatología principal fue la diarrea. El equipo veterinario determinó que la causa parecía ser un problema relacionado con levaduras, que de forma natural forman parte de la flora intestinal.

La inmunodepresión se ha descrito como uno de los factores clave en el desequilibrio de la flora intestinal, pudiendo desencadenar entre otras cosas un sobrecrecimiento de levaduras que se acompañe de un cuadro digestivo. En este caso, el hallazgo de la capacidad fagocítica mermada, (posiblemente debido a algún agente estresante), precedió a la aparición de la sintomatología, demostrando la utilidad de esta prueba en la mejora de la medicina preventiva de los acuarios.



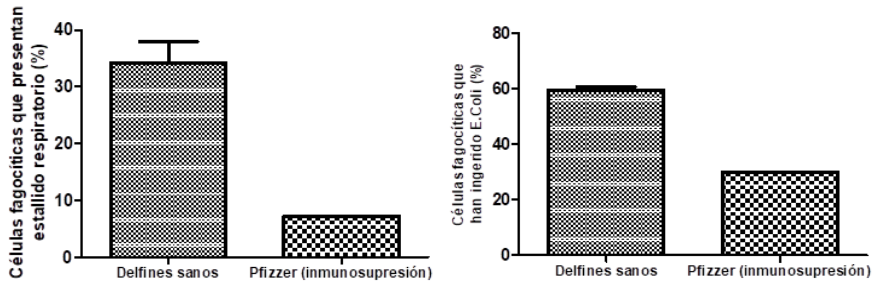


Figura 65. Pfizer presentó una capacidad fagocítica inferior a la de la media de la población sana días antes de comenzar con un cuadro digestivo. Este efecto se observó tanto en la capacidad de ingestión (Pfizer: 30 %; Delfines sanos: 59,6±1,27 %) como en la de destrucción del patógeno (Pfizer: 7,2 %; Delfines sanos: 34,2±3,6 %).

### 4.3 Kuni, cría de delfín diagnosticada de cistitis hemorrágica.

Este delfín había sido diagnosticado de cistitis hemorrágica días antes a la toma de muestras para nuestro estudio. Se encontraba apático y sin apetito. El equipo de veterinarios sospechaba que el origen de la afección era fúngico, por lo que trató al animal con un antifúngico (Terbinafina), con acetato de megestrol para aumentar su apetito y con Canine Cystaid, un suplemento nutricional que contiene N-acetil D-glucosamina, que ayuda a renovar y mantener la capa de glucosaminoglicanos que reviste y protege la mucosa de la vejiga. El animal aún no se había recuperado por completo en el momento del muestreo.

Al evaluar su capacidad fagocítica observamos que sus células fagocíticas se encontraban más reactivas que en condiciones normales, presentando un porcentaje de células que fagocitan el patógeno superior al de la media de la población (Figura 66).

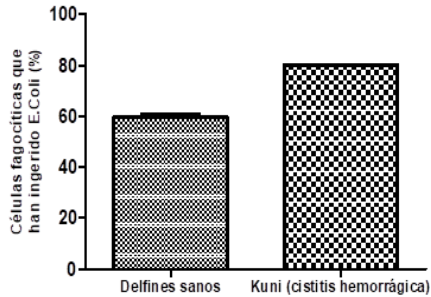


Figura 66. Durante el episodio de cistitis hemorrágica, las células fagocíticas de Kuni presentaron una capacidad de ingestión del patógeno superior a la media de la población (Kuni:80%; Delfines sanos: 59,6±1,27 %)

#### 4.4 Nika, delfina adulta con infección vírica.

Nika presentaba una infección vírica respiratoria. A pesar de que el virus no se identificó, este tipo de infecciones en delfines suelen relacionarse con inmunodepresión. Al evaluar la capacidad fagocítica, observamos una disminución en el porcentaje de células capaces de ingerir el patógeno, respecto a los valores normales de la población (Figura 67).

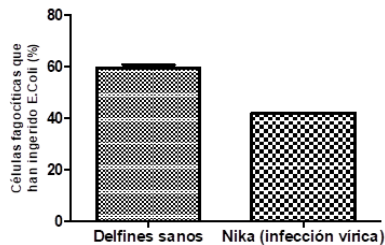


Figura 67. Durante la infección vírica, las células de Nika presentaron una capacidad para ingerir al patógeno inferior a la de la media de la población sana (Nika: 42%; Delfines sanos: 59,6±1,27 %)

#### 4.5 Apolo, delfín adulto con gastritis hemorrágica derivada de estrés crónico.

Como hemos detallado en el apartado 3, Apolo es uno de los delfines más susceptibles al estrés de la población. Según la información proporcionada por los entrenadores y veterinarios del acuario, se trata de un delfín que sufre constantes conflictos en el grupo debido a su baja posición en la escala jerárquica. Esto conlleva que sufra gastritis hemorrágicas recurrentes derivadas del estrés. De hecho, en humanos y otras especies es una de las principales patologías derivadas del estrés crónico (Mucio-Ramírez, 2007; Barrio et al., 2006).

Durante uno de esos episodios de gastritis por estrés, las células fagocíticas de Apolo presentaron una menor capacidad para ingerir al patógeno (Figura 68). Este efecto no es sorprendente, ya que el estrés está íntimamente relacionado con la inmunodepresión. El estallido respiratorio se observó solo en el 10% de los fagocitos, quedando en el rango inferior de los animales sanos pero muy lejos de la media de la población.

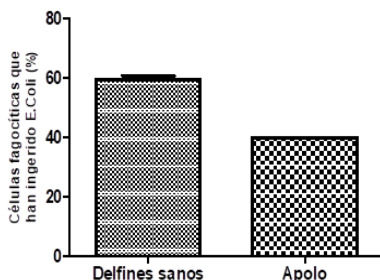


Figura 68. Durante el episodio de gastritis y estrés, las células de Apolo presentaron una capacidad para ingerir al patógeno inferior a la media de la población (Apolo:40%; Delfines sanos: 59,6±1,27 %).

Por otro lado, sus leucocitos presentaban una hiperpolarización de la membrana mitocondrial (Figura 69).

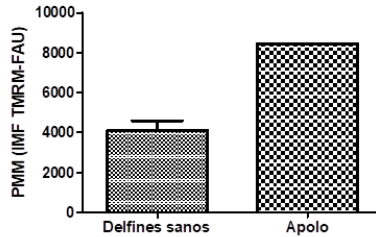


Figura 69. Aumento en el potencial de membrana mitocondrial de los leucocitos de Apolo durante un episodio de gastritis hemorrágica y estrés (Apolo: 8447; Delfines sanos: 4111±478,7).

Como hemos detallado anteriormente, en algunas ocasiones, el estrés puede conllevar aumentos en el potencial de membrana mitocondrial (Kikusato M y Toyomizu M, 2013). En este caso, también podría deberse al mayor requerimiento energético por parte de los leucocitos durante la gastritis hemorrágica, que supone inflamación de la zona y riesgo de infección.

Por otro lado, también la funcionalidad plaquetaria se vio alterada en este animal. La mayoría de los días en que fue muestreado, Apolo presentó valores de activación plaquetaria superiores a la media de la población. Estos hallazgos coincidieron sobre todo con periodos de disputas sociales con otros machos o con el padecimiento de gastritis hemorrágicas derivadas del estrés.

Específicamente, el animal presentó aumentos en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los reservorios internos de las plaquetas hacia el citosol al estimularlas con ADP (ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos máximo y basal). En la Tabla 41 se muestran los valores obtenidos en tres días diferentes en los que Apolo presentó diversas afecciones.

| Día  | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Lesiones o patologías que presentaba el animal  |
|--|---|---|
| <b>Valor de referencia de delfines bajo cuidado humano</b> | <b>3,4±0,2<br/>(min:1,8; max:4,2)</b>                     | <b>Ninguno (delfines sanos)</b>                 |
| <b>Apolo 14/01/2019</b>                                    | 4,02  | Herida por mordedura de otro animal días antes. |
| <b>Apolo 20/05/2019</b>                                    | 5,3   | Gastritis hemorrágica aguda                     |
| <b>Apolo 11/09/2019</b>                                    | 4,2   | Gastritis hemorrágica en recuperación           |

Tabla 41. Durante episodios de picos de estrés acompañados de gastritis o disputas con otros delfines, Apolo presentó niveles de activación plaquetaria (movilización de calcio intraplaquetario hacia el citosol) superiores a la media de la población.

En los tres casos, el animal sufrió hemorragias leves y estrés agudo. Ambos factores pueden producir una mayor activación de las plaquetas.

Durante la hemorragia, la liberación de TNF- $\alpha$  se suprime, citoquina capaz de reducir el aumento de calcio citosólico tras la activación de las plaquetas (Bahrami et al., 2017; Bonfitto et al 2018).

Considerando el estrés como posible causa de activación plaquetaria, se ha descrito que personas que sufren depresión o desórdenes afectivos muestran un mayor aumento de calcio citosólico durante la activación de las plaquetas que las personas sanas (Dubovsky et al., 1989). Además, la epinefrina y norepinefrina liberadas durante el estrés aumentan la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en las plaquetas (Mikuni et al., 1991).

#### 4.6 Patrick, león marino con enteritis hemorrágica por cuerpo extraño.

Patrick ingirió accidentalmente un cuerpo extraño, lo que desencadenó una enteritis hemorrágica crónica. Durante el proceso, extrajimos muestras de sangre del animal y observamos que sus plaquetas presentaban una concentración de calcio citosólico en reposo superior a la observada en los individuos sanos (Figura 70), lo que podría indicar una mayor actividad de las plaquetas como respuesta a la hemorragia que estaba padeciendo o incluso al estrés. Al estimularlas, presentaron una mayor liberación de calcio desde los reservorios al citosol (delta entre la IMF de Fluo-4 en los puntos máximo y basal) y aparentemente, una recuperación posterior más paulatina (Figura 70).

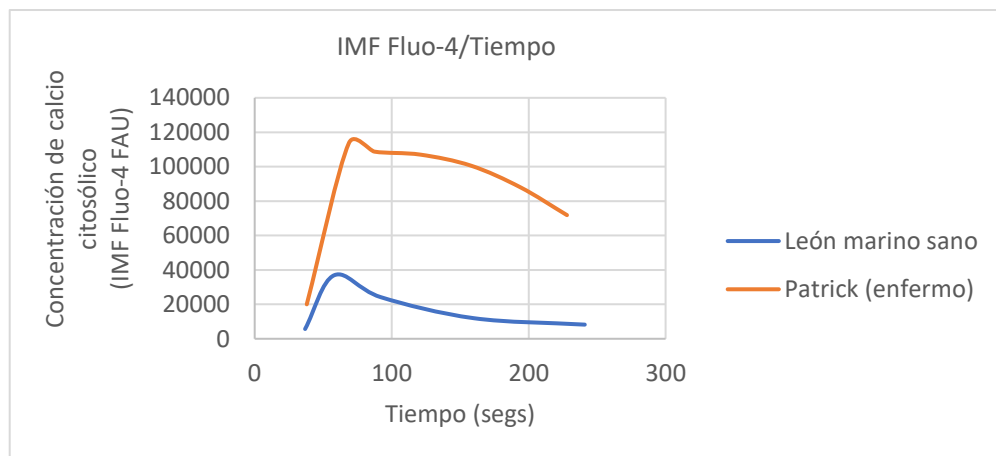


Figura 70. Curva de calcio citosólico frente al tiempo al activar las plaquetas en un león marino sano (azul) y en Patrick mientras padecía el proceso de enteritis hemorrágica (naranja). Observamos concentraciones de calcio superiores a los animales sanos en todo momento y una menor velocidad de recuperación del calcio citosólico hacia sus reservorios.

En concreto, Patrick mostró unos mayores ratio y delta entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal que los leones marinos sanos (Tabla 42). Esto se debió a que, a pesar de que en todo momento Patrick presentó niveles de calcio citosólico en la plaqueta superiores a los de los leones marinos sanos, la diferencia entre ambos grupos en la concentración de calcio final fue proporcionalmente mayor a la diferencia entre la concentración basal (Tabla 43). Es decir, las plaquetas de Patrick presentaron una menor recaptación del calcio hacia los reservorios

intra plaquetarios que las de los animales sanos tras la activación.

| Grupos   | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal | Ratio entre la IMF del Fluo-4 en los puntos final y basal | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal (FAU) | Delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto final y basal (FAU) | Pendiente de la recta desde el pico al punto final |
|--|---|---|---|---|--|
| Leones marinos bajo cuidado humano n=8         | 4,6±0,35<br>(min:3,4;<br>max:6,5)                         | 1,6±0,1<br>(min:1,6;<br>max:2,4)                          | 31362±3693<br>(min:15149;<br>max:51589)                         | 5413±1414<br>(min:1666;<br>max:17417)                         | -148±13,26<br>(min:-93;<br>max:-236)               |
| Patrick, león marino con enteritis hemorrágica | 5,6   | 3,6   | 93713   | 51827   | -243   |

Tabla 42. Durante el episodio de enteritis hemorrágica, Patrick presentó un aumento máximo en el calcio citosólico superior al observado en individuos sanos (empleando el delta entre la IMF del Fluo-4 en el punto máximo y basal). Por otro lado, la recuperación del calcio hacia sus reservorios durante el retorno al estado de reposo fue inferior a la detectada en los individuos sanos, a pesar de que la pendiente se encuentra en el límite superior del rango de normalidad.

| Grupos   | IMF Fluo-4 en el punto basal           | IMF Fluo-4 en el pico                        | IMF Fluo-4 en el punto final               |
|--|--|--|--|
| Leones marinos bajo cuidado humano sanos n=8       | 9415±1289<br>(min: 5660;<br>máx:16923) | 42754±5168,15<br>(min: 29852 ;<br>máx:68512) | 15150±2428,5<br>(min: 7326 ;<br>máx:29467) |
| Patrick, león marino con enteritis hemorrágica n=1 | 20000                                  | 113716                                       | 71830                                      |

Tabla 43. Patrick presentó una concentración de calcio citosólico en las plaquetas superior a la media de la población en todos los puntos (basal, pico y final), aunque especialmente en el punto final.

Además, como consecuencia a la pérdida de sangre, Patrick mostró un porcentaje de plaquetas inmaduras cinco veces superior al de sus compañeros (Figura 71).

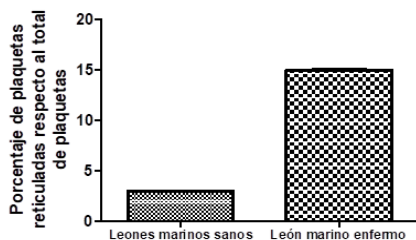


Figura 71. Durante el episodio de hemorragia intestinal, Patrick mostró unos niveles de plaquetas reticuladas superior a la media de la población sana (Patrick: 15%; Leones marinos sanos: 2,95±0,05 %).

#### 4.7 Lazo, delfín con gastritis ulcerativa hemorrágica.

Lazo sufrió una úlcera gástrica que tuvo como consecuencia un leve sangrado. Esta hemorragia produjo un incremento en el porcentaje de plaquetas inmaduras en sangre con respecto a la media de la población sana (Figura 72).

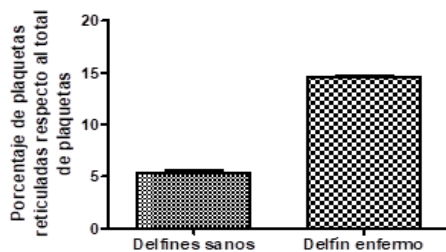


Figura 72. Durante el episodio de gastritis ulcerativa con hemorragia, Lazo presentó más del doble de plaquetas reticuladas en sangre que los delfines sanos (Lazo: 14,6%; Delfines sanos: 5,3±0,3 % ,min:3,8; max:6,5).



#### **4.8 Delfín salvaje varado enfermo en la costa valenciana.**

En abril del 2018 varó un delfín salvaje en la costa de Valencia. El animal se encontraba en un estado de salud muy delicado y finalmente tuvo que ser eutanasiado, no sin antes extraer muestras de sangre para la evaluación de su funcionalidad inmunitaria y plaquetaria. El aumento máximo de calcio citosólico que presentaron las plaquetas del animal tras ser estimuladas con ADP fue muy inferior a la media de la población de delfines sanos. En concreto, el ratio entre la IMF del Fluo-4 en el pico y el punto basal fue de 1,7, siendo la media de la población  $3,4 \pm 0,2$ .

### **5. Efectos *in vitro* de los contaminantes ambientales sobre la función inmunitaria y plaquetaria de delfines mulares.**

Primero realizamos un estudio toxicológico de la sangre, plasma y tejidos de delfines salvajes, para comprobar a qué contaminantes están expuestos en el mar y seleccionar los de mayor interés para el estudio. Posteriormente, llevamos a cabo los estudios *in vitro* de funcionalidad inmunitaria y plaquetaria tras exponer las células de los animales a los compuestos seleccionados.

#### **5.1 Detección de contaminantes en diferentes matrices de delfines.**

##### **5.1.1 Detección de compuestos de uso humano en tejidos de delfín.**

Como prueba de concepto, empleamos muestras de hígado y riñón de un delfín varado para estudiar la presencia/ ausencia de ciertos compuestos de uso humano de interés para el estudio. En la Tabla 44 mostramos los datos obtenidos. El animal presentó niveles detectables de cafeína, aspirina, ketoprofeno e ibuprofeno en sus tejidos. En el caso del paracetamol, se produjeron problemas con los estándares y no podemos aportar datos en esta tesis, aunque el estudio continúa su curso con muestras de más animales.

|        | Cafeína ( $\mu\text{M}$ ) | Aspirina ( $\mu\text{M}$ ) | Ketoprofeno ( $\mu\text{M}$ ) | Ibuprofeno ( $\mu\text{M}$ ) |
|--------|---------------------------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Hígado | 0,0154                    | 0,018                      | 0,002                         | 0,17                         |
| Riñón  | 0,004                     | 0,0009                     | 0,0015                        | 0,015                        |

Tabla 44. Concentración de cafeína, aspirina, ketoprofeno e ibuprofeno en muestras de hígado y riñón de un delfín mular.

Estos hallazgos demuestran que los mamíferos marinos bioacumulan fármacos u otros compuestos de uso humano en sus tejidos mediante la dieta, por lo que estos xenobióticos se encuentran ya integrados en la cadena trófica de los ecosistemas marinos, al menos en las zonas más costeras.

### *5.1.2 Detección de metales pesados en sangre entera o plasma de delfín.*

Se emplearon muestras de sangre y plasma de 16 delfines salvajes de la Bahía de Sarasota y de 14 delfines bajo cuidado humano de dos acuarios españoles diferentes (Oceanogràfic de Valencia y Mundomar). En estas matrices se analizaron metales pesados y diversos fármacos. En este caso, no se detectaron fármacos ni en plasma ni en sangre entera, puesto que la cinética de estos compuestos en la sangre de los organismos vivos es rápida y no son bioacumulables en esta matriz. Los metales pesados que se analizaron fueron los siguientes: Cd, Pb, As, Cu, Zn, Cr, Hg, Na, Mg, P, K, Ca, Fe, Al, Ti, Sr, Ba, Mn, Co, V, Mo, Tl, Ni, U y Be.

A continuación, mostramos las concentraciones de cada compuesto detectadas en sangre o plasma de los diferentes grupos de delfines (Tablas 45, 46, 47). No se detectaron trazas de Mo, Tl, U, Be ni Ni en ninguno de los grupos. Las concentraciones de algunos metales pesados son similares en animales bajo cuidado humano y animales salvajes, como es el caso del Cu, Zn, Na, Mg, P, Ca, Fe, Al, Ti o Ba. Únicamente en el caso del Pb, los delfines bajo cuidado humano presentaron una mayor concentración que los animales salvajes. Para el resto de los metales pesados, los delfines salvajes mostraron una mayor concentración en sangre que los animales en cautividad, siendo estas diferencias más notables en el Hg, presentando los animales salvajes una concentración 10 veces superior a la de los animales bajo cuidado humano, así como el Sr, el Cr o el As, cuya concentración en sangre en delfines salvajes doblaba a la detectada en delfines bajo cuidado humano. En el caso del Cd, este metal no fue detectado en ningún animal en cautividad, pero sí en seis de los animales salvajes. Tampoco todos los individuos de vida libre mostraron Mn, Co o V en esta matriz.

|           | [Cd]<br>sangre | [Pb] sangre | [As] sangre | [Cu] sangre | [Zn] sangre | [Cr] sangre |
|-----------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|           | ng/g           | ng/g        | ng/g        | ng/g        | ng/g        | ng/g        |
| Josué     | 0,00           | 91,42       | 16,27       | 1455,37     | 2922,08     | 0,00        |
| Leia      | 0,00           | 27,16       | 29,50       | 647,80      | 2898,00     | 29,26       |
| Virkin    | 0,00           | 74,49       | 27,33       | 837,71      | 3738,84     | 0,00        |
| Kuni      | 0,00           | 79,40       | 14,73       | 1215,90     | 3552,38     | 17,39       |
| Venus     | 0,00           | 0,00        | 18,58       | 881,26      | 2749,51     | 0,00        |
| Neptuno   | 0,00           | 0,00        | 23,89       | 779,35      | 2563,03     | 0,00        |
| Nika      | 0,00           | 0,00        | 24,18       | 869,76      | 2931,79     | 0,00        |
| Nala      | 0,00           | 29,47       | 30,08       | 782,19      | 2719,08     | 0,00        |
| Pfizer    | 0,00           | 65,04       | 20,64       | 734,84      | 4072,01     | 0,00        |
| Aqua      | 0,00           | 94,91       | 10,97       | 1976,71     | 4208,17     | 18,69       |
| Camino    | 0,00           | 39,86       | 5,74        | 675,58      | 2699,40     | 38,43       |
| Farah     | 0,00           | 72,23       | 10,13       | 704,23      | 2892,61     | 0,00        |
| Maya      | 0,00           | 45,67       | 11,35       | 834,83      | 2284,67     | 11,21       |
| Edu       | 0,00           | 0,00        | 0,00        | 719,22      | 2851,44     | 0,00        |
| PROMEDIO  | 0,00           | 44,26       | 17,38       | 936,77      | 3077,36     | 8,21        |
| STD. DEV. | 0,00           | 35,65       | 9,13        | 371,97      | 579,49      | 12,91       |
| MEDIANA   | 0,00           | 42,76       | 17,42       | 808,51      | 2895,31     | 0,00        |
| MINIMIO   | 0,00           | 0,00        | 0,00        | 647,80      | 2284,67     | 0,00        |
| MÁXIMO    | 0,00           | 94,91       | 30,08       | 1976,71     | 4208,17     | 38,43       |
| 261       | 0,00           | 0,00        | 62,64       | 695,31      | 2585,14     | 0,00        |
| 281       | 0,00           | 0,00        | 34,47       | 1262,82     | 3236,69     | 10,89       |
| 283       | 0,00           | 0,00        | 37,56       | 717,53      | 2341,52     | 0,00        |
| 264       | 0,00           | 0,00        | 35,70       | 680,90      | 2518,28     | 0,00        |
| 266       | 0,00           | 0,00        | 15,24       | 771,43      | 2846,95     | 0,00        |
| 285       | 0,00           | 0,00        | 47,44       | 1278,68     | 2385,07     | 0,00        |
| 316       | 14,09          | 40,67       | 35,36       | 801,44      | 2425,51     | 17,82       |
| 128       | 13,06          | 18,36       | 82,90       | 969,17      | 2124,03     | 42,22       |
| 138       | 14,19          | 88,07       | 29,02       | 842,50      | 3428,79     | 29,52       |
| 221       | 0,00           | 0,00        | 16,27       | 646,98      | 1850,99     | 11,63       |
| 287       | 0,00           | 0,00        | 17,85       | 710,08      | 2769,03     | 0,00        |
| 211       | 13,60          | 28,64       | 71,54       | 806,29      | 2430,27     | 19,40       |
| 238       | 15,50          | 1,08        | 33,39       | 655,16      | 2287,10     | 13,24       |
| 289       | 0,00           | 0,00        | 22,66       | 937,90      | 2595,55     | 17,65       |
| 318       | 0,00           | 0,00        | 16,70       | 630,97      | 4010,47     | 0,00        |
| 291       | 92,40          | 197,00      | 178,81      | 963,38      | 2314,00     | 78,87       |
| PROMEDIO  | 10,18          | 23,36       | 46,10       | 835,66      | 2634,34     | 15,08       |
| STD. DEV. | 22,91          | 52,05       | 40,68       | 202,15      | 535,34      | 21,09       |
| MEDIANA   | 0,00           | 0,00        | 34,91       | 786,44      | 2474,27     | 11,26       |
| MINIMIO   | 0,00           | 0,00        | 15,24       | 630,97      | 1850,99     | 0,00        |
| MÁXIMO    | 92,40          | 197,00      | 178,81      | 1278,68     | 4010,47     | 78,87       |

Tabla 45. Concentraciones de Cd, Pb, As, Cu, Zn y Cr detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.

|                  | [Hg] sangre  | [Na] sangre    | [Mg] sangre  | [P] sangre    | [K] sangre     | [Ca] sangre  | [Fe] sangre   |
|------------------|--------------|----------------|--------------|---------------|----------------|--------------|---------------|
|                  | microg/g     | microg/g       | microg/g     | microg/g      | microg/g       | microg/g     | microg/g      |
| Josué            | 0,048        | 2663,70        | 21,23        | 261,47        | 1444,92        | 35,53        | 470,05        |
| Leia             | 0,034        | 3127,73        | 20,95        | 267,11        | 1464,93        | 38,13        | 441,05        |
| Virkin           | 0,030        | 2596,66        | 24,42        | 259,49        | 1546,02        | 41,01        | 464,58        |
| Kuni             | 0,035        | 2731,71        | 23,77        | 262,45        | 1524,50        | 48,43        | 432,08        |
| Venus            | 0,032        | 2611,80        | 22,91        | 283,56        | 1460,89        | 37,55        | 452,15        |
| Neptuno          | 0,050        | 2701,03        | 21,06        | 257,75        | 1370,78        | 26,74        | 425,06        |
| Nika             | 0,033        | 2511,46        | 19,83        | 273,11        | 1508,13        | 40,01        | 524,27        |
| Nala             | 0,027        | 2756,03        | 23,94        | 251,90        | 1195,99        | 47,69        | 435,29        |
| Pfizer           | 0,040        | 2680,58        | 22,08        | 254,82        | 1417,18        | 46,07        | 455,18        |
| Aqua             | 0,036        | 3101,01        | 18,43        | 255,41        | 1320,22        | 44,45        | 407,41        |
| Camino           | 0,038        | 2954,70        | 21,15        | 304,38        | 1580,12        | 23,45        | 482,43        |
| Farah            | 0,030        | 3044,84        | 23,09        | 293,15        | 1473,04        | 36,21        | 448,75        |
| Maya             | 0,027        | 3129,92        | 22,85        | 291,68        | 1214,08        | 58,73        | 354,54        |
| Edu              | 0,037        | 2653,22        | 22,07        | 255,55        | 1473,68        | 23,85        | 474,37        |
| <b>PROMEDIO</b>  | <b>0,035</b> | <b>2804,60</b> | <b>21,98</b> | <b>269,42</b> | <b>1428,18</b> | <b>39,13</b> | <b>447,66</b> |
| <b>STD. DEV.</b> | <b>0,007</b> | <b>218,60</b>  | <b>1,67</b>  | <b>16,99</b>  | <b>115,78</b>  | <b>9,93</b>  | <b>39,12</b>  |
| <b>MEDIANA</b>   | <b>0,035</b> | <b>2716,37</b> | <b>22,07</b> | <b>261,96</b> | <b>1462,91</b> | <b>39,07</b> | <b>450,45</b> |
| <b>MINIMO</b>    | <b>0,027</b> | <b>2511,46</b> | <b>18,43</b> | <b>251,90</b> | <b>1195,99</b> | <b>23,45</b> | <b>354,54</b> |
| <b>MÁXIMO</b>    | <b>0,050</b> | <b>3129,92</b> | <b>24,42</b> | <b>304,38</b> | <b>1580,12</b> | <b>58,73</b> | <b>524,27</b> |
| 261              | 0,370        | 2867,97        | 33,17        | 339,30        | 1463,25        | 37,28        | 436,91        |
| 281              | 0,068        | 2653,85        | 35,60        | 328,69        | 1244,61        | 31,42        | 451,80        |
| 283              | 0,312        | 2427,66        | 31,17        | 296,68        | 1486,94        | 18,14        | 434,16        |
| 264              | 0,591        | 2377,87        | 32,52        | 288,45        | 1592,66        | 26,30        | 432,05        |
| 266              | 0,405        | 2392,68        | 34,86        | 330,08        | 1570,67        | 24,58        | 455,61        |
| 285              | 0,436        | 2629,62        | 29,97        | 273,06        | 1367,41        | 34,92        | 349,61        |
| 316              | 0,072        | 2455,50        | 31,16        | 265,60        | 1496,52        | 53,00        | 338,54        |
| 128              | 0,511        | 2543,14        | 27,13        | 193,09        | 1347,70        | 35,55        | 273,26        |
| 138              | 0,626        | 2526,77        | 31,14        | 243,89        | 1446,92        | 46,68        | 426,54        |
| 221              | 0,614        | 2389,94        | 26,49        | 236,04        | 1349,26        | 21,58        | 319,64        |
| 287              | 0,079        | 2406,86        | 31,28        | 288,04        | 1525,73        | 34,66        | 473,39        |
| 211              | 0,553        | 2468,35        | 31,95        | 268,86        | 1429,20        | 30,52        | 403,33        |
| 238              | 0,357        | 2516,52        | 26,06        | 284,10        | 1348,14        | 28,73        | 408,52        |
| 289              | 0,064        | 2610,36        | 29,50        | 284,20        | 1390,46        | 40,00        | 422,16        |
| 318              | 0,769        | 2365,01        | 37,20        | 405,61        | 1861,42        | 36,90        | 734,32        |
| 291              | 0,075        | 2964,04        | 36,36        | 239,50        | 1099,20        | 55,71        | 278,00        |
| <b>PROMEDIO</b>  | <b>0,369</b> | <b>2537,26</b> | <b>31,60</b> | <b>285,32</b> | <b>1438,76</b> | <b>34,75</b> | <b>414,87</b> |
| <b>STD. DEV.</b> | <b>0,237</b> | <b>174,68</b>  | <b>3,35</b>  | <b>49,65</b>  | <b>167,06</b>  | <b>10,47</b> | <b>105,82</b> |
| <b>MEDIANA</b>   | <b>0,387</b> | <b>2492,44</b> | <b>31,22</b> | <b>284,15</b> | <b>1438,06</b> | <b>34,79</b> | <b>424,35</b> |
| <b>MINIMO</b>    | <b>0,064</b> | <b>2365,01</b> | <b>26,06</b> | <b>193,09</b> | <b>1099,20</b> | <b>18,14</b> | <b>273,26</b> |
| <b>MÁXIMO</b>    | <b>0,769</b> | <b>2964,04</b> | <b>37,20</b> | <b>405,61</b> | <b>1861,42</b> | <b>55,71</b> | <b>734,32</b> |

Tabla 46. Concentraciones de Hg, Na, Mg, P,K, Ca y Fe detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.

|                  | [Al] sangre    | [Ti] sangre   | [Sr] sangre   | [Ba] sangre    | [Mn] sangre   | [Co] sangre  | [V] sangre   |
|------------------|----------------|---------------|---------------|----------------|---------------|--------------|--------------|
|                  | ng/g           | ng/g          | ng/g          | ng/g           | ng/g          | ng/g         | ng/g         |
| Josué            | 0,00           | 0,00          | 44,09         | 83,38          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Leia             | 0,00           | 15,78         | 36,37         | 104,86         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Virkin           | 832,09         | 87,56         | 61,39         | 331,25         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Kuni             | 0,00           | 25,00         | 75,22         | 218,48         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Venus            | 0,00           | 0,00          | 58,07         | 52,30          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Neptuno          | 0,00           | 0,00          | 50,66         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Nika             | 0,00           | 0,00          | 32,78         | 72,86          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Nala             | 4577,32        | 426,73        | 90,06         | 109,61         | 0,00          | 0,00         | 12,73        |
| Pfizer           | 2061,22        | 110,61        | 69,86         | 248,60         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Aqua             | 749,88         | 78,37         | 61,93         | 222,39         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Camino           | 0,00           | 83,74         | 14,50         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Farah            | 0,00           | 79,00         | 34,08         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| Maya             | 2090,36        | 275,36        | 116,73        | 383,43         | 62,02         | 0,00         | 0,00         |
| Edu              | 0,00           | 56,90         | 30,99         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| <b>PROMEDIO</b>  | <b>736,49</b>  | <b>88,50</b>  | <b>55,48</b>  | <b>130,51</b>  | <b>4,43</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,91</b>  |
| <b>STD. DEV.</b> | <b>1336,78</b> | <b>121,42</b> | <b>26,89</b>  | <b>128,69</b>  | <b>4,75</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,97</b>  |
| <b>MEDIANA</b>   | <b>0,00</b>    | <b>67,64</b>  | <b>54,37</b>  | <b>94,12</b>   | <b>5,09</b>   | <b>0,00</b>  | <b>1,04</b>  |
| <b>MINIMO</b>    | <b>0,00</b>    | <b>0,00</b>   | <b>14,50</b>  | <b>0,00</b>    | <b>5,45</b>   | <b>0,00</b>  | <b>1,12</b>  |
| <b>MÁXIMO</b>    | <b>4577,32</b> | <b>426,73</b> | <b>116,73</b> | <b>383,43</b>  | <b>5,84</b>   | <b>0,00</b>  | <b>1,20</b>  |
| 261              | 0,00           | 0,00          | 75,64         | 69,95          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 281              | 6707,94        | 612,06        | 113,09        | 83,16          | 0,00          | 0,00         | 24,50        |
| 283              | 0,00           | 158,69        | 53,44         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 264              | 0,00           | 0,00          | 71,37         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 266              | 0,00           | 0,00          | 53,24         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 285              | 0,00           | 16,88         | 58,08         | 75,73          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 316              | 1152,95        | 128,78        | 148,62        | 283,63         | 30,95         | 0,00         | 0,00         |
| 128              | 0,00           | 0,00          | 110,86        | 122,68         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 138              | 2313,77        | 434,36        | 163,65        | 226,81         | 6,00          | 0,00         | 0,00         |
| 221              | 0,00           | 0,00          | 49,93         | 0,00           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 287              | 108,27         | 88,14         | 89,95         | 96,39          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 211              | 608,23         | 13,73         | 101,20        | 93,53          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 238              | 0,00           | 0,00          | 59,26         | 94,42          | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 289              | 0,00           | 8,34          | 72,61         | 9,27           | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 318              | 0,00           | 0,00          | 91,80         | 194,08         | 0,00          | 0,00         | 0,00         |
| 291              | 1020,29        | 0,00          | 185,91        | 1041,66        | 197,27        | 34,90        | 0,00         |
| <b>PROMEDIO</b>  | <b>744,47</b>  | <b>91,31</b>  | <b>93,67</b>  | <b>149,46</b>  | <b>14,64</b>  | <b>2,18</b>  | <b>1,53</b>  |
| <b>STD. DEV.</b> | <b>1717,25</b> | <b>178,88</b> | <b>41,68</b>  | <b>252,57</b>  | <b>49,32</b>  | <b>8,72</b>  | <b>6,13</b>  |
| <b>MEDIANA</b>   | <b>0,00</b>    | <b>4,17</b>   | <b>82,80</b>  | <b>88,34</b>   | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  |
| <b>MINIMO</b>    | <b>0,00</b>    | <b>0,00</b>   | <b>49,93</b>  | <b>0,00</b>    | <b>0,00</b>   | <b>0,00</b>  | <b>0,00</b>  |
| <b>MÁXIMO</b>    | <b>6707,94</b> | <b>612,06</b> | <b>185,91</b> | <b>1041,66</b> | <b>197,27</b> | <b>34,90</b> | <b>24,50</b> |

Tabla 47. Concentraciones de Al, Ti, Sr, Ba, Mn, Co y V detectadas en sangre de delfines bajo cuidado humano y delfines salvajes.

El hecho de que los delfines bajo cuidado humano también estén expuestos a contaminantes no debe sorprendernos, puesto que, a través de la ingesta de pescado, todos lo estamos (Panseri et al., 2019; Zupo et al., 2019). Los delfines de los acuarios se alimentan con pescado congelado procedentes de piscifactorías y de acuicultura en el mar, de forma similar a la dieta que recibimos los humanos. Además, no debemos olvidar que las instalaciones de los delfines de los acuarios se llenan con agua procedente directamente del mar, aunque esta recibe diversos filtrados y un tratamiento previo con luz UV para eliminar los posibles agentes infecciosos procedentes del mar.

Teniendo en cuenta los datos aportados y la bibliografía previa sobre el tema, decidimos que los fármacos suponían un campo de estudio interesante, ya que nunca se han empleado en estudios inmunotoxicológicos en mamíferos marinos previamente. Los estudios de toxicología *in vitro* en plaquetas, como hemos mencionado anteriormente, son en sí mismos, pioneros en estas especies. Así pues, los compuestos seleccionados para el estudio fueron ibuprofeno, cafeína, aspirina y paracetamol, por su frecuente uso en la vida diaria de las personas.

## 5.2 Efectos de los contaminantes en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines mulares.

Evaluamos los efectos de cada compuesto sobre diferentes parámetros de la función inmunitaria (viabilidad celular, capacidad fagocítica y estado redox de los monocitos y granulocitos, proliferación de linfocitos, producción de citoquinas y potencial de membrana mitocondrial de los leucocitos) y plaquetaria (activación plaquetaria y liberación de micropartículas de forma aguda o tras 24 horas de exposición al compuesto).

### 5.2.1 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines.

#### 5.2.1.1 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad inmunitaria.

- ***Efectos del ibuprofeno sobre la viabilidad de los leucocitos.***

Tras 24 horas de exposición, el ibuprofeno indujo muerte celular por necrosis de forma dosis-dependiente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a la concentración más alta del fármaco, aumentando el porcentaje de células necróticas con respecto al control en un  $62,7 \pm 22,45\%$  (Figura 73).

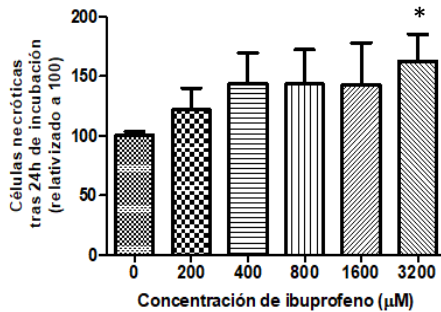


Figura 73. Porcentaje de células necróticas tras 24 horas de exposición al ibuprofeno. Se observó un aumento significativo con respecto al control a 3,2 mM ( $p=0,02^*$ ). Este resultado se obtuvo empleando el test t-de Student.

La capacidad del ibuprofeno para producir necrosis, apoptosis y alteraciones en el ciclo celular ha sido previamente descrita en estudios con células leucémicas humanas (Jakubikoua et al., 2001), aunque otros estudios defienden que no ocurre del mismo modo en células no tumorales (Todo et al., 2013). En delfines, sí que observamos necrosis en leucocitos sanos.

- ***Efectos del ibuprofeno sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de los leucocitos.***

No observamos diferencias significativas en el PMM leucocitario entre las muestras control y las expuestas al fármaco.

- ***Efectos del ibuprofeno sobre la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.***

El ibuprofeno redujo significativamente la fagocitosis ( $p \leq 0,0003$ ). Concretamente, la redujo en un  $15 \pm 4,45\%$  a  $800 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0,05$ ),  $17,2 \pm 3\%$  a  $1,6 \text{ mM}$  ( $p \leq 0,05$ ) y  $19,4 \pm 2,7\%$  a  $3,2 \text{ mM}$  ( $p \leq 0,001$ ) (Figura 74). Por el contrario, el ibuprofeno no tuvo efectos sobre la producción del estallido respiratorio por parte de las células fagocíticas.

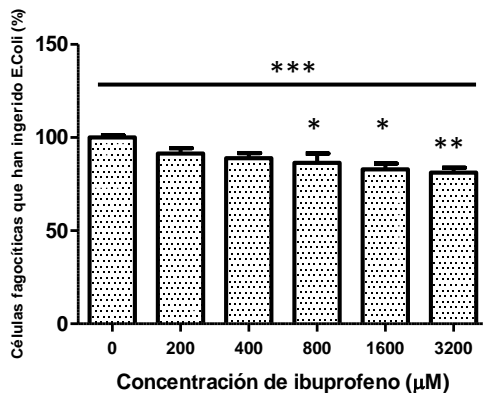


Figura 74. El ibuprofeno redujo la capacidad de ingestión de las células fagocíticas de forma dosis dependiente ( $p \leq 0,0003^{***}$ ). El efecto fue mayor cuanto mayor fue la dosis del fármaco, siendo significativo a 800  $\mu\text{M}$  ( $p \leq 0,05^*$ ), 1,6 mM ( $p \leq 0,05^*$ ) v 3.2 mM ( $p \leq 0,001^{***}$ ) (ANOVA).

Estos resultados coinciden con los observados en humanos en estudios previos (Zielinska y Wladyslaw, 1996; Furst et al., 2005). El ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE), y como tal es un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX-2). La COX-2 es la encargada de transformar el ácido araquidónico (AA) en prostaglandinas (PGs), que son mediadoras de la inflamación, ya que promueven la vasodilatación, la liberación de citoquinas con propiedades vasoactivas y quimiotácticas o el reclutamiento de los leucocitos a la zona de infección (quimiotaxis) (Bieren et al., 2017). Alteraciones a cualquiera de estos niveles pueden producir una reducción en el porcentaje de células fagocíticas capaces de ingerir al patógeno (Figura 75).



- **Efectos del ibuprofeno sobre la producción de citoquinas.**

Encontramos un aumento en la producción de la citoquina IL-6 en las muestras tratadas con dosis altas de ibuprofeno durante 24 horas ( $p=0,03$ ). Esto nos sugiere que el mecanismo por el cual el ibuprofeno reduce la capacidad fagocítica no está mediado por esta misma vía (Figura 118).

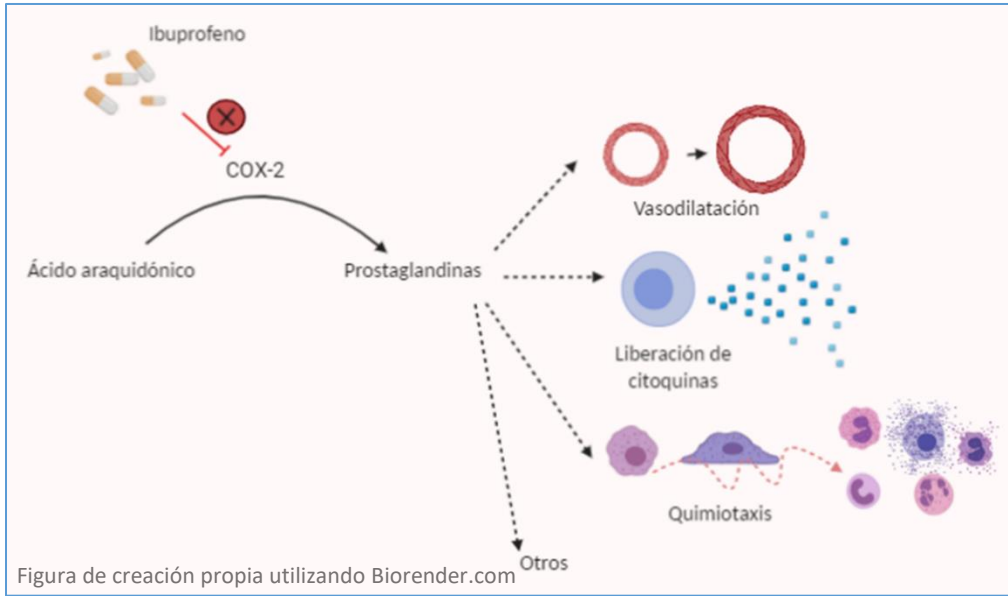


Figura 75. El ibuprofeno tiene un efecto inhibitor sobre la COX-2, impidiendo la formación de prostaglandinas encargadas de múltiples aspectos de la inflamación, como la vasodilatación, la liberación de citoquinas o la quimiotaxis.

- **Efectos del ibuprofeno sobre el estado redox de monocitos y granulocitos.**

El ibuprofeno aumentó el porcentaje de células fagocíticas presentando estrés oxidativo de forma dosis dependiente ( $p\leq 0,018$ ), especialmente a las concentraciones de entre 1,6 mM y 3,2 mM. A estas concentraciones el aumento fue de un  $29\pm 7,7\%$  ( $p=0,0011$ ) y un  $47\pm 14,8\%$  ( $p=0,0018$ ) respectivamente con respecto al control (Figura 76).

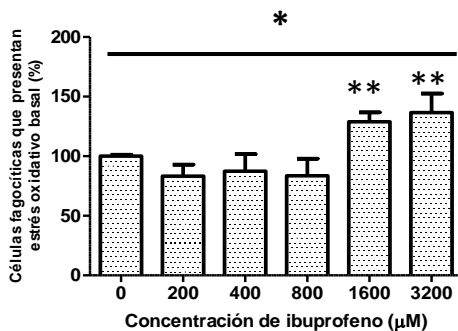


Figura 76. La exposición al ibuprofeno durante 24 horas produjo un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células presentando estrés oxidativo ( $p \leq 0,018^*$ , empleando ANOVA). Empleando t-test, las diferencias fueron significativas a 1,6 mM ( $p = 0,0011^{**}$ ) y a 3,2 mM ( $p = 0,0018^{**}$ ).

Este efecto se ha descrito previamente en células humanas, de crustáceos o peces (Gómez-Oliván et al., 2014; Jiménez et al., 2004; Islas-Flores et al., 2013). El aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) no depende de la vía de la ciclooxigenasa. En humanos, la administración oral de 100 mg/Kg de ibuprofeno produce un incremento significativo de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), peroxidación lipídica o de la actividad de la xantina oxidasa (Jiménez et al., 2004). La función de la MPO ha quedado descrita en el apartado de Introducción. La peroxidación lipídica consiste en la degradación oxidativa de los lípidos por radicales libres y la xantina oxidasa es una enzima que transforma determinados metabolitos de las purinas en ácido úrico produciendo ROS en el proceso (Gómez-Oliván et al., 2014). La potenciación de estas tres vías, por tanto, acarrea un aumento en la producción de ROS. Por otro lado, las carpas comunes (*Cyprinus carpio*) y los mejillones mediterráneos (*Mytilus galloprovincialis*) tratados con ibuprofeno también mostraron un aumento en los niveles de peroxidación lipídica y producción de enzimas antioxidantes (Islas-Flores et al., 2013; González-Rey y Bebianno, 2011).

La mayor producción de ROS derivada de la exposición al fármaco es muy dependiente del individuo y la situación concreta (enfermedades, práctica de deporte reciente...) (Nieman et

al., 2006; McAnurty et al., 2006) y se suele acompañar de un aumento de enzimas antioxidantes (Gutierrez-Noya et al., 2019; González-Rey y Bebianno, 2011).

- ***Efectos del ibuprofeno sobre la proliferación de los linfocitos.***

A pesar de que está descrito el efecto de arresto del ciclo celular en las fases G0/G1 del ibuprofeno (Leidgens et al., 2015), en delfines no observamos que el ibuprofeno afectara a la proliferación de los linfocitos en delfines.

### **5.2.1.2 Efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad plaquetaria.**

- ***Efectos del ibuprofeno sobre la movilización de calcio intraplaquetario.***

- a) **Exposición aguda al ibuprofeno.**

La exposición aguda a ibuprofeno no alteró la concentración de plaquetas en sangre ni la velocidad a la que estas respondieron al estímulo (ADP).

Tras activar las plaquetas con ADP, el aumento de calcio citosólico se produjo de forma similar en las muestras control y en las expuestas al fármaco. Sin embargo, el ibuprofeno redujo la velocidad de recaptación del calcio hacia sus estructuras de almacenamiento de forma dosis-dependiente ( $p=0,0076$ ). Este efecto fue estadísticamente significativo a todas las concentraciones, especialmente a las más altas (0,48mM y 1,5mM), que disminuyeron la velocidad de recuperación a la mitad y a la quinta parte respectivamente ( $p\leq 0,0001$ ) (Figura 77). Al recaptarse menos, la concentración de calcio citosólico final en las plaquetas expuestas al ibuprofeno fue entre un 16 y un 38,5% mayor que en los controles ( $p=0,036$ ) (Figura 77 B).

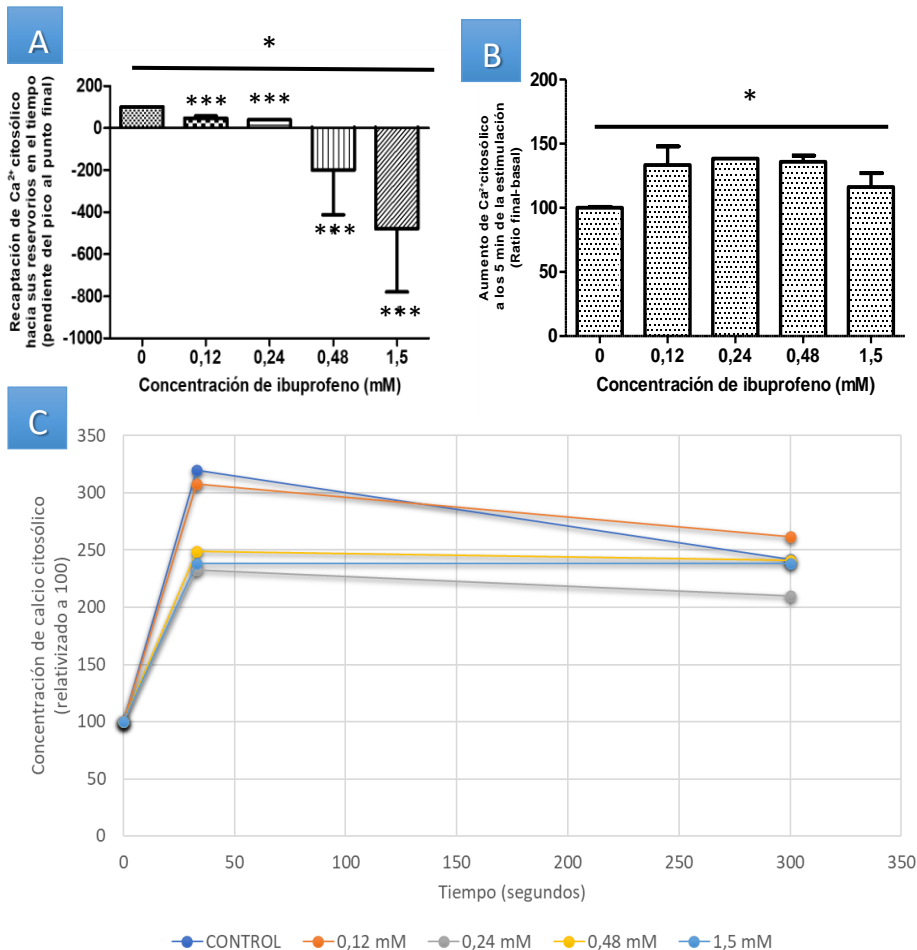


Figura 77. (A) Las plaquetas expuestas de forma aguda al ibuprofeno presentaron una menor velocidad de recaptación del calcio citosólico hacia sus reservorios internos de forma dosis-dependiente ( $p=0,0076^{**}$ ), observándose los efectos más importantes a partir de 0,48 mM ( $p\leq 0,05^{*}$ )(ANOVA). Empleando t-test este efecto fue significativo a todas las concentraciones( $p\leq 0,0001^{***}$ ). (B) Las plaquetas expuestas al fármaco presentaron, por tanto, mayores concentraciones de calcio citosólico a punto final ( $p=0,036^{*}$ , empleando ANOVA). (C) Representación gráfica de la evolución de la concentración de calcio citosólico en el tiempo en la muestra control y en las muestras expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno (0,12mM, 0,24 mM, 0,48 mM y 1,5 mM).

## b) Exposición durante 24 horas al ibuprofeno.

En este caso tampoco se observaron efectos sobre el recuento plaquetario ni la velocidad de respuesta de las plaquetas ante el estímulo.

Por el contrario, tras 24 horas de exposición, el ibuprofeno redujo la liberación de calcio desde los reservorios internos de la plaqueta hacia el citosol durante la activación plaquetaria. Este efecto es dosis-dependiente y se observa en las medidas de cociente y diferencial entre la IMF de Fluo-4 entre el pico y el basal ( $p=0,035$  y  $p=0,0268$  respectivamente, empleando ANOVA) (Figura 78). Empleando el cociente como medida, observamos que el ibuprofeno redujo el aumento de calcio citosólico respecto al control en un  $27,3\pm 4,8\%$  a  $400\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0013$ ),  $25,3\pm 3,7\%$  a  $800\ \mu\text{M}$  ( $p=0,001$ ),  $26,5\pm 5,9\%$  a  $1,6\text{mM}$  ( $p=0,0032$ ) y  $25,9\pm 4\%$  a  $3,2\text{mM}$  ( $p=0,0009$ ). Empleando el diferencial, la reducción fue de un  $31,2\pm 6,7\%$  a  $200\ \mu\text{M}$  ( $p=0,009$ ),  $40\pm 5,8\%$  a  $400\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0009$ ),  $34\pm 6,5\%$  a  $800\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0089$ ),  $27,7\pm 9,2\%$  a  $1,6\text{mM}$  ( $p=0,0311$ ) y  $29,8\pm 10,2\%$  a  $3,2\text{mM}$  ( $p=0,036$ ).

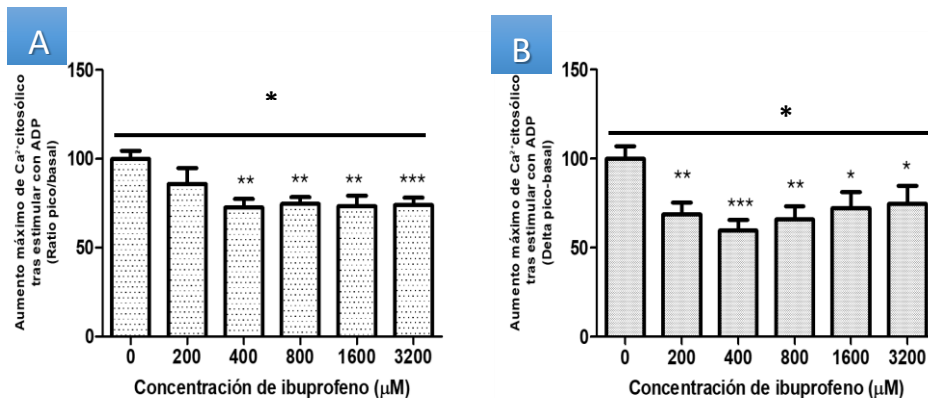


Figura 78. Aumento de calcio citosólico en las plaquetas al activarlas con ADP en las muestras control y expuestas al ibuprofeno. (A) El cociente entre la IMF de Fluo-4 en el pico y el punto basal fue significativamente inferior en las muestras expuestas al ibuprofeno ( $p=0,035^*$ , empleando ANOVA). Con t-test las diferencias fueron estadísticamente significativas a  $400\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0013^{**}$ ),  $800\ \mu\text{M}$  ( $p=0,001^{**}$ ),  $1,6\ \text{mM}$  ( $p=0,0032^{**}$ ) y  $3,2\ \text{mM}$  ( $p=0,0009^{***}$ ). (B) El diferencial entre ambos puntos también fue significativamente inferior en las muestras tratadas con ibuprofeno ( $p=0,0268^*$ , empleando ANOVA). Con t-test las diferencias entre las muestras tratadas y los controles fueron significativas a todas las concentraciones:  $200\ \mu\text{M}$  ( $p=0,009^{**}$ ),  $400\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0009^{***}$ ),  $800\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0089^{**}$ ),  $1,6\text{mM}$  ( $p=0,0311^*$ ) y  $3,2\text{mM}$  ( $p=0,036^*$ ).

El ibuprofeno también redujo significativamente la posterior recuperación del calcio desde el citosol hacia sus estructuras de almacenamiento. La velocidad de recaptación del calcio fue significativamente inferior en las muestras expuestas al ibuprofeno que en las muestras control ( $p=0,046$ ). Se observaron diferencias significativas a todas las concentraciones, especialmente a las más altas (Figura 79).

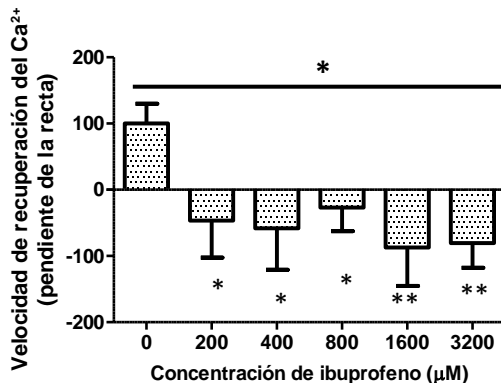


Figura 79. El ibuprofeno redujo de forma dosis dependiente la velocidad de recaptación del calcio citosólico hacia sus reservorios internos ( $p=0,046^*$ , empleando ANOVA). Empleando t-test, se encontraron diferencias significativas a todas las concentraciones: 200  $\mu\text{M}$  ( $p=0,027$ ), 400  $\mu\text{M}$  ( $p=0,029$ ), 800  $\mu\text{M}$  ( $p=0,018$ ), 1,6 mM ( $p=0,009$ ) y 3,2 mM ( $p=0,005$ ).

Puesto que, al activarlas, las plaquetas expuestas a ibuprofeno liberaron menos calcio hacia el citosol, la concentración final de calcio, a pesar de que su recaptación hacia los reservorios internos es más lenta, se mantiene inferior con respecto a las muestras control ( $p=0,0115$ ). Este efecto es máximo a las concentraciones de 1,6mM y 3,2 mM, con un  $21,87 \pm 3,2\%$  ( $p \leq 0,05$ ), y  $22,5 \pm 4\%$  ( $p \leq 0,05$ ) menor concentración de calcio citosólico que el control respectivamente (Figura 80).

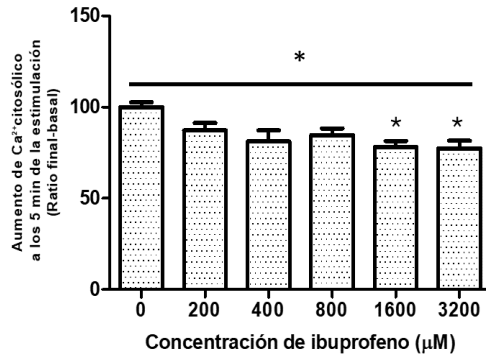


Figura 80. El ibuprofeno redujo de forma significativa la concentración de calcio citoplásmico en la plaqueta en el punto final, especialmente en las muestras expuestas a las concentraciones más altas del fármaco. Este efecto es estadísticamente significativo empleando ANOVA ( $p=0,0115$ ) y t-test en las concentraciones de 1,6 mM y 3,2 mM ( $p \leq 0,05$ ).

La evolución en el tiempo del calcio citoplásmico en la plaqueta en la muestra control y en las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de ibuprofeno se representan gráficamente en la Figura 81.

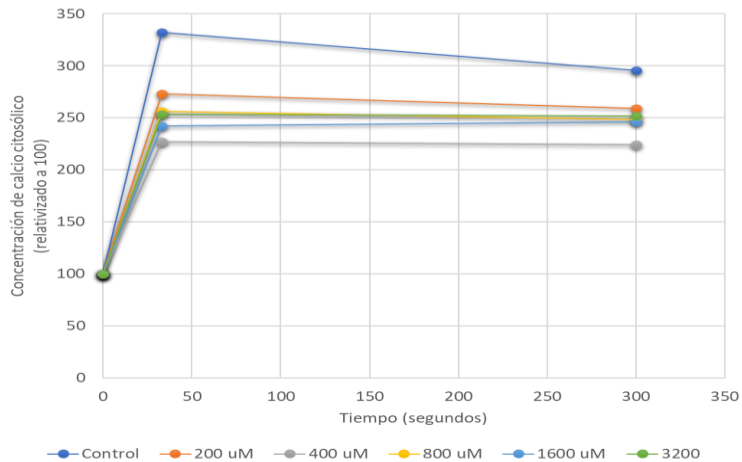


Figura 81. Representación gráfica de la evolución de la concentración de calcio citoplásmico en el tiempo en la muestra control y en las muestras expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno (de 200 μM a 3,2 mM).

- **Efectos del ibuprofeno sobre la exposición de fosfatidilserina y liberación de micropartículas plaquetarias.**

**a) Exposición aguda al ibuprofeno.**

Al estimular las plaquetas, el ibuprofeno redujo la exposición de PS a la cara externa de la membrana plaquetaria de forma significativa. Empleando el cociente entre la IMF de la Anexina-V en el punto máximo y basal, la reducción fue de un 34±8% a 0,12 mM ( $p=0,02$ ), 38±6,7% a 0,24 mM ( $p=0,005$ ), 45,7±7,3% a 0,48 mM ( $p=0,003$ ) y 60±17,3% a 1,5 mM ( $p=0,02$ ) (Figura 82). Empleando el diferencial entre ambos puntos, las diferencias solo fueron significativas a 0,24 mM y 0,48 mM, reduciendo la exposición de la PS en un 23±2% ( $p=0,0001$ ) y 26±8% ( $p=0,05$ ) respectivamente. A 1,5 mM, la reducción fue del 49±31%, sin embargo, no fue estadísticamente significativa, debido a la mayor variabilidad de los datos.

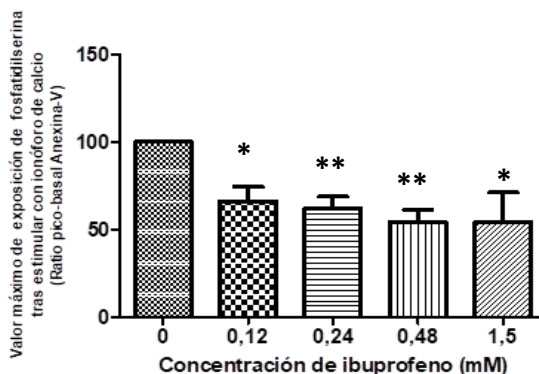


Figura 82. La exposición aguda a ibuprofeno redujo de forma significativa la traslocación de la PS a la cara externa de la membrana plaquetaria a las concentraciones de 0,12 mM ( $p=0,02^*$ ), 0,24 mM ( $p=0,005^{**}$ ), 0,48 mM ( $p=0,003^{**}$ ) y 1,5 mM ( $p=0,02^*$ ). Las diferencias se observaron empleando t-test.

Además, el ibuprofeno redujo la velocidad de exposición de la PS durante toda la adquisición de la muestra de forma dosis-dependiente ( $p=0,0155$ ). La reducción respecto a las muestras control fue de un 18±2,5% a 0,12 mM ( $p=0,0014$ ), 24±7% a 0,24 mM ( $p=0,04$ ) y 30±3,7% a



0,48 mM ( $p=0,001$ ). La mayor variabilidad de los datos a 1,5 mM no permitió que las diferencias fueran significativas en este caso (Figura 83).

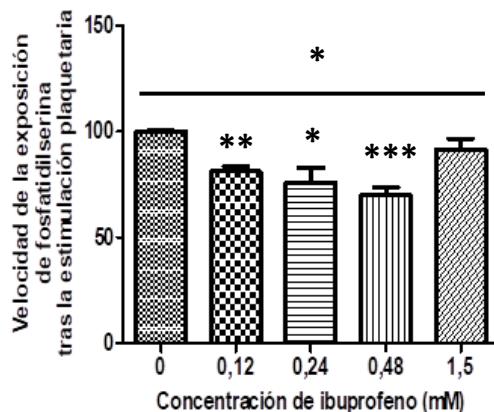


Figura 83. El ibuprofeno redujo la velocidad de exposición de PS por parte de las plaquetas tras la estimulación con ionóforo de calcio en comparación con las muestras sin tratar con el fármaco. Estas diferencias se observaron empleando ANOVA ( $p= 0,015$ ) y t-test.

A punto final, la PS expuesta fue significativamente menor en las muestras tratadas con ibuprofeno que en las muestras control. Empleando el ratio entre la IMF final y basal de Anexina-V, esta reducción fue de un  $39\pm 6,5\%$  a 0,12 mM ( $p=0,0042$ )  $43\pm 6\%$  a 0,24 mM ( $p=0,0017$ ),  $52,8\pm 5,7\%$  a 0,48 mM ( $p=0,0005$ ) y  $60\pm 6,4\%$  a 1,5 mM ( $p=0,032$ ). Empleando el diferencial la reducción fue de un  $26\pm 6,3\%$  a 0,24 mM ( $p=0,021$ ),  $32,2\pm 4\%$  a 0,48 mM ( $p=0,0012$ ) y  $19,4\pm 3,3\%$  a 1,5 mM ( $p=0,0047$ ) (Figura 84).

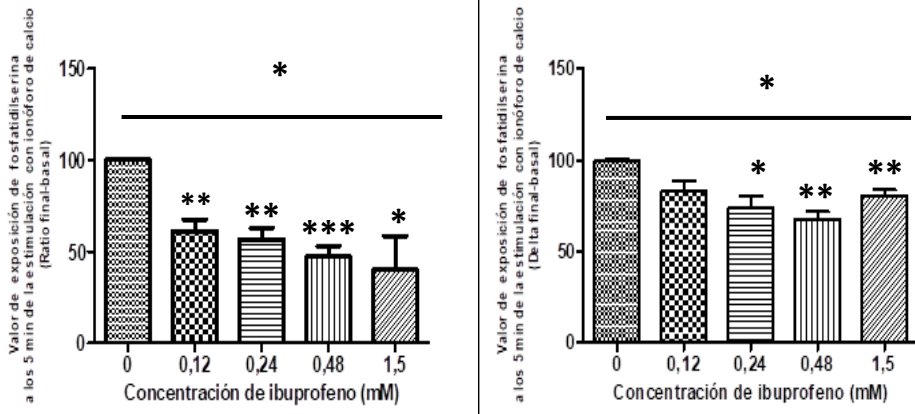


Figura 84. El ibuprofeno redujo la exposición de PS a la cara externa de la membrana plaquetaria a punto final. Las diferencias se observaron empleando el ratio y delta entre la IMF de Anexina-V utilizando ANOVA ( $p=0,047^*$  y  $p=0,015^*$  respectivamente) y t-test ( $p \leq 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ).

Los cambios en la exposición de la PS en las muestras tratadas de forma aguda con el ibuprofeno se resumen en la Figura 85.

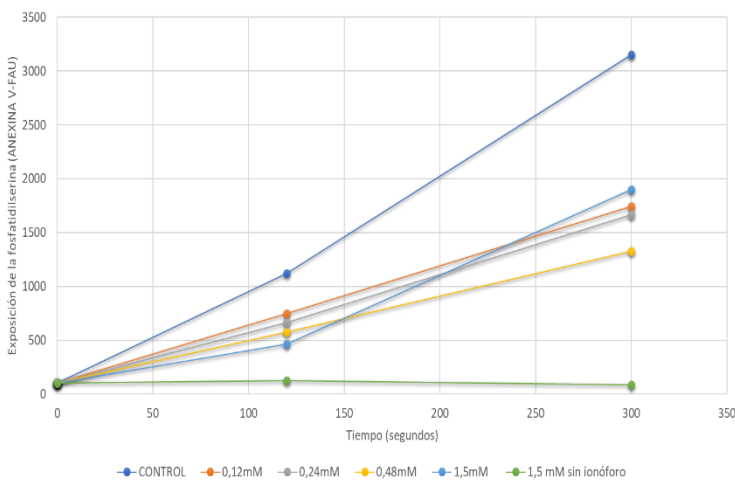


Figura 85. Cambios en el tiempo en la exposición de la PS a la cara externa de la membrana plaquetaria en las muestras control y las tratadas de forma aguda con el ibuprofeno tras estimular con ionóforo de calcio.

## b) Exposición durante 24 horas al ibuprofeno.

Tras 24 horas de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de MPPs entre las muestras control y las expuestas al ibuprofeno. Las muestras incubadas con o sin el fármaco durante 24 horas, se estimularon con ionóforo de calcio. En las muestras tratadas con ibuprofeno observamos una tendencia a la baja en la exposición de PS a la cara externa de la membrana. Este efecto parecía ser dosis-dependiente pero no fue estadísticamente significativo (Figura 86).

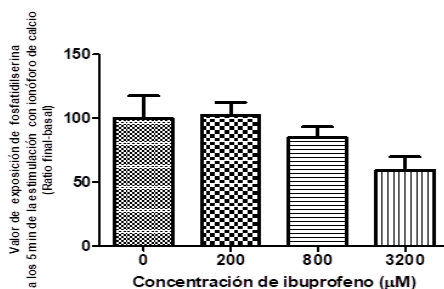


Figura 86. Exposición de PS al estimular las plaquetas con ionóforo de calcio en las muestras control y las expuestas a diferentes concentraciones de ibuprofeno (NDS:  $p \geq 0,05$ ).

Los efectos del ibuprofeno sobre la funcionalidad plaquetaria observados en este estudio demuestran que este fármaco presenta un efecto inhibitor de la activación plaquetaria en delfines. El ibuprofeno es capaz de inhibir de forma dosis-dependiente la movilización de calcio intraplaquetario, la expresión de la superficie procoagulante y la liberación de micropartículas plaquetarias.

Nuestros resultados concuerdan con los observados en estudios previos realizados con muestras humanas o de animales de laboratorio. Al igual que el ibuprofeno reduce la función inmunitaria debido a su naturaleza de AINE, sus efectos sobre la función plaquetaria también se explican por ser un inhibidor de la ciclooxigenasa. En las plaquetas, las ciclooxigenasas catalizan la conversión del ácido araquidónico (AA) a prostaglandinas y tromboxanos. El tromboxano  $A_2$  es uno de los mayores promotores de la activación plaquetaria, ya que promueve la liberación de gránulos densos y gránulos  $\alpha$ . Los gránulos densos contienen compuestos que fomentan la activación plaquetaria, entre los que se encuentra ADP, que

como sabemos, es un agonista plaquetario fisiológico, el cual fomenta la liberación de calcio al citosol de las plaquetas. Los gránulos  $\alpha$  liberan vWF o fibrinógeno entre otras cosas, potenciando sobre todo la agregación plaquetaria. Todo ello desencadena el consiguiente cambio de forma de la plaqueta, agregación plaquetaria, secreción de más gránulos, expresión de la superficie procoagulante, liberación de MPPs y finalmente formación del tapón hemostático (Monteiro et al., 2001). Además, el  $\text{TxA}_2$  activa las fosfolipasas, entre las cuales se encuentra la fosfolipasa  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ), que promueve la liberación del AA para su conversión a prostaglandinas y tromboxanos por las COX-1 y COX-2, cerrándose así el ciclo (Driver et al., 2019). El ibuprofeno, en concreto, bloquea el acceso del AA al su sitio activo, aunque esta unión puede ser reversible. Quizás por este motivo, encontramos efectos más notorios de forma aguda, pero tras 24 horas de incubación con el fármaco, los efectos se disipan o se atenúan. Por otro lado, el ibuprofeno promueve la formación de óxido nítrico, que es un inhibidor de la activación plaquetaria (Chakraborty et al., 2003). En la Figura 87 se detallan los principales mecanismos de acción del ibuprofeno sobre la funcionalidad plaquetaria.

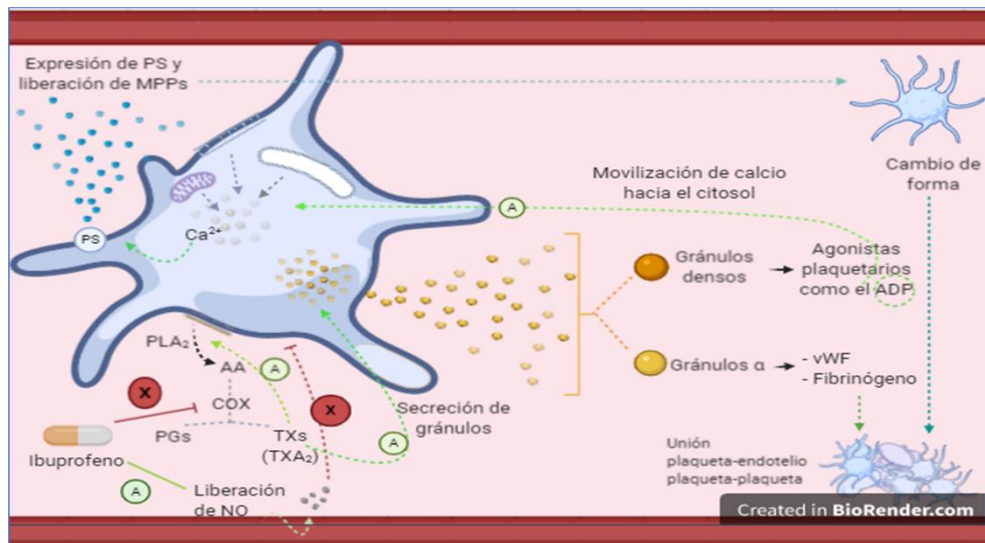


Figura 87. El ibuprofeno inhibe la COX, inhibiendo por tanto la conversión del AA a TXs y PGs. El  $\text{TXA}_2$  potencia la acción de la  $\text{PLA}_2$ , responsable de la liberación del AA, proceso por tanto, también inhibido en cierto grado por el ibuprofeno. Por otro lado, el ibuprofeno aumenta la liberación de NO por parte del endotelio, que es un inhibidor de la activación plaquetaria.

## 5.2.2 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines sanos.

### 5.2.2.1 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad inmunitaria.

#### ▪ Efectos de la cafeína sobre la viabilidad de los leucocitos.

La exposición durante 24 horas a la cafeína no afectó a la viabilidad de las células.

#### ▪ Efectos de la cafeína sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de leucocitos.

No observamos diferencias significativas en el PMM leucocitario entre las muestras control y las expuestas al fármaco.

#### ▪ Efectos de la cafeína sobre la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.

La cafeína no afectó a la capacidad de ingestión del patógeno por parte de las células fagocíticas, pero sí que aumentó su capacidad para producir el estallido respiratorio de forma dosis-dependiente ( $p=0,03$ ). El efecto es máximo a la concentración de 1,5mM, aumentando el porcentaje de células fagocíticas que presentan estallido respiratorio en un  $101\pm 44\%$  ( $p\leq 0,05$ ) (Figura 88).

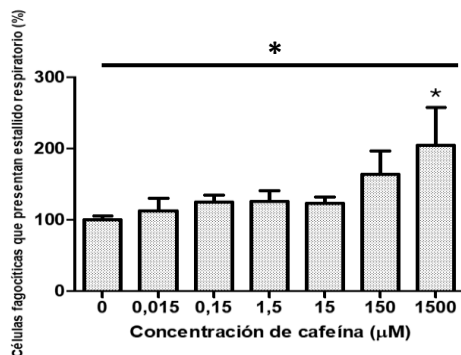


Figura 88. La cafeína aumentó la producción de ROS durante el estallido respiratorio de forma dosis-dependiente, mostrando un efecto máximo a 1,5 mM ( $p\leq 0,05^*$ ). Este análisis se realizó mediante el test ANOVA.

La cafeína se ha descrito como un compuesto con propiedades antioxidantes, sin embargo, en este caso observamos que, al contrario que en humanos, en delfines es capaz de potenciar el estallido respiratorio. Para explicar este efecto, nos planteamos dos hipótesis: que este efecto esté relacionado (1) con la interacción entre el compuesto y el propio patógeno o, (2) con los receptores de adenosina de los neutrófilos de los delfines.

La cafeína es capaz de aumentar la peroxidación de determinados ácidos grasos (Lally et al., 2012), entre los que se encuentran el linoleico y el palmítico (Luo et al., 2013; Gülcin, 2008). El ácido palmítico forma parte de la composición de la bacteria *E.coli* (Shaw y Ingraham, 1965), que es el patógeno que empleamos en el estudio, con que podría ocurrir que en este caso, prime el aumento de ROS derivado de la peroxidación lipídica al efecto antioxidante de la cafeína.

Nuestra segunda hipótesis se basa en el hecho de que los neutrófilos poseen dos tipos de receptores de adenosina: receptores A1 y receptores A2a (Walker, et al., 2007; Walker, et al., 2006; Alsharif, et al., 2015). La adenosina es una purina procedente de la degradación del AMP. Si la adenosina se une a los receptores A1, se promueven la quimiotaxis y la fagocitosis,

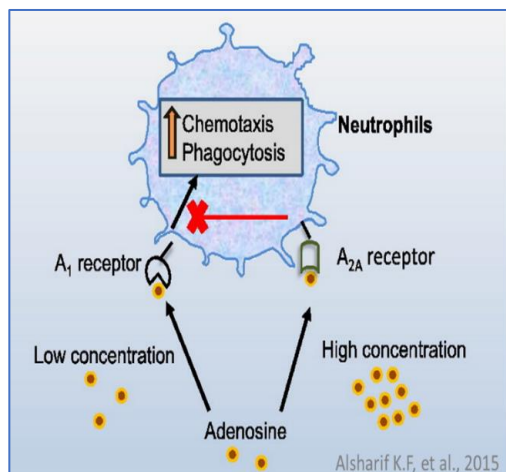


Figura 89. Los receptores A1 de adenosina potencian la fagocitosis, mientras que los receptores A2a la inhiben.

sin embargo, si se une a los receptores A2a, se inhibe la fagocitosis y el estallido respiratorio. (Figura 89).

Cuando la adenosina se encuentra a bajas concentraciones suele unirse a los receptores A1, permitiendo el normal funcionamiento de las células fagocíticas, pero en situaciones en las que los niveles de adenosina aumentan, como por ejemplo durante el ejercicio intenso (por desfosforilación del AMP), se activan también los receptores A2a (Alsharif, et al., 2015). De hecho, en algunos estudios se ha demostrado que tras horas de ejercicio intenso se reduce la producción del estallido respiratorio en los neutrófilos de los

individuos bajo estudio y que este efecto está mediado por los receptores A2a (Walker, et al., 2006)

La cafeína es un compuesto antagonista de dichos receptores, pudiendo potenciar o inhibir la fagocitosis según al tipo de receptor al que se una (Walker, et al., 2006 y 2007; Fredholm, et al., 1996). Si se une a los receptores A1, se inhibe la fagocitosis y si se une a los A2a se potencia la fagocitosis y el estallido respiratorio.

Teniendo en cuenta que al contrario que en humanos, las muestras de delfines tratadas con cafeína presentaron un aumento en la producción del estallido respiratorio, nos planteamos como hipótesis la posibilidad de que los delfines posean un mayor porcentaje de receptores A2a que A1, y por tanto el proceso de fagocitosis se potencie más al aplicar el fármaco. Por otro lado, los neutrófilos de los delfines podrían presentar más receptores A2a que los de los humanos, ya que, en reposo, la cafeína no altera significativamente la producción del estallido respiratorio en seres humanos, e incluso lo inhibe en algunas ocasiones.

Este efecto también podría estar relacionado con los momentos de toma de muestra sanguínea. Los delfines entrenan y socializan entre ellos desde primera hora de la mañana, por lo que podrían presentar elevados niveles de adenosina en sangre. Estos altos niveles de adenosina podrían estar inhibiendo la fagocitosis de forma fisiológica al unirse a los receptores A2a. Al aplicar posteriormente cafeína a la muestra, este efecto se reduce por el efecto antagonista del compuesto.

Para determinar la causa real de esta alteración es necesario un estudio profundo de los efectos del ejercicio previo a la extracción de sangre de los delfines sobre la producción del estallido respiratorio. También deberíamos estudiar la concentración de cada tipo de receptor de adenosina en la membrana de los neutrófilos de los delfines, ya que no hemos encontrado bibliografía previa en estos campos de estudio.

▪ ***Efectos de la cafeína sobre la producción de citoquinas.***

La cafeína aumentó significativamente la liberación de IL-1ra ( $p=0,0075$ ), IL-6 ( $p=0,006$ ), IL-13 ( $p=0,003$ ), IL-17 ( $p=0,003$ ), IP-10 ( $p=0,0045$ ) y TNFa ( $p=0,005$ ). Por otro lado, redujo la liberación de IL-8 ( $p=0,028$ ). Similares efectos han sido descritos anteriormente en humanos (Rodas et al., 2020; van Furth et al., 1995; Yi et al., 2014; Mahmoud et al., 2014) (Figura 117).

- **Efectos de la cafeína sobre el estado redox de monocitos y granulocitos.**

Curiosamente, mientras que la cafeína potenció la producción del estallido respiratorio durante la fagocitosis, redujo el estrés oxidativo basal de las células fagocíticas en reposo. Este efecto fue dosis-dependiente ( $p \leq 0,0057$ ). En concreto, la cafeína redujo el estrés oxidativo de las células en un  $12 \pm 4\%$  a  $0,015 \mu\text{M}$  ( $p \geq 0,05$ ),  $28 \pm 3,8\%$  a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p = 0,014$ ),  $22 \pm 10,5\%$  a  $1,5 \mu\text{M}$  ( $p \geq 0,05$ ),  $28 \pm 10\%$  a  $15 \mu\text{M}$  ( $p = 0,045$ ),  $47 \pm 11,2\%$  a  $150 \mu\text{M}$  ( $p = 0,0071$ ) y  $90 \pm 2,6\%$  a  $1,5 \text{ mM}$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 90). Como podemos observar, el efecto no fue significativo a  $0,015 \mu\text{M}$  y  $1,5 \mu\text{M}$ .

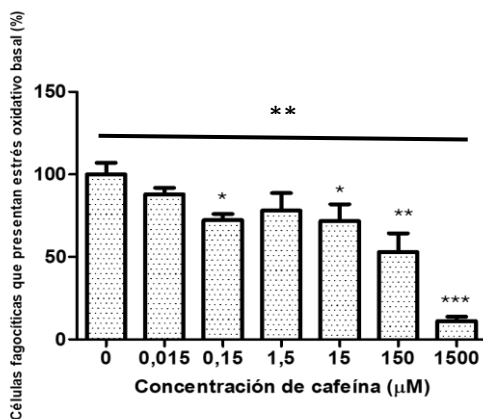


Figura 90. La cafeína redujo el estrés oxidativo basal de las células fagocíticas de forma dosis-dependiente ( $p \leq 0,0057^{**}$ , empleando ANOVA). Empleando t-test el efecto fue significativo a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p = 0,014^*$ ),  $15 \mu\text{M}$  ( $p = 0,045^*$ ),  $150 \mu\text{M}$  ( $p = 0,0071^{**}$ ) y  $1,5 \text{ mM}$  ( $p < 0,0001^{***}$ ) de cafeína.

El efecto antioxidante de la cafeína ha sido ampliamente descrito en humanos y ratones (Nimse et al., 2015; Pillon-Barcelos et al., 2013). Por ejemplo, se ha descrito la reducción en el porcentaje de glutatión oxidado en individuos que ingirieron cafeína vía oral, acompañado de un aumento en el porcentaje de glutatión reducido. También se redujeron los niveles de malondialdehído (MDA), uno de los principales marcadores de peroxidación lipídica en las células, procedente de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Metro et al., 2017; Muñiz et al., 2016; Amer et al., 2017). Estos efectos pueden ser debidos a múltiples procesos,



como la formación de aductos con radicales (León-Carmona y Galano, 2011) o la potenciación de la función del Nrf2, entre otros (Metro et al., 2017; Gordillo-Bastidas et al., 2013).

Uno de los principales mecanismos por los que ejerce su acción antioxidante es la formación de enlaces entre sus nitrógenos y los grupos hidroxilo de la molécula con la que reaccione, mitigando la acción de las ROS (León-Carmona y Galano, 2011; Petrucci et al., 2018). Por otro lado, el Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes. En condiciones normales, el Nrf2 permanece anclado a su inhibidor citoplasmático formando el complejo Keap1-Nrf2. Ante una situación de estrés oxidativo, el Nrf2 se separa del complejo y se trasloca al núcleo celular donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) o al elemento electrófilo de respuesta (EpRE), presentes en la región promotora de las enzimas antioxidantes, incrementando su transcripción (Tao et al., 2008; Vomund et al., 2017; Nilnumkhum et al., 2019). La cafeína es capaz de activar la función del Nrf2, potenciando la formación de enzimas antioxidantes (Gordillo-Bastidas et al., 2013; Vicente et al., 2013). De hecho, varios estudios han demostrado que bajas dosis o dosis únicas de cafeína son suficientes para incrementar alrededor de un 20% la concentración de las enzimas catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, todas ellas antioxidantes (Vicente et al., 2011; Vicente et al., 2013; Nilnumkhum et al., 2019).

- ***Efectos de la cafeína sobre la proliferación de los linfocitos.***

La cafeína no tuvo efectos sobre la proliferación de los linfocitos en delfines.

#### **5.2.2.2 Efectos de la cafeína sobre la funcionalidad plaquetaria.**

- ***Efectos de la cafeína sobre la movilización de calcio intraplaquetario.***

**a) Exposición aguda a la cafeína.**

No se observaron diferencias significativas en la movilización de calcio intraplaquetario al activar las plaquetas con ADP entre las muestras control y las muestras expuestas a cafeína.

## b) Exposición durante 24 horas a la cafeína.

La exposición a la cafeína no alteró el recuento plaquetario ni la velocidad a la que estas respondieron al estímulo (ADP).

Tras activar las plaquetas con ADP, la cafeína redujo significativamente la liberación de calcio desde los reservorios intraplaquetarios al citosol de forma dosis-dependiente ( $p=0,006$ ). Este efecto se observó empleando como medida el ratio entre la concentración de calcio citosólico en los puntos máximo y basal. Concretamente, la cafeína redujo el aumento de calcio citosólico respecto al control, en un  $18,7\pm 3,5\%$  a  $1,5\ \mu\text{M}$  ( $p=0,044$ ),  $20,2\pm 2\%$  a  $15\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0237$ ),  $23\pm 4,8\%$  a  $150\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0244$ ) y  $29,2\pm 2,6\%$  a  $1,5\ \text{mM}$  ( $p=0,0071$ ) (Figura 91). Empleando como medida el diferencial, el efecto solo es significativo a  $1,5\ \text{mM}$ , disminuyendo la liberación de calcio en un  $41,65\pm 2,7\%$  respecto al control ( $p=0,0386$ ).

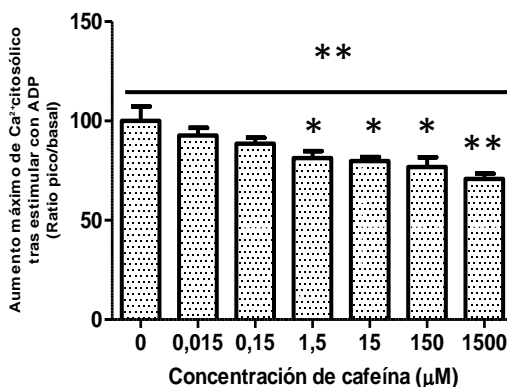


Figura 91. La cafeína produjo una disminución dosis-dependiente en el aumento de calcio citosólico tras activar las plaquetas ( $p=0,006^{**}$ , empleando ANOVA), siendo máxima a  $1,5\ \text{mM}$  ( $p\leq 0,05$ ). Empleando t-test, las diferencias fueron significativas a  $1,5\ \mu\text{M}$  ( $p=0,044^*$ ),  $15\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0237^*$ ),  $150\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0244^*$ )  $1,5\ \text{mM}$  ( $p=0,0071^{**}$ ).

La cafeína también redujo la posterior recaptación del calcio hacia sus reservorios intraplaquetarios.

A las concentraciones más bajas (0,015  $\mu\text{M}$  a 1,5  $\mu\text{M}$ ) la pendiente de recaptación desde el pico de calcio citosólico hasta el punto final se redujo considerablemente. A partir de 1,5  $\mu\text{M}$ , la pendiente se aplanó y acabó por volverse positiva a las concentraciones más altas, lo que indica que, el calcio no solo no se redistribuía a sus lugares de almacenamiento si no que siguió liberándose desde estos hacia el citosol (Figura 92). Estos cambios se aprecian a simple vista en la Figura 93. A pesar de esto, las diferencias entre el control y las muestras expuestas al fármaco no fueron estadísticamente significativas. Se requiere de un estudio más profundo de este fenómeno, empleando un mayor tamaño muestral.

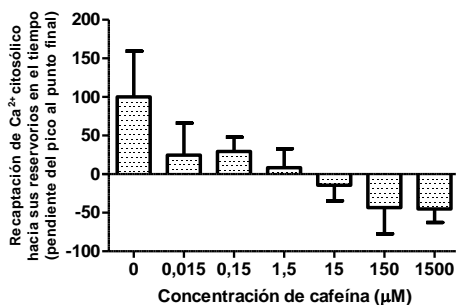
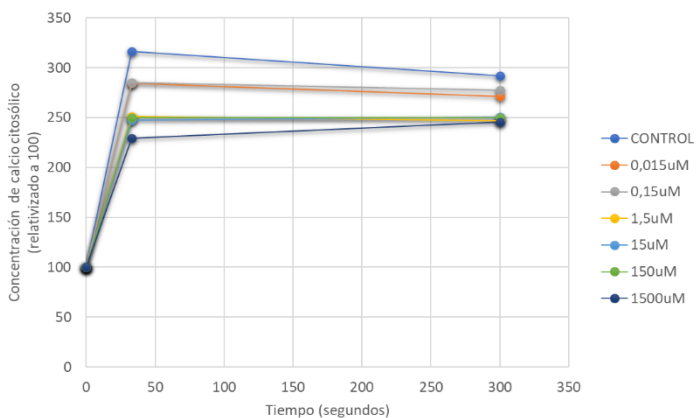


Figura 92. La cafeína redujo la velocidad de recaptación del calcio desde el citosol hacia sus reservorios intraplaquetarios, aunque no significativamente ( $p \geq 0,05$ ).

Figura 93. Representación gráfica de la evolución de la concentración de calcio citosólico en el tiempo en la muestra control y en las muestras expuestas a diferentes concentraciones de cafeína (de 0,015  $\mu\text{M}$  a 1,5 mM).



Puesto que en las plaquetas expuestas a cafeína, la liberación de calcio hacia el citosol al activar las plaquetas fue menor, también observamos una concentración de calcio citosólico inferior a punto final (Figura 94).

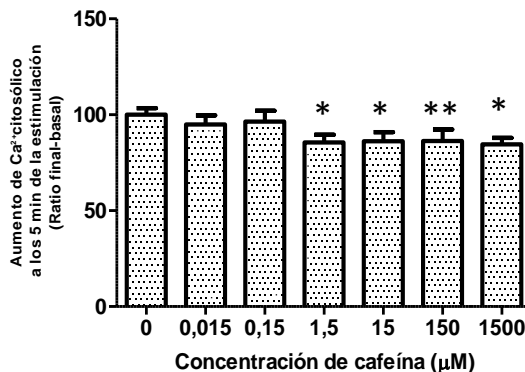


Figura 94. La cafeína redujo de forma significativa la concentración final de calcio citosólico en la plaqueta a 1,5μM ( $p=0,02^*$ ), 15μM ( $p=0,042^*$ ), 150μM ( $p=0,008^{**}$ ) y 1,5 mM ( $p=0,01^*$ ) (empleando t-test).

- **Efectos de la cafeína sobre la exposición de PS y liberación de MPPs.**

- a) **Exposición aguda a la cafeína.**

La exposición aguda a la cafeína produjo una reacción más lenta ante el estímulo en las plaquetas. El compuesto aumentó el tiempo desde la adición del ionóforo hasta la exposición de PS en un  $4\pm 2,5\%$ ,  $7\pm 2,2\%$  y  $8,5\pm 5,9\%$  a las concentraciones de 0,15 μM, 15 μM y 1,5 mM de cafeína respectivamente, aunque no significativamente ( $p\geq 0,05$ ).

Por otro lado, la exposición a la cafeína a las concentraciones de 0,15 μM y 15 μM redujo significativamente la exposición de la PS tras estimular con ionóforo de calcio. Este efecto no fue significativo estadísticamente a la concentración más alta del fármaco (1,5 mM) debido a la mayor variabilidad de los datos. Empleando como medida el ratio o cociente entre el punto máximo inicial y el punto basal de IMF Anexina-V, la exposición de PS se redujo en un  $55\pm 5\%$  a 0,15 μM ( $p=0,009^{**}$ ),  $42,6\pm 2\%$  a 15 μM ( $p=0,002^{**}$ ) y  $19,5\pm 19\%$  a 1,5 mM ( $p\geq 0,05$ ).

respecto al control. Empleando el delta o diferencial, este efecto fue dosis-dependiente ( $p=0,038$ ) y la disminución en la exposición de la PS fue de un  $36\pm 9,9\%$  a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p=0,01^*$ ) y  $25\pm 6,2\%$  a  $15 \mu\text{M}$  ( $p=0,0175^*$ ). Estas diferencias se aprecian fácilmente en la Figura 95.

La velocidad de exposición de PS fue un  $45\pm 3,5\%$  menor en las muestras expuestas a  $0,15 \mu\text{M}$  de cafeína ( $p<0,0001$ ),  $40\pm 4\%$  menor a  $15 \mu\text{M}$  ( $p<0,0001$ ) y  $16\pm 7\%$  a  $1,5 \text{ mM}$  ( $p=0,04$ ). El efecto fue dosis-dependiente ( $p=0,007$ ) (Figura 95 y 96).

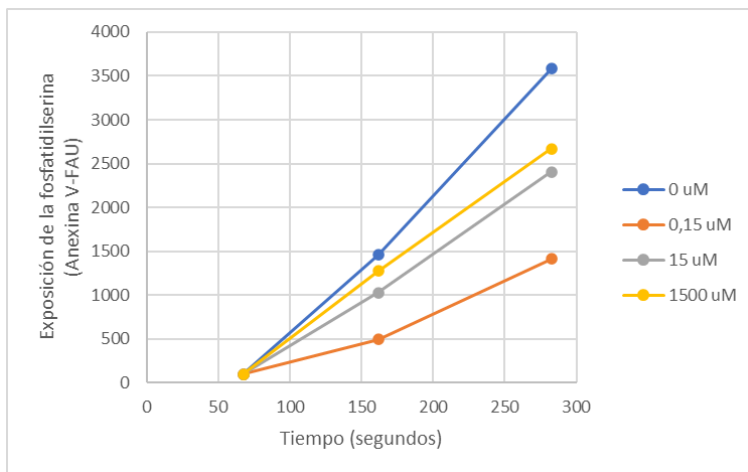


Figura 95. Representación gráfica de la pendiente positiva de IMF de Anexina V en el tiempo, debido a la expresión de la PS y formación de MPPs. Se observa una disminución de dicha pendiente en las muestras expuestas a la cafeína.

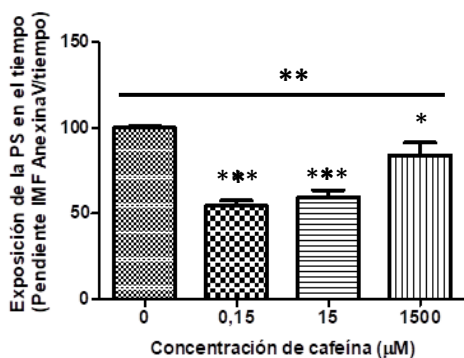


Figura 96. La cafeína redujo significativamente la velocidad de exposición de PS y liberación de MPPs ( $p=0,007^{**}$ , empleando ANOVA), especialmente a las concentraciones de  $0,15 \mu\text{M}$  y  $15 \mu\text{M}$  ( $p\leq 0,05^*$ ). Empleando t- test este efecto fue significativo a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p<0,0001^{***}$ ),  $15 \mu\text{M}$  ( $p<0,0001^{***}$ ) y  $1,5 \text{ mM}$  ( $p=0,04^*$ ).

Como es lógico, el valor de exposición de PS a punto final también fue menor en las muestras expuestas a la cafeína que en los controles. Este efecto fue visible empleando tanto el ratio como el delta entre la IMF de Anexina-V en el punto final y basal. En ambos casos las diferencias fueron estadísticamente significativas empleando ANOVA ( $p=0,014^*$  y  $p=0,0065^{**}$  respectivamente) y t-test. Empleando el ratio, el valor de exposición de PS a punto final en las muestras tratadas con cafeína disminuyó respecto al control en un  $60\pm 4\%$  a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p=0,0011^{**}$ ),  $49\pm 5,6\%$  a  $15 \mu\text{M}$  ( $p=0,0003^{**}$ ) y  $23\pm 9,2\%$  a  $1,5 \text{ mM}$  ( $p\geq 0,05$ ). Empleando el delta la reducción fue de un  $44\pm 2,5\%$  a  $0,15 \mu\text{M}$  ( $p<0,0001^{***}$ ),  $39\pm 2,4\%$  a  $15 \mu\text{M}$  ( $p<0,0001^{***}$ ) y  $9\pm 2,3\%$  a  $1,5 \text{ mM}$  ( $p=0,01^*$ ) (Figura 95).

#### **b) Exposición durante 24 horas a la cafeína.**

Tras 24 horas de incubación, no observamos diferencias estadísticamente significativas en la exposición de la superficie procoagulante y liberación de MPPs entre las muestras control y las expuestas a cafeína.

Contemplando conjuntamente los resultados, podemos determinar que la cafeína interfiere negativamente en la activación de las plaquetas de los delfines. Este efecto se ha observado previamente en mamíferos terrestres como seres humanos, ratas o ratones y parece estar relacionado con la acción inhibitoria de la cafeína sobre la enzima fosfodiesterasa (PDE). En condiciones normales, la función de la PDE es degradar el AMPc, que como sabemos, es un inhibidor de la activación plaquetaria. Si la PDE se encuentra inhibida, los niveles de AMPc se elevan impidiendo la normal activación de las plaquetas ante estímulos como el ADP o el ionóforo de calcio (Montoya et al., 2013; Morse, 1997; Marquis, et al., 1969; Boswell-Smith et al., 2006; Olas y Brys, 2019).

Otro posible mecanismo de acción es el bloqueo por parte de la cafeína de los receptores de adenosina A2a, lo cual deriva también en un aumento en los niveles de AMPc (Varani et al., 1999).

El efecto inhibitorio de la activación plaquetaria de la cafeína está ampliamente aceptado por la comunidad científica y respaldado por numerosos estudios previos. Tanto es así, que incluso en algunos estudios se ha llegado a emplear este compuesto como control de inhibición de activación plaquetaria (Vincent et al., 1975).

Curiosamente, en los estudios de producción de MPPs los efectos son más notorios cuanto menor es la concentración del fármaco empleada. A este respecto, el estudio de Rein et al.,(2000) proporciona información interesante. En dicho trabajo observaron que el consumo de la cafeína contenida en una bebida energética (aproximadamente 400  $\mu\text{M}$  de cafeína) aumentó significativamente la producción de MPPs en los individuos humanos testados. El mecanismo de acción no es bien conocido y no existen trabajos específicos al respecto, sin embargo, estos datos nos sugieren que a concentraciones altas la cafeína podría tener cierto efecto estimulante en la producción de MPPs, mientras que a dosis bajas los efectos inhibidores de la activación conllevan una disminución en la expresión de la superficie procoagulante y liberación de micropartículas. La escasa bibliografía previa sobre el tema hace necesario un estudio más detallado al respecto, sin embargo, es muy posible que también existan diferencias debidas a la especie, siguiendo por ejemplo con la hipótesis anteriormente mencionada en relación a los receptores de adenosina A2a.

### ***5.2.3 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines sanos.***

#### **5.2.3.1 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad inmunitaria.**

##### ***▪ Efectos de la aspirina sobre la viabilidad de los leucocitos.***

No se observaron efectos estadísticamente significativos de la aspirina sobre la viabilidad celular.

##### ***▪ Efectos de la aspirina sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de leucocitos.***

La aspirina hiperpolarizó significativamente la membrana mitocondrial a todas las concentraciones estudiadas excepto a  $2\mu\text{M}$ , donde la variabilidad de los datos es elevada (Figura 97). Para esclarecer su efecto a esa dosis debemos ampliar el tamaño muestral. En concreto, el aumento del PMM respecto al control fue de un  $28,8\pm 9\%$  a  $0,02$  ( $p=0,036$ ),  $17\pm 3,8\%$  a  $0,2\mu\text{M}$  ( $p=0,012$ ),  $25\pm 10,8\%$  a  $2\mu\text{M}$  ( $p\geq 0,05$ ),  $21\pm 0,5\%$  a  $20\mu\text{M}$  ( $p<0,0001$ ) y  $19,5\pm 3\%$  a  $200\mu\text{M}$  ( $p=0,0035$ ).

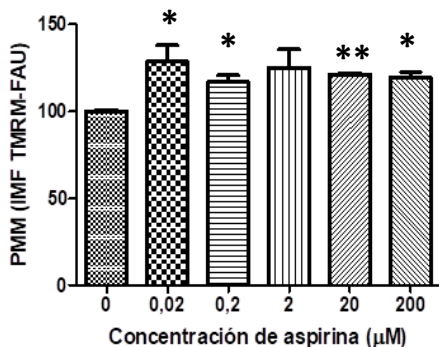


Figura 97. La aspirina aumentó significativamente el PMM de los leucocitos de delfines a todas las concentraciones excepto a 2 µM ( $p \leq 0,05^*$ ), y especialmente a 20 µM ( $p \leq 0,01^{**}$ ). Se empleó t-test como análisis estadístico.

▪ **Efectos de la aspirina sobre la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.**

A 200 µM, la aspirina redujo ligera, pero significativamente, la capacidad de ingestión del patógeno en un  $10 \pm 2,8\%$  ( $p=0,02$ ) y la capacidad para producir el estallido respiratorio en un  $20 \pm 7\%$  ( $p=0,02$ ) (Figura 98).

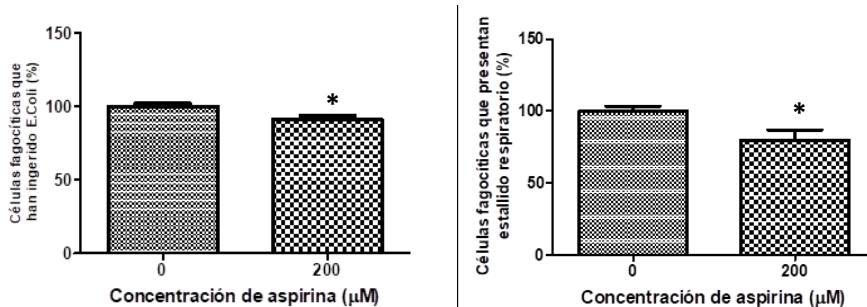


Figura 98. A 200 µM, la aspirina redujo significativamente la capacidad de las células fagocíticas para ingerir el patógeno ( $p=0,02^*$ ) y para producir el estallido respiratorio ( $p=0,02^*$ ).



Este efecto se ha observado anteriormente en ratones o humanos tratados con aspirina (Jaaved et al., 2011). En cuanto al mecanismo de acción, la aspirina posee efectos antiinflamatorios mediados por la inhibición de la COX, lo que impide que el ácido araquidónico (AA) se transforme en prostaglandinas y tromboxanos, los cuales, como sabemos, son mediadores de la inflamación (Katler y Weissmann, 1977; Morris et al., 2015) (Figura 75).

Por otro lado, la aspirina puede atenuar la producción de óxido nítrico (NO), tóxico generado durante la fagocitosis para destruir al patógeno (Cho, 2007).

También se ha descrito que este fármaco potencia la acción de la lipoxina A4 (Wu et al., 2012; Morris et al., 2015), un compuesto generado a partir del AA a través de la vía de la lipooxigenasa y que posee efectos antiinflamatorios. En concreto, la lipoxina A4 inhibe la acción de la NADPH oxidasa, que como hemos detallado en la Introducción, juega un papel fundamental durante el estallido respiratorio.

▪ ***Efectos de la aspirina sobre la producción de citoquinas.***

La aspirina produjo un aumento en la liberación de IL-1ra, IL-13, IL-17, IP-10 y TNFa, mientras que redujo la liberación de IL-6 e IL-8. En todos los casos, la bibliografía previa referente a humanos concuerda (von Känel et al., 2008; Johnson et al., 2009; Ogata et al., 2016), excepto en el caso de la IL-17, que en delfines responde de forma contraria (Moon et al., 2013) (Figura 117).

▪ ***Efectos de la aspirina sobre el estado redox de monocitos y granulocitos.***

A pesar de que a 200  $\mu$ M, la aspirina redujo la producción del estallido respiratorio en los fagocitos, en reposo aumentó su estrés oxidativo. Concretamente, lo aumentó en un  $51 \pm 14\%$  con respecto al control sin aspirina ( $p=0,01$ ) (Figura 99).

El mecanismo por el cual ocurre este efecto lo desconocemos. Se requiere de un estudio más profundo sobre el tema para determinar las vías por las cuales la aspirina aumenta el estrés oxidativo en los leucocitos de delfines. En seres humanos se ha descrito este efecto de la aspirina en determinadas células tumorales o en desórdenes inflamatorios, en los que tratamientos con 5-10  $\mu$ mol/ml de aspirina durante 24-48h indujeron estrés oxidativo a través del aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Raza et al., 2011). Si

bien el mecanismo de acción no está muy claro, en este trabajo se propone que el efecto pro-oxidativo de la aspirina no es dependiente de la vía de la ciclooxygenasa, si no que está relacionado con la peroxidación lipídica (Raza et al., 2011; Raza y John, 2012).

Una posible hipótesis consistiría en que la hiperpolarización de la membrana mitocondrial derivada de la acción de la aspirina tenga como consecuencia un aumento de la producción de ROS por parte del complejo III de la cadena respiratoria. Este efecto no se ha descrito en mamíferos terrestres, pero se conoce que la sangre de los mamíferos marinos posee un mayor contenido en componentes y peróxidos lipídicos y determinadas lipoproteínas que la de los mamíferos terrestres (Kasamatsu et al., 2008) por lo que quizás sus mitocondrias sean más resistentes a cambios en la peroxidación lipídica.

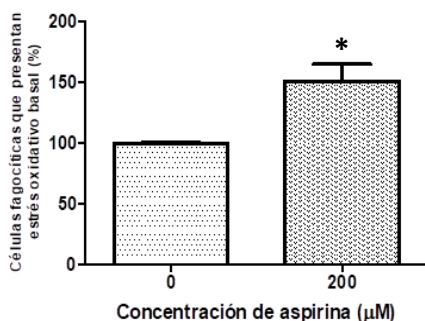


Figura 99.A 200 μM, la aspirina aumentó significativamente el porcentaje de células fagocíticas presentando estrés oxidativo basal ( $p=0,01^*$ ).

▪ **Efectos de la aspirina sobre la proliferación de los linfocitos.**

No observamos efectos significativos de la aspirina sobre la proliferación de los linfocitos en delfines.

### 5.2.3.2 Efectos de la aspirina sobre la funcionalidad plaquetaria.

- *Efectos de la aspirina sobre la movilización de calcio intraplaquetario.*

#### a) Exposición aguda a la aspirina.

La aspirina redujo el recuento plaquetario por  $\mu\text{L}$  de sangre ( $p=0,03$ ). En concreto, la disminución fue de un  $13\pm 3,5\%$  a  $0,02\mu\text{M}$  ( $p=0,0055$ ),  $9\pm 3\%$  a  $2\mu\text{M}$  ( $p=0,01$ ) y  $10,5\pm 3,8\%$  a  $200\mu\text{M}$  ( $p=0,02$ ) (Figura 100).

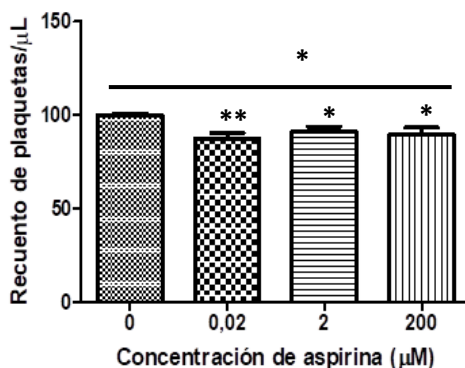


Figura 100. La aspirina redujo significativamente el recuento de plaquetas por  $\mu\text{L}$  ( $p=0,03^*$ , empleando ANOVA). Empleando t-test las diferencias se observaron a  $0,02\mu\text{M}$  ( $p=0,005^{**}$ ),  $2\mu\text{M}$  ( $p=0,01^*$ ) y  $200\mu\text{M}$  ( $p=0,02^*$ ).

La aspirina es capaz de inducir la muerte de las plaquetas en otras especies de mamíferos. Los AINEs producen este efecto a través de la inhibición de la COX-1, produciendo una acumulación de ácido araquidónico (AA) que al interactuar con la glicoproteína GPIIb/IIIa de las plaquetas y determinadas proteínas induce su apoptosis (van der Wal et al., 2012). Fisiológicamente, las plaquetas mueren al finalizar su vida útil mediante una vía intrínseca apoptótica que implica proteínas de la familia Bcl-2 (Mason et al., 2007). Esta vía también se

induce por la acumulación del AA en la plaqueta, que deriva en la activación de una de estas proteínas proapoptóticas (Bax), la cual promueve la fagocitosis de las plaquetas (Nayak et al., 2014) (Figura 101).

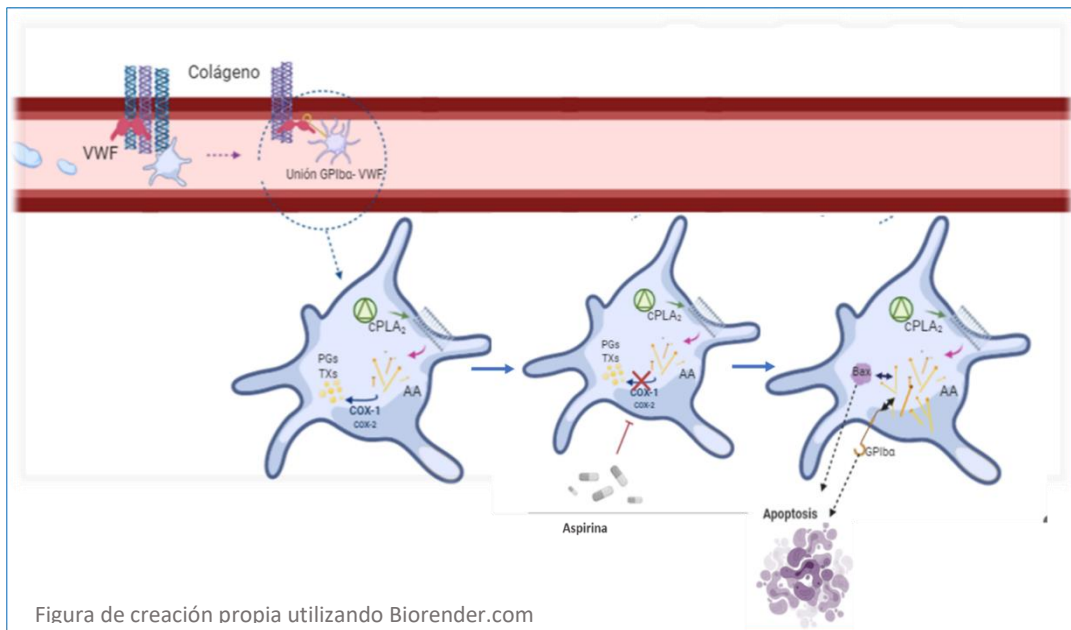


Figura 101. Proceso por el cual la aspirina induce la muerte de las plaquetas. En la primera plaqueta observamos el proceso de activación normal en una plaqueta sana. Al activarse, la plaqueta activa la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que promueve la liberación del ácido araquidónico (AA) desde los fosfolípidos de la membrana plaquetaria. Estos se introducen en la vía de la ciclooxygenasa formándose las prostaglandinas y los tromboxanos que promueven aún más la activación de las plaquetas. En las siguientes figuras representamos la inhibición de la COX por parte de la aspirina, con la consiguiente acumulación de AA, el cual interacciona con la proteína proapoptótica Bax y GPIIb/IIIa induciendo la apoptosis de las plaquetas.

La exposición aguda a la aspirina redujo el tiempo de respuesta de las plaquetas ante el estímulo (ADP) en un 15% ( $p=0,014$ ) (Figura 102).

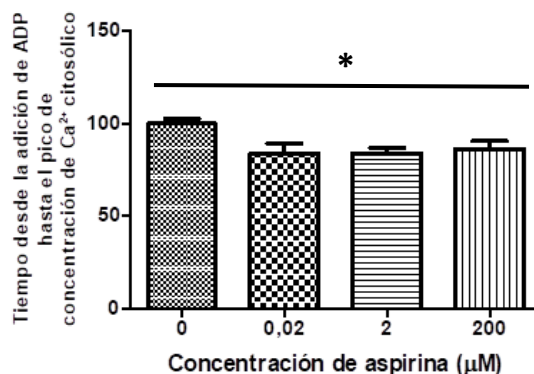


Figura 102. La exposición aguda a la aspirina redujo de forma estadísticamente significativa el tiempo desde la aplicación del estímulo (ADP) hasta el aumento máximo de calcio citosólico ( $p=0,014^*$ , empleando ANOVA).

Si bien no se observaron diferencias significativas en la movilización del calcio intraplaquetario entre las muestras expuestas a la aspirina y las muestras control, sí que se observan ciertas tendencias, especialmente a la concentración más alta. Por un lado, una menor liberación de calcio hacia el citosol al activar las plaquetas y una disminución en su posterior recaptación hacia los reservorios internos (Figura 103).

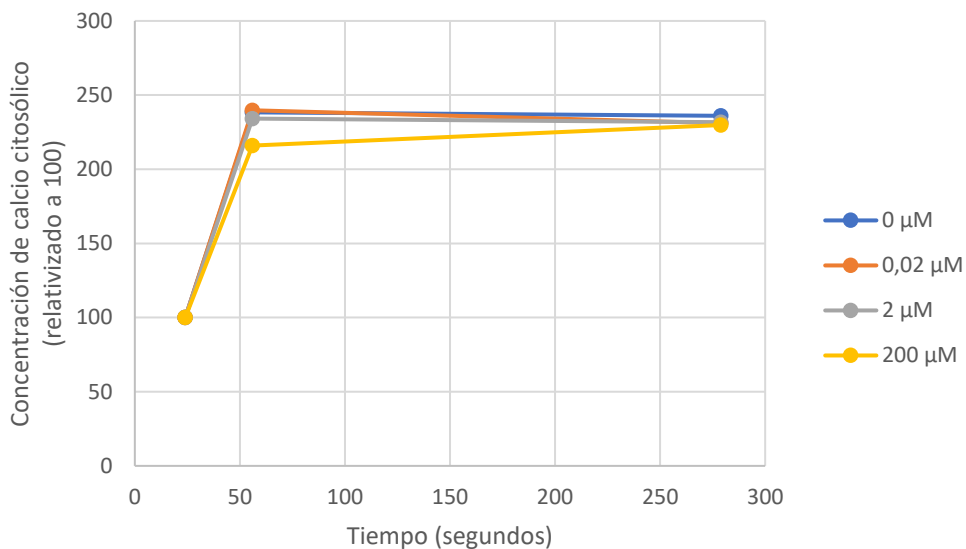


Figura 103. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo tras activar las plaquetas a los 35 segundos, en las muestras control y expuestas a aspirina de forma aguda.

**b) Exposición durante 24 horas a la aspirina.**

Tras 24 horas de exposición al fármaco, ni el recuento de plaquetas ni el tiempo de respuesta ante el ADP se vieron afectados.

De nuevo, la liberación de  $Ca^{2+}$  hacia el citosol tras activar las plaquetas parece reducirse en las muestras expuestas al fármaco, aunque no de forma estadísticamente significativa. La posterior recaptación del calcio hacia sus reservorios se redujo significativamente a la dosis más altas del fármaco ( $p=0,02$ ) (Figura 104).

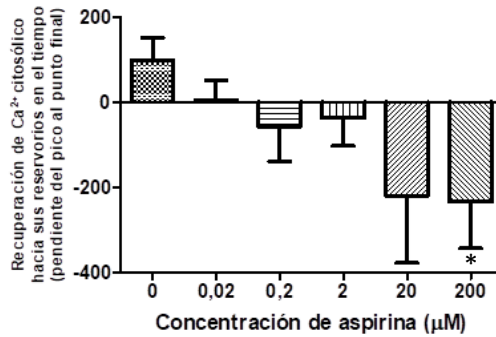


Figura 104. A 200 µM, la aspirina redujo la velocidad de recaptación del calcio hacia sus reservorios internos con respecto a las muestras control ( $p=0,02^*$ ).

Los efectos sobre la activación plaquetaria tras la exposición durante 24 horas a la aspirina se grafican en la Figura 105.

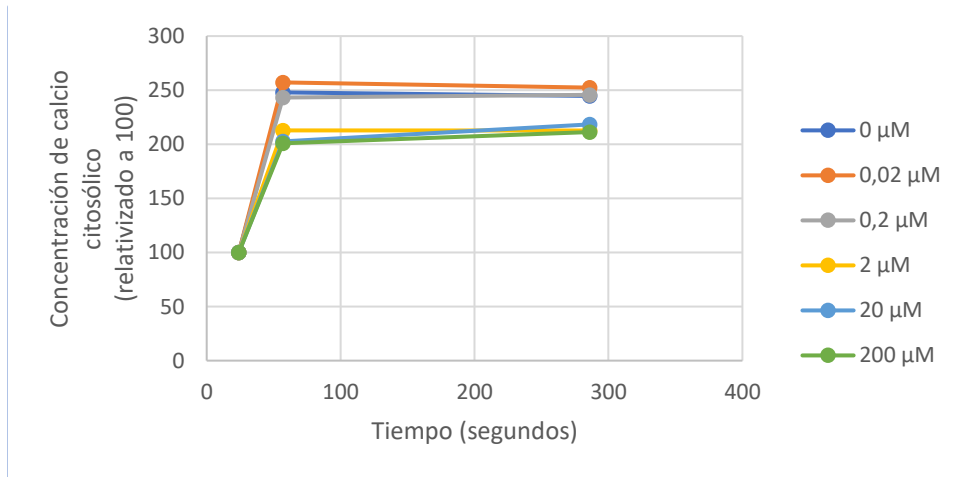


Figura 105. Cambios en la concentración de calcio citosólico en el tiempo tras activar las plaquetas a los 35 segundos, en las muestras control y expuestas a aspirina durante 24 horas.

Al igual que el ibuprofeno, la aspirina bloquea la unión del ácido araquidónico a la COX-1, inhibiendo por tanto su transformación en endoperóxidos, que posteriormente se transforman en prostaglandinas y tromboxanos (Driver et al., 2019). El tromboxano A<sub>2</sub> toma especial relevancia en este punto, ya que, al contrario que ciertas prostaglandinas, promueve la liberación de calcio al citosol de las plaquetas, con el consiguiente cambio de forma, agregación plaquetaria, secreción de gránulos y formación del tapón hemostático. Los gránulos que se liberan contienen también ADP, potenciándose aún más la activación plaquetaria por medio de la movilización del calcio (Monteiro et al., 2001) (Figura 87). Es posible que en nuestro estudio las diferencias no sean estadísticamente significativas debido a que al aplicar ADP como estímulo, enmascaramos uno de los efectos que produce el fármaco, que es la inhibición de la liberación de los gránulos densos que contienen ADP.

- ***Efectos de la aspirina sobre la exposición de fosfatidilserina y liberación de micropartículas plaquetarias.***

- a) **Exposición aguda a la aspirina.**

El tiempo de respuesta de las plaquetas ante el estímulo fue significativamente menor en las muestras expuestas a la aspirina que en los controles. Concretamente, un 78±3% más rápido a 0,02 μM, 74±7,2% a 2 μM y 81±0,01% a 200 μM (p<0,0001 en cada caso) (Figura 106).

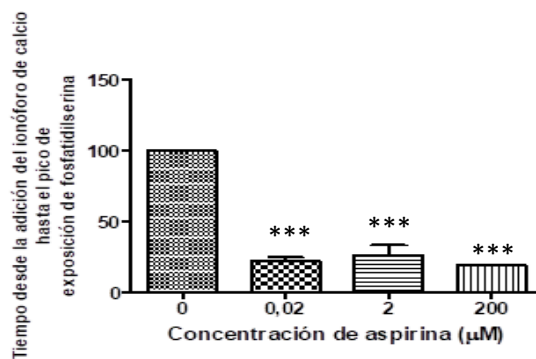


Figura 106. El tiempo que tardaron en estimularse las plaquetas se redujo significativamente en las muestras tratadas con la aspirina (p<0,0001\*\*\*).



Por otro lado, la velocidad a la que se formaron las MPPs tras la estimulación con A23187 fue significativamente menor en las muestras tratadas con aspirina que en las muestras control. Esto queda patente midiendo la velocidad a la que la señal FSC disminuye al pasar de plaquetas a MPPs. En concreto, la producción de MPPs fue un  $50\pm 18,5$  más lenta en las muestras expuestas a  $0,02\mu\text{M}$  que en los controles ( $p=0,036^*$ ) y un  $38\pm 0,06$  más lenta a  $2\mu\text{M}$  ( $p=0,0006^{***}$ ). A  $200\mu\text{M}$ , la velocidad se redujo en un 40%, aunque no significativamente, debido a la elevada variabilidad de sus datos ( $\pm 29$ ) (Figura 107).

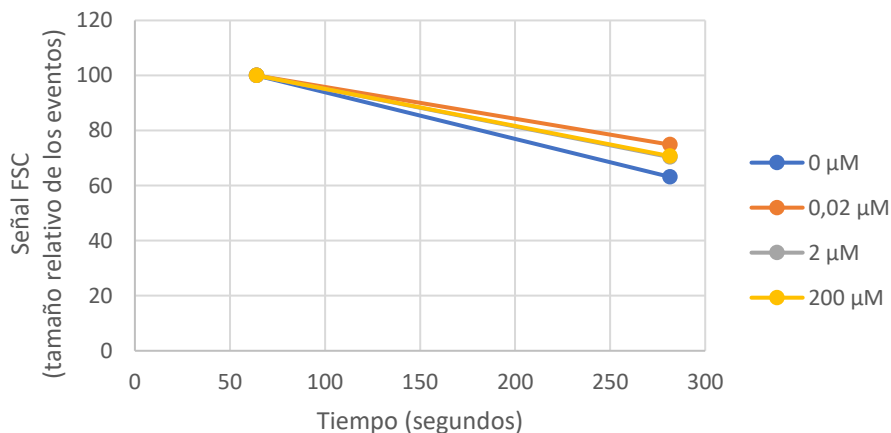


Figura 107. La velocidad a la que se redujo la señal FSC (formación de MPPs) fue inferior en las muestras tratadas con aspirina que en las muestras control.

### b) Exposición durante 24 horas a la aspirina.

Tras 24 horas de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje final de MPPs entre las muestras control y las expuestas a la aspirina.

La velocidad a la que se expuso la PS a la cara externa tras estimular con ionóforo de calcio A23187 disminuyó en las muestras tratadas con aspirina. En concreto, disminuyó un  $19,2\pm 4,6\%$  a  $2\mu\text{M}$  ( $p=0,04$ ) y un  $34,5\pm 8,5\%$  a  $200\mu\text{M}$  ( $p=0,02$ ) (Figura108).

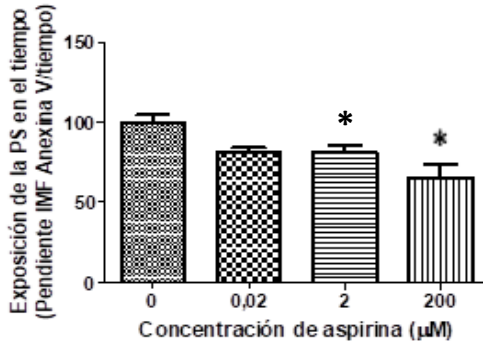


Figura 108. La velocidad de exposición de la PS tras estimula las plaquetas se redujo significativamente a 2 µM ( $p=0,04^*$ ) y 200 µM ( $p=0,02^*$ ).

El efecto de la aspirina sobre la liberación de MPPs ha sido escasamente estudiado anteriormente. Existen estudios previos en los que se ha documentado el efecto inhibitor de la aspirina en este proceso en humanos, pero en otros estudios no se han observado efectos (Driver et al., 2019). Las tendencias observadas en nuestro estudio deben explicarse por el mismo mecanismo por el cual la aspirina reduce la movilización de calcio intraplaquetario, bloqueando la acción de la ciclooxigenasa.

#### 5.2.4 Efectos del paracetamol (acetaminofén) sobre la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de delfines.

##### 5.2.4.1 Efectos del paracetamol sobre la funcionalidad inmunitaria.

###### ▪ Efectos del paracetamol sobre la viabilidad de los leucocitos.

Tras 24 horas de incubación con el paracetamol, la viabilidad de los leucocitos de los delfines se redujo significativamente. El porcentaje de células vivas se redujo de forma dosis-dependiente en comparación con la muestra control ( $p=0,0068$ , empleando ANOVA), especialmente a 100µM ( $p\leq 0,05^*$ ) y 1 mM ( $p<0,01^{**}$ ). El porcentaje de leucocitos en

apoptosis tardía aumentó significativamente ( $p=0,0029$ , empleando ANOVA), especialmente a  $100\mu\text{M}$  ( $p\leq 0,05^*$ ) y  $1\text{ mM}$  ( $p\leq 0,01^{**}$ ).

En la Figura 109 se aprecia la disminución en la densidad de eventos en la región de células vivas en la muestra expuesta a  $1\text{ mM}$  de paracetamol, así como la aparición de una nueva población, muy positiva para la fluorescencia de la Anexina-V y del PI (apoptóticas tardías mezcladas con algunas necróticas).

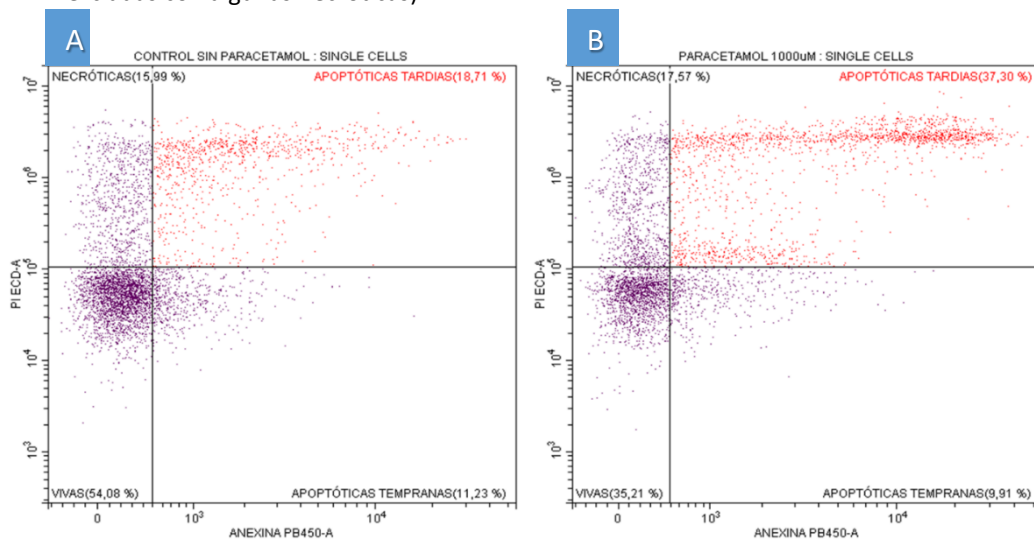


Figura 109. Tras 24 horas de incubación se apreciaron cambios visibles en el citómetro de flujo: (A) Muestra control. (B) Muestra tratada con  $1\text{ mM}$  de paracetamol, donde se aprecia una nueva población muy positiva para la fluorescencia de la Anexina- V y el PI.

Concretamente, el paracetamol redujo el porcentaje de células vivas un  $18\pm 3,2\%$  a  $0,01\mu\text{M}$  ( $p=0,0014$ ),  $11,6\pm 3,4\%$  a  $0,1\mu\text{M}$  ( $p=0,0095$ ),  $16,4\pm 2,2\%$  a  $1\mu\text{M}$  ( $p=0,0004$ ),  $19\pm 6,5\%$  a  $10\mu\text{M}$  ( $p=0,02$ ),  $37,5\pm 11,6$  a  $100\mu\text{M}$  ( $p=0,018$ ) y  $46\pm 7,3\%$  a  $1000\mu\text{M}$  ( $p=0,0008$ ) (Figura 110).

El porcentaje de células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas aumentó en las muestras tratadas con el fármaco, sin embargo, solo fue estadísticamente significativo en el caso de las dobles positivas (apoptóticas tardías mezcladas con necróticas). Este porcentaje aumentó en un  $25,3\pm 6,7\%$  a  $0,01\mu\text{M}$  de paracetamol ( $p=0,0095$ ),  $19,5\pm 4\%$  a  $0,1\mu\text{M}$

( $p=0,0022$ ),  $24\pm 4\%$  a  $1\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0013$ ),  $27\pm 8,5\%$  a  $10\ \mu\text{M}$  ( $p=0,018$ ),  $67\pm 14,6\%$  a  $100\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0038$ ) y  $97,5\pm 19,3\%$  a  $1000\ \mu\text{M}$  ( $p=0,002$ ) (Figura 110).

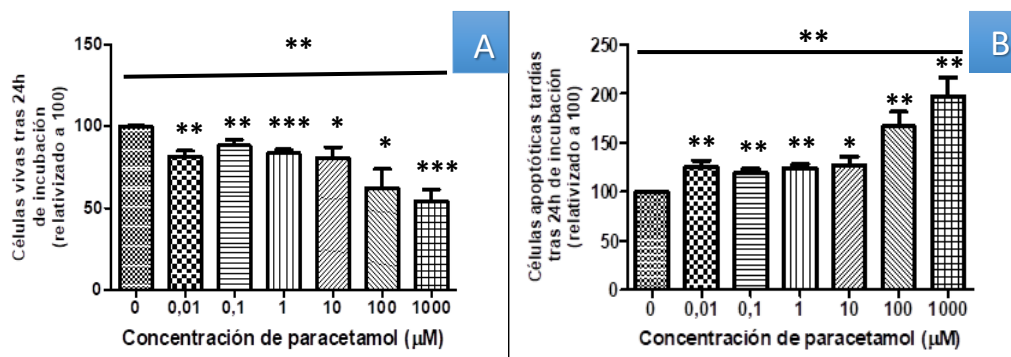


Figura 110. (A) El paracetamol redujo el % de células vivas en comparación con la muestra control de forma dosis-dependiente ( $p=0,0068^{**}$ , empleando ANOVA). Empleando t-test se observaron diferencias a  $0,01\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0014^{**}$ ),  $0,1\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0095^{**}$ ),  $1\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0004^{***}$ ),  $10\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0^{*2}$ ),  $100\ \mu\text{M}$  ( $p=0,018^{*}$ ) y  $1\ \text{mM}$  ( $p=0,0008^{***}$ ). (B) El paracetamol aumentó el % de células apoptóticas tardías de forma dosis-dependiente ( $p=0,0029^{**}$ , empleando ANOVA). Empleando t-test se observaron diferencias a  $0,01\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0095^{**}$ ),  $0,1\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0022^{**}$ ),  $1\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0013^{**}$ ),  $10\ \mu\text{M}$  ( $p=0,018^{*}$ ),  $100\ \mu\text{M}$  ( $p=0,0038^{**}$ ) y  $1\ \text{mM}$  ( $p=0,002^{**}$ ).

La leucopenia ha sido ampliamente descrita en pacientes humanos tratados con paracetamol, de hecho, aparece como uno de los posibles efectos adversos del fármaco en su prospecto. La agranulocitosis, monocitopenia, linfopenia, disminución en la concentración sanguínea de linfocitos Natural Killers e incluso la anemia y trombocitopenia han sido descritas en numerosos casos clínicos de pacientes o ratones que recibieron una dosis alta de paracetamol (superior a la recomendada) (Lacotte et al., 1990; Lloyd, 1961; Moore et al., 2017; Gürsoy et al., 1996; Piperno et al., 1978).

El mecanismo de acción por el cual el paracetamol induce la apoptosis de las células es complejo y parece abarcar diversas vías. Por un lado, el paracetamol puede inhibir la síntesis de ADN y el crecimiento celular en determinadas líneas celulares, interfiriendo en la señalización de factores de crecimiento y en la expresión del gen *c-myc*, que interviene en el progreso de la célula de la fase  $G_0$  a  $G_1$  durante el ciclo celular (Boulares et al., 1999). Los efectos genotóxicos del paracetamol también se han descrito en linfocitos humanos a

concentraciones del fármaco similares a las empleadas en nuestro estudio (Ibrulj et al., 2007). También se ha documentado la inducción de la fragmentación del ADN en hepatocitos por parte del fármaco mediante aumentos excesivos y rápidos en la concentración de calcio intracelular (Ray et al., 1990). Otros posibles mecanismos de acción que se han barajado han sido la inducción de daño oxidativo (Binková et al., 1990) o el agotamiento del glutatión de las células por efecto del compuesto (Spielberg et al., 1980).

Sin embargo, el mecanismo de acción que se ha estudiado en mayor profundidad los últimos años es el propuesto por Boulares et al, en 2001. Este grupo describió los efectos del paracetamol sobre la viabilidad de células de hepatoma humano y linfocitos humanos, así como sobre timocitos, o líneas celulares de carcinomas o adenocarcinomas (Boulares et al, en 2004). Boulares A.H, et al, observaron que, tras 8 horas de tratamiento con el fármaco a 10 mM, los linfocitos humanos comenzaban a presentar signos de asimetría en los fosfolípidos de membrana, asociándose a una apoptosis temprana, y que tras 24 horas de tratamiento las células se encontraban en fase de apoptosis tardía. Esto concuerda con los datos obtenidos en delfines en esta tesis doctoral, aunque en nuestro caso, los efectos se aprecian a concentraciones de hasta  $10^6$  veces inferiores. En su trabajo no se emplearon otras concentraciones del fármaco, con que quizás estos efectos también se conserven dosis bajas en células humanas.

Concretamente, tras 24 horas de tratamiento con el paracetamol (10 mM), observaron una reducción del 50% en la viabilidad de los leucocitos (Boulares et al, en 2001), efecto similar al que apreciamos en los delfines a la concentración más alta de paracetamol empleada en nuestro estudio (1 mM). Determinaron que el paracetamol promueve la liberación del citocromo c al citosol desde el espacio intermembranoso de la mitocondria, uno de los pasos claves en la cascada apoptótica (Green y Reed, 1998). En el citosol, el citocromo c interacciona con diversos compuestos, entre ellos el ATP<sub>d</sub> y la pro-caspasa 9, resultando en la activación de la caspasa 9, una de las enzimas mediadoras del proceso de apoptosis. La caspasa 9 a su vez provoca la activación de la pro-caspasa 3 a caspasa 3, la cual produce la rotura de la enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa, esencial en la reparación del ADN dañado entre otras cosas. La caspasa 3 es una de las enzimas requeridas en el proceso de fragmentación de ADN durante la apoptosis (Janicke et al., 1998). Su activación por parte del paracetamol, así como la consecuente rotura de la enzima poli-(ADP-ribosa)-polimerasa, producen la fragmentación del ADN celular en las muestras tratadas con el fármaco. La

caspasa 3 además promueve la activación de la caspasa 8. Por último, la proteína Lamin-B<sub>1</sub> (responsable de la integridad de la cromatina) también parece quebrarse durante la apoptosis celular inducida por el paracetamol (Boulares et al, en 2001) (Figura 111).

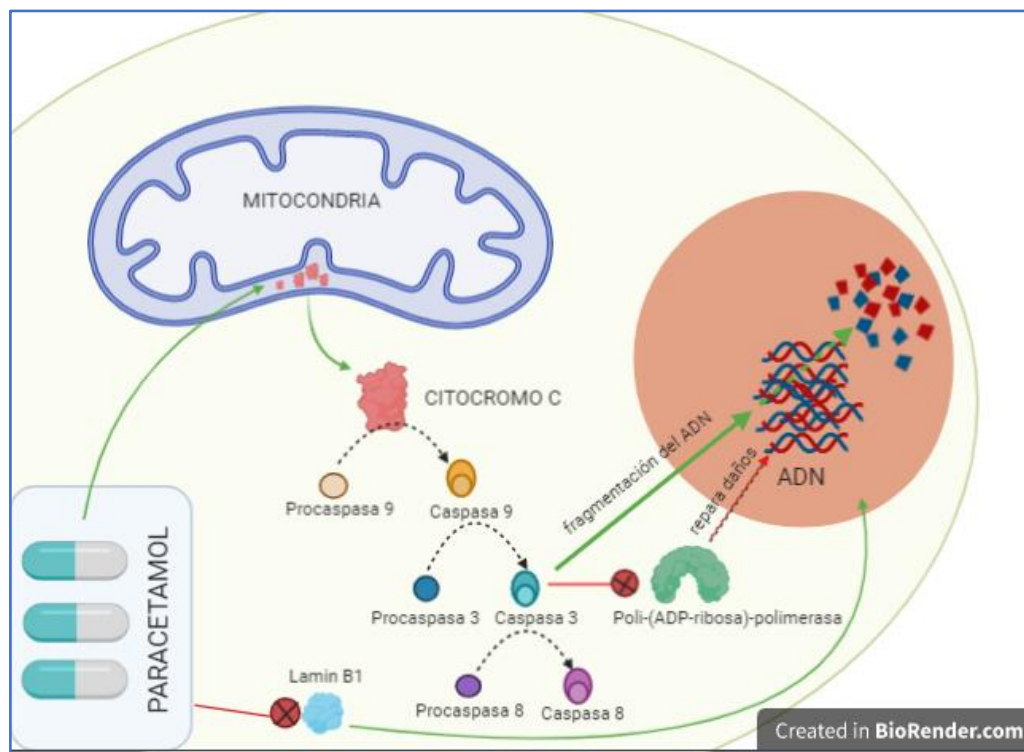


Figura 111. El paracetamol promueve la liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citosol, donde activa la procaspasa 9 a caspasa 9, lo cual desencadena la cascada apoptótica mediada por caspasas, promoviendo la fragmentación del ADN celular e inhibiendo la poli-ADP-ribosa-polimerasa, enzima reparadora de los daños en el ADN.

- **Efectos del paracetamol sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM) de leucocitos.**

No observamos diferencias significativas en el PMM leucocitario entre las muestras control y las expuestas al fármaco.

- **Efectos del paracetamol sobre la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos.**

El paracetamol redujo la capacidad de los monocitos y granulocitos para ingerir el patógeno. Empleando ANOVA las diferencias fueron dosis-dependientes ( $p < 0,0001$ ) y significativas a  $100 \mu\text{M}$  ( $p \leq 0,05$ ) y  $1 \text{ mM}$  ( $p < 0,001$ ).

Concretamente, la capacidad para fagocitar el patógeno se redujo en un  $14 \pm 5\%$  a  $0,01 \mu\text{M}$  ( $p = 0,03$ ),  $10,8 \pm 4,4\%$  a  $0,1 \mu\text{M}$  ( $p \geq 0,05$ ),  $3,3 \pm 0,7\%$  a  $1 \mu\text{M}$  ( $p \geq 0,05$ ),  $8 \pm 1,7\%$  a  $10 \mu\text{M}$  ( $p = 0,04$ ),  $27 \pm 2\%$  a  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,0001$ ) y  $56,5 \pm 2\%$  a  $1 \text{ mM}$  ( $p < 0,0001$ ). Estas diferencias se observaron con t-test (Figura 112).

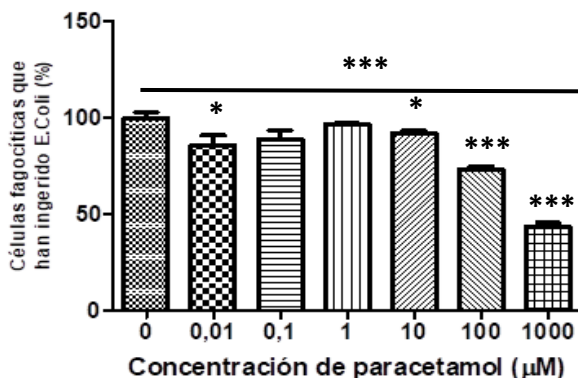


Figura 112. El paracetamol redujo de forma dosis-dependiente la capacidad de ingestión de los monocitos y granulocitos de delfines en comparación con las muestras control ( $p < 0,0001^{***}$ , empleando ANOVA). Empleando t-test, se observaron diferencias a  $0,01 \mu\text{M}$  ( $p = 0,03^*$ ),  $10 \mu\text{M}$  ( $p = 0,04^*$ ),  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0,0001^{***}$ ) y  $1 \text{ mM}$  ( $p < 0,0001^{***}$ ).

Por otro lado, el paracetamol también redujo la capacidad de las células fagocíticas para producir el estallido respiratorio. El efecto fue dosis-dependiente ( $p=0,02$ ), y máximo a 1 mM, donde la disminución fue de un  $37\pm 5\%$  ( $p=0,001$ ) (Figura 113).

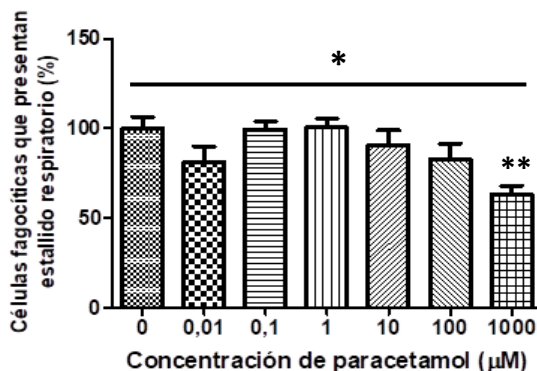


Figura 113. El paracetamol redujo de forma estadísticamente significativa la capacidad destructiva de los monocitos y granulocitos de delfines en comparación con las muestras control.

Los efectos de paracetamol sobre la capacidad fagocítica de monocitos y granulocitos de delfines son similares a los observados en humanos en otros estudios. A la concentración de 1 mM de paracetamol las células fagocíticas humanas mostraron alteraciones similares a los delfines en la capacidad de ingestión (Ruutu y Kosunen, 1972). Este efecto podría estar relacionado con la capacidad del paracetamol para disminuir la afinidad de determinados receptores de la membrana de la célula fagocítica por el patógeno (Abramson, et al.,1990). En otros trabajos, este efecto ocurre a dosis más bajas del fármaco, acompañándose en una disminución en la producción del estallido respiratorio (Freitas et al., 2013; Abramson et al.,1990; Shalabi, 1992).

El paracetamol es capaz de unirse a la mieloperoxidasa (MPO) en el lugar de unión del cloro (Cl), que es el sustrato de dicha enzima, inhibiendo la producción  $\text{OCl}^-$  durante el estallido respiratorio. También se ha descrito la capacidad del paracetamol para inhibir la generación de anión superóxido (Van Zyl, et al., 1989; Abramson et al.,1990).



- ***Efectos del paracetamol sobre la producción de citoquinas.***

El paracetamol aumentó significativamente la liberación de IL-1ra ( $p=0,015$ ), IL-13 ( $p=0,02$ ), IL-17 ( $p=0,009$ ), IP-10 ( $p=0,013$ ) y TNFa ( $p=0,012$ ), mientras que disminuyó la de IL-8 ( $p=0,03$ ) (Figura 118). El aumento de la IL-1 e L-13 tras tratamientos con paracetamol ha sido descrito previamente en humanos, así como la disminución en los niveles de la IL-8 (Ishibe et al., 2009; Wagner et a., 2019; Kim et al., 2013). Sin embargo, el aumento en los niveles del resto de citoquinas solo se ha descrito anteriormente en pacientes con hepatotoxicidad derivada del tratamiento con paracetamol.

- ***Efectos del paracetamol sobre el estado redox de monocitos y granulocitos.***

No se observaron diferencias significativas en el estado redox de los monocitos y granulocitos de los delfines entre las muestras expuestas al paracetamol y las muestras control.

- ***Efectos del paracetamol sobre la proliferación de los linfocitos.***

No observamos que el paracetamol afectara significativamente a la proliferación de los linfocitos en delfines.

#### **5.2.4.2 Efectos del paracetamol sobre la funcionalidad plaquetaria.**

- ***Efectos del paracetamol sobre la movilización de calcio intraplaquetario.***

- a) **Exposición aguda al paracetamol.**

La exposición aguda al paracetamol no produjo efectos estadísticamente significativos en la movilización de calcio intraplaquetario al estimular las plaquetas con ADP. El aumento de calcio citosólico se redujo un  $15\pm 4,6\%$  en las muestras expuestas a  $100\ \mu\text{M}$  de paracetamol y un  $22,7\pm 7,5\%$  a  $1\text{mM}$  respecto a las muestras control (NDS:  $p\geq 0,05$ ).

## b) Exposición durante 24 horas al paracetamol.

Tras 24 horas de incubación con el fármaco, los efectos de este sobre la movilización de calcio intraplaquetario fueron incluso menos notables que en la exposición aguda al fármaco.

- **Efectos del paracetamol sobre la exposición de fosfatidilserina y liberación de micropartículas plaquetarias.**

## a) Exposición aguda al paracetamol.

Los efectos de la exposición aguda al paracetamol sobre la exposición de la PS y la liberación de MPPs fueron detectables, pero en su mayoría no resultaron estadísticamente significativos.

El aumento en la señal de la Anexina-V tras estimular las plaquetas fue inferior y más lento en las muestras tratadas con el fármaco que en las muestras control (NDS:  $p \geq 0,05$ ) (Figura 114). La exposición de PS justo tras añadir el ionóforo de calcio fue de media un  $32,4 \pm 10\%$  menor en las muestras tratadas que en los controles.

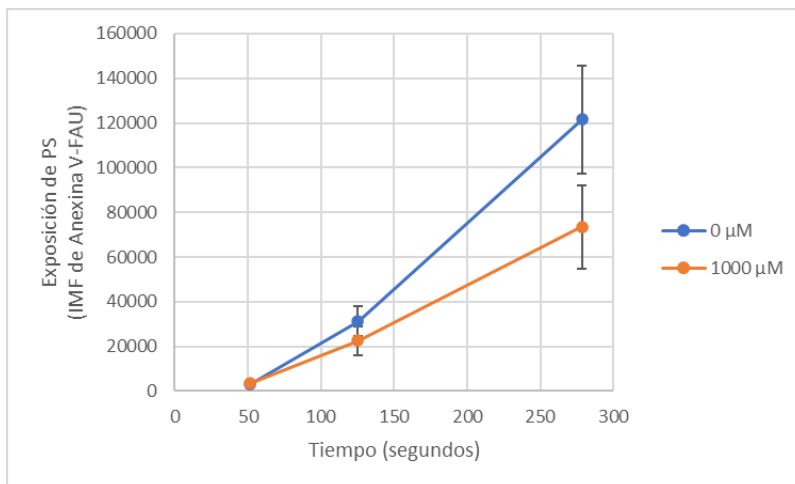


Figura 114. Cambios en el tiempo en la exposición de PS al estimular las plaquetas con ionóforo de calcio. Azul: muestra control. Naranja: Tratamiento agudo con 1 mM de paracetamol.

La velocidad de exposición de la PS y liberación de MPPs fue significativamente inferior en las muestras tratadas con paracetamol que en los controles ( $p=0,032$ ). En concreto, la velocidad disminuyó un  $23,3\pm 8,6\%$  a  $0,01 \mu\text{M}$  ( $p=0,023$ ),  $21 \pm 8,2\%$  a  $0,1 \mu\text{M}$  ( $p=0,032$ ),  $18\pm 3,5\%$  a  $10 \mu\text{M}$  ( $p=0,03$ ) y  $45,4\pm 14\%$  a  $1 \text{mM}$  ( $p=0,0064$ ) (Figura 115).

La exposición de PS a punto final fue menor en las muestras tratadas que en los controles. En concreto, un  $15\pm 5\%$  menor a  $0,01 \mu\text{M}$  ( $p=0,045^*$ ),  $20,7\pm 6,7\%$  a  $0,1 \mu\text{M}$  ( $p=0,032^*$ ),  $17\pm 2,5\%$  a  $10 \mu\text{M}$  ( $p=0,041^*$ ) y  $35,5\pm 19\%$  a  $1 \text{mM}$  ( $p=0,048^*$ ).

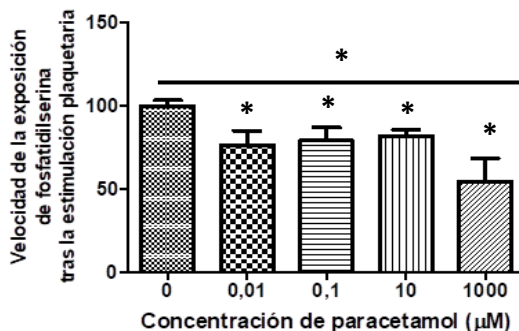


Figura 115. La exposición aguda a paracetamol redujo la velocidad de exposición de la PS tras estimular las plaquetas con ionóforo de calcio A23187 ( $p=0,032^*$ , empleando ANOVA), siendo máximo el efecto a  $1 \text{mM}$  ( $p\leq 0,05^*$ ). Empleando t-test las diferencias fueron significativas a todas las concentraciones ( $p\leq 0,05^*$ ).

#### b) Exposición durante 24 horas al paracetamol.

Tras 24 horas de incubación, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de MPPs entre las muestras control y las expuestas al paracetamol.

A causa de la pandemia por covid-19 únicamente pudimos llevar a cabo esta parte del estudio con la muestra de un animal, por lo que es únicamente un estudio preliminar que deberá completarse en el futuro.

A pesar de ello, observamos efectos similares a los hallados ante la exposición aguda al fármaco. Como es lógico, las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido al reducido tamaño muestral empleado en esta parte del estudio. En concreto, se observó una menor velocidad de exposición de la PS y una menor exposición de PS final (Figura 116).

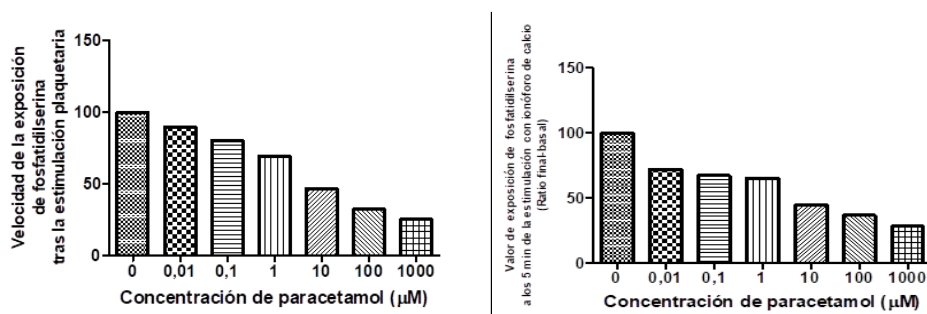


Figura 116. La incubación con paracetamol durante 24 horas produjo una tendencia de reducción en la velocidad de exposición de PS en las muestras tratadas con paracetamol en comparación con el control. La exposición de PS es por tanto inferior también a punto final.

Al igual que en humanos, en delfines el paracetamol parece no tener efectos sobre la función plaquetaria o en su caso, tener efectos muy limitados (Prescott , 1980). En numerosos estudios se ha descartado que el paracetamol posea propiedades antagonistas de la funcionalidad de las plaquetas (Driver et al., 2019), mientras que otros muestran que puede inhibir la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub> a concentraciones de 100 µM o a dosis de 15-30 mg/Kg, mediante la inhibición de la activación plaquetaria ante estímulos como el ADP, la epinefrina, el ácido araquidónico o el colágeno (Sciulli et al., 2003; Munsterhjelm et al.,2005).

Así pues, nuestros resultados no difieren de los resultados obtenidos en estudios previos en otras especies de mamíferos. En el caso de la expresión de la superficie prociagulante y liberación de MPPs, debemos tener en cuenta que el agonista empleado en el estudio para estimular las plaquetas posee un efecto fuerte sobre estas, no fisiológico. Sería interesante estudiar qué efectos se producen al emplear agonistas fisiológicos como el ADP.

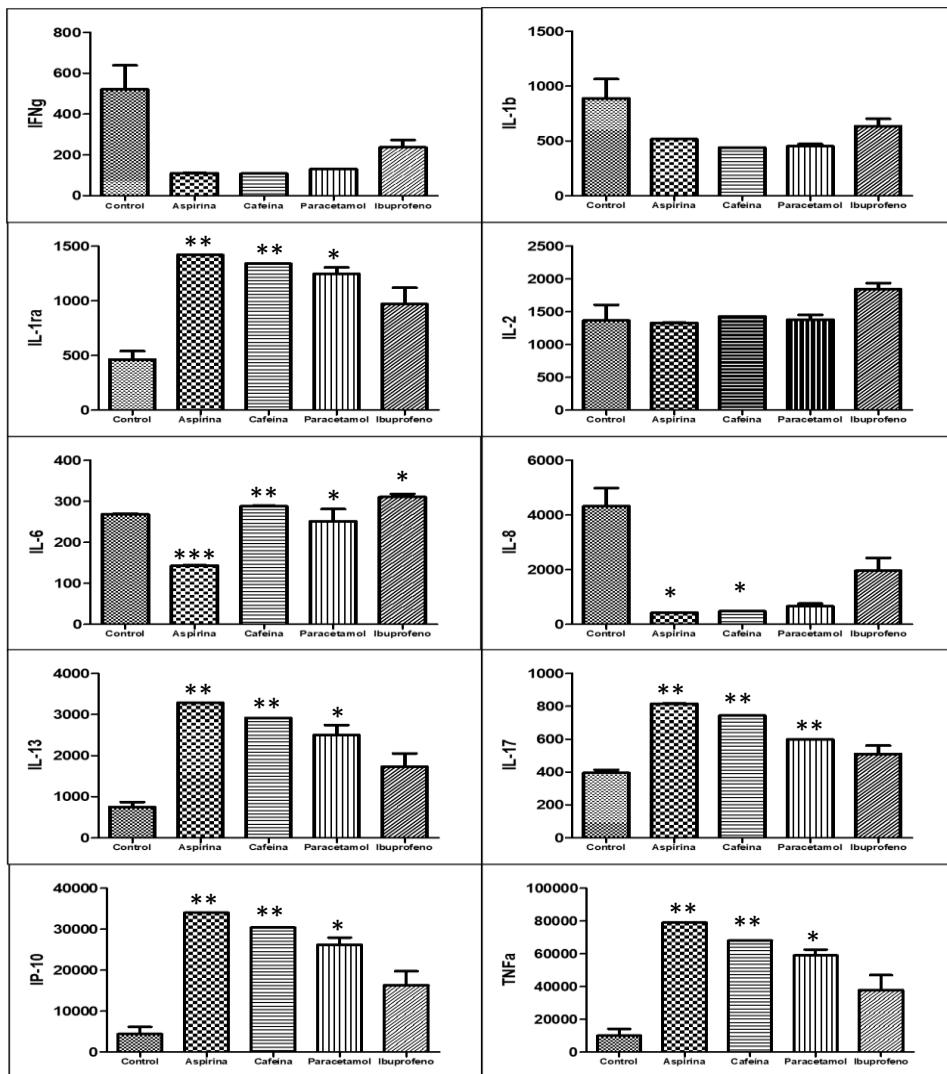


Figura 117. Alteraciones en la producción de citoquinas en las muestras expuestas a aspirina, cafeína, paracetamol e ibuprofeno.

La Tabla 48 resume los principales efectos de los diferentes compuestos sobre la función inmunitaria y plaquetaria en delfines.

|                                |                             | Ibuprofeno | Cafeína | Aspirina | Paracetamol |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|---------|----------|-------------|
|                                | Viabilidad leucocitos       | ↓          |         |          | ↓           |
|                                | PMM                         |            |         | ↑        |             |
|                                | Capacidad fagocítica        | ↓          | ↑       | ↓        | ↓           |
|                                | Estado redox                | ↑          | ↓       | ↑        |             |
| Producción de citoquinas       | IL-1ra                      |            | ↑       | ↑        |             |
|                                | IL-6                        | ↑          | ↑       | ↓        |             |
|                                | IL-8                        |            | ↓       | ↓        | ↓           |
|                                | IL-13                       |            | ↑       | ↑        |             |
|                                | IL-17                       |            | ↑       | ↑        | ↑           |
|                                | IP-10                       |            | ↑       | ↑        |             |
|                                | TNFa                        |            | ↑       | ↑        | ↑           |
|                                | Proliferación de linfocitos |            |         |          |             |
| Movilización de calcio         | Agudo                       | ↓          |         | ↓        |             |
|                                | 24 h                        | ↓          | ↓       | ↓        |             |
| Exposición PS, liberación MPPs | Agudo                       | ↓          | ↓       | ↓        | ↓           |
|                                | 24h                         |            |         | ↓        |             |

Tabla 48. Resumen de los principales efectos del ibuprofeno, cafeína, aspirina y paracetamol sobre los diferentes parámetros de función inmunitaria y plaquetaria en delfines mulares. El color verde indica que no se ha producido ningún efecto, el naranja que se produce un efecto de leve a moderado, y el rojo un efecto fuerte sobre el parámetro. Las flechas indican si el parámetro estudiado se ha potenciado (hacia arriba) o inhibido (hacia abajo) tras la exposición al compuesto.



*Conclusiones*







### **Conclusión 1.**

Se ha desarrollado y validado una serie de ensayos por citometría de flujo para el estudio de biomarcadores de la función inmunitaria y plaquetaria en mamíferos marinos, basados en métodos previamente aplicados a estudios en humanos.

### **Conclusión 2.**

La aplicación *ex vivo* de los ensayos funcionales en mamíferos marinos ha permitido establecer valores de referencia de biomarcadores relevantes de la función inmunitaria o plaquetaria en poblaciones sanas y detectar alteraciones en los mismos, en relación con determinadas patologías o procesos estresantes.

### **Conclusión 3.**

Delfines con infecciones víricas o fúngicas presentaron alteraciones inmunitarias detectables mediante la metodología puesta a punto en esta tesis, ya sea antes o durante la enfermedad. También se detectaron alteraciones en la función plaquetaria en animales con hemorragias o estrés agudo. El estrés crónico conlleva un deterioro en la capacidad fagocítica de los monocitos y granulocitos en delfines mulares, lo que los puede predisponer a padecer ciertas enfermedades. El uso de estas nuevas herramientas diagnósticas puede suponer un avance en la medicina preventiva de los acuarios.

### **Conclusión 4.**

Se ha conseguido detectar diferentes xenobióticos presentes en el mar en tejidos u otras matrices de delfines mulares salvajes o bajo cuidado humano, indicando una exposición crónica o aguda a dichos compuestos. Algunos de los compuestos detectados han sido ibuprofeno, ketoprofeno, aspirina, cafeína o metales pesados como el Hg, Cd, o el As entre otros.

## Conclusión 5.

La aplicación de ensayos funcionales *in vitro* en mamíferos marinos ha permitido caracterizar los efectos tóxicos de xenobióticos contaminantes sobre la función inmunitaria y plaquetaria de delfines mulares. En concreto, hemos observado que el ibuprofeno, la aspirina, el paracetamol y la cafeína producen alteraciones en la funcionalidad inmunitaria y plaquetaria de los delfines.



# *Bibliografía*





- Abbas A.K.2012. Moléculas del complejo de histocompatibilidad y presentación del antígeno a los linfocitos T. In: Ige J.M. Inmunología celular y Molecular. Elsevier. Pp:117-125.
- Abramson SB, Cherksey B, Gude D, Leszczynska-Piziak J, Philips MR, Blau L, Weissmann G. 1990. Nonsteroidal antiinflammatory drugs exert differential effects on neutrophil function and plasma membrane viscosity. *Studies in human neutrophils and liposomes. Inflammation*;14(1):11-30.
- Acuerdo sobre la Conservación de los Cetáceos del Mar Negro, el Mar Mediterráneo y la Zona Atlántica Contigua, hecho en Mónaco el 24 de noviembre de 1996. Publicado en: «BOE» núm. 150, de 23 de junio de 2001, páginas 22410 a 22418 (9 págs.) Sección: I. Disposiciones generales. Departamento: Jefatura del Estado. Referencia: BOE-A-2001-12068. [https://www.boe.es/eli/es/ai/1996/11/24/\(1\)](https://www.boe.es/eli/es/ai/1996/11/24/(1)).
- AEC. Asociación Española para la calidad. 2019. Efecto invernadero. <https://www.aec.es/web/guest/centro-conocimiento/efecto-invernadero>. Downloaded on: 20 March 2020.
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. 2019. Inventory of U.S. Greenhouse Gas Emissions and Sinks. Public Review of Draft U.S. Inventory of Greenhouse Gas Emissions and Sinks: 1990-2018.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm) ; consultado en abril de 2020.
- Aguilar A, Borrell A. 1994. Abnormally high polychlorinated biphenyl levels in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) affected by the 1990-1992 Mediterranean epizootic. *Sci Total Environ*;154(2-3):237-47.
- Aguilar Soto N, Johnson N, Madsen P. T, Tyack P. L, Bocconcelli A, Borsani J. F. 2006. Does intense ship noise disrupt foraging in deep-diving Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*)? *Marine Mammal Science*; 22(3): 690–699.
- Alarayed N.A, Cooper M.B, Prichard B.N, Betteridge D.J, Smith C.C.1997. In vitro adrenaline and collagen-induced mobilization of platelet calcium and its inhibition by naftopidil, doxazosin and nifedipine. *Br J Clin Pharmacol*;43(4):415-20.
- Alsharif KF, Thomas MR, Judge HM, Khan H, Prince LR, Sabroe I, Ridger VC, Storey RF. 2015. Ticagrelor potentiates adenosine-induced stimulation of neutrophil chemotaxis and phagocytosis. *Vascul Pharmacol*. 2015;71:201-7.

- Alverson D. L, Freeburg M.H, Murawski S.A, and Pope J.G. 1994. A global assessment of fisheries bycatch and discards. *Fisheries technical paper 339*. Food and Agriculture Organization, Rome.
- AMAP (Arctic Monitoring and Assessment Programme). 2013. Arctic Ocean Acidification Assessment: Summary for Policymakers.
- Amer MG, Mazen NF, Mohamed AM. 2017. Caffeine intake decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in experimental liver diseases induced by thioacetamide: Biochemical and histological study. *Int J Immunopathol Pharmacol.*;30(1):13-24.
- André M, Morell M, Mas A, Solé M, van der Schaar M, Álvarez-Baquerizo C, Rodríguez-Roch S. 2009. Buenas Prácticas en la Gestión, Evaluación y Control de la Contaminación Acústica subacuática. Iniciativas Jurídicas referentes a la Contaminación Acústica Marina, Fase Segunda. Proyecto “Efectos y Control del Ruido antropogénico en ecosistemas marinos” Laboratorio de Aplicaciones Bioacústicas (LAB) Universidad Politécnica de Cataluña (UPC) Expediente CONAT150153NS2008029.
- Arango-Rincón J.C, Gámez-Díaz L.Y, López-Quintero J.A. 2010. Sistema NADPH oxidasa: nuevos retos y perspectivas. *Iatreia*; Vol. 23 (4): 362- 372.
- Arias G, Garzón J. 2010. Zygomycosis. *Infectio*; 14(S2): S181-S192.
- Arif M, Kumar R, Parveen S. 2020. Reduction in water pollution in Yamuna River due to lockdown under COVID-19 pandemic. *ChemRxiv*, 22, pp. 3389-340.
- Arraud N, Gounou C, Turpin D, Brisson AR. 2016. Fluorescence triggering: A general strategy for enumerating and phenotyping extracellular vesicles by flow cytometry. *Cytometry A.*;89(2):184-95.
- Bae O.N, Lim K.M, Noh J.Y, Kim K.Y, Lim E.K, Chung J.H. 2008. Methylated Organic Metabolites of Arsenic and their Cardiovascular Toxicities. *Toxicol Res*;24(3):161-167.
- Bahrami A, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S, Jiang JX. 2017. TNF- $\alpha$  release capacity is suppressed immediately after hemorrhage and resuscitation. *Chin J Traumatol*;20(4):207-211.
- Barber D.G, Saczuk E, and Richard P.R. 2001. Examination of Beluga-Habitat Relationships through the Use of Telemetry and a Geographic Information System. *Arctic Institute of North America*. Vol. 54: 305-316.
- Barrio, J.A.; García, M.R.; Ruiz, I.; Arce, A. 2006. EL ESTRÉS COMO RESPUESTA *International Journal of Developmental and Educational Psychology*; vol. 1, núm. 1, pp. 37-48.

- Benton A.M, Gerrard J.M, Michiel T, Kindom S.E. 1982.Are lysophosphatidic acids involved in stimulus activation coupling platelets? *Blood*; 60(3):642-649.
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*; 49(2 suppl.1):3-8.
- Beverton R. J. H. 1985. Analysis of marine mammal–fisheries interactions. In Marine mammals and fisheries (J. R. Beddington, R. J. H. Beverton, and D. M. Lavigne, eds.). George Allen & Unwin, London, United Kingdom. Pp. 3–33.
- Bieren J. 2017. Immune-regulation and -functions of eicosanoid lipid mediators. *Biol Chem*;398(11):1177-1191.
- Binková B, Topinka J, Srám RJ. 1990.The effect of paracetamol on oxidative damage in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res*;244(3):227-31.
- Bjorklund G, Stejskal V, Urbina MA, Dadar M, Chirumbolo S, Mutter J. 2018. Metals and Parkinson's Disease: Mechanisms and Biochemical Processes. *Curr Med Chem*;25(19):2198-2214.
- Blanco C, Solomon O, Raga J.A. 2001. Diet of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in the western Mediterranean Sea. *J Mar Biol Ass UK* 81: 1053-1058.
- Bonfitto PHL, Naime ACA, Lopes-Pires ME, Goulart G, Mendes-Silverio CB, Bueno PI, Castilho RF, Antunes E, Marcondes S. 2018. Platelet activity is negatively modulated by tumor necrosis factor alpha through reductions of cytosolic calcium levels and integrin alphaIIb beta3 phosphorylation. *Thromb Res*;172:44-50.
- Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. 2006. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol*;147 Suppl 1(Suppl 1):S252-7.
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Stoica BA, Cuvillier O, Smulson ME. 2001. Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacol Toxicol*;90(1):38-50.
- Boulares AH, Zoltoski AJ, Stoica BA, Cuvillier O, Smulson ME. 2004. Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacol Toxicol.*;90(1):38-50.
- Boulares, H., A. Yakovlev, I. Ivanova, B. A. Stoica, G. Wang, S. Iyer & M. E. Smulson 1999.: Role of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in apoptosis: caspase 3 resistant poly(ADP-ribose) polymerase mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J. Biol. Chem*; 274, 22932–22940.

- Bowen W.D, Oftedal O.T, Boness D.J and Iverson S J. 1994. The effect of maternal age and other factors on birth mass in the harbour seal. *Canadian Journal of Zoology* 72: 8-14.
- Brass L.F, Joseph S.K.1985. A role inositol triphosphate in intracellular calcium mobilization and granule secretion in platelets. *J Biol Chem*;260(28):15172-15179.
- Broekman M.J, Ward J.W,Marcus A.J. 1980.Phospholipid metabolism in stimulated human platelets. Changes in phosphatidylinositol, phosphatidic acid and lisophospholipids. *J Clin Invest*;66:275-283.
- Broom D. 2007. Welfare in relation to feelings, stress and health. *Redvet* 8: 12B. [Internet]. Available in: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121207B/BA018ing.pdf>. Downloaded on 21 March 2020.
- Brumovský M, Bečanová J, Kohoutek J, Borghini M, Nizzetto L. 2017. Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean. *Environ Pollut*; 229:976-983.
- Brumovský M, Karásková P, Borghini M, Nizzetto L. 2016. Per- and polyfluoroalkyl substances in the Western Mediterranean Sea waters. *Chemosphere*; 159:308-316.
- Buckstaff K. C. 2004. Effects of watercraft noise on the acoustic behavior of bottlenose dolphins, *Tursiops truncatus*, in Sarasota Bay, Florida. *Marine Mammal Science*; 20(4), 709-725.
- Burns, J.J. 2009. Harbor seal and spotted seal *Phoca vitulina* and *P. largha*. In: W.F. Perrin, B. Wursig and J.G.M. Thewissen (eds), *Encyclopedia of Marine Mammals*, Academic Press. pp. 533-542.
- Burton G.J, Jauniaux E. 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*;25(3):287-99.
- Butt I.F, Saeed S.A, Waqar S.N, Aslam M. 2005. Synergistic interaction of epinephrine and calcium ionophore in platelet aggregation. *J Ayub Med Coll Abbottabad*;17(2):1-5.
- Cámara Pellissó S, Muñoz M.J, Carballo M, Sánchez-Vizcaíno J.M. 2007. Determination of the immunotoxic potential of heavy metals on the functional activity of bottlenose dolphin leukocytes in vitro. *Vet Immunol Immunopathol*;121(3-4):189-98.
- Cambiazzo S. 2017. Immature platelet fraction (IPF%). *HEMATOLOGÍA*; Volumen 21 N° 3: 335-337, 2017.
- Catálogo Español de especies amenazadas. Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/conservacion->



de-especies/especies-proteccion-especial/ce-proteccion-listado-situacion.aspx.  
Downloaded on 19 March 2020.

- Centelleghé 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. *Front Immunol*;10:888.
- Chakraborty K, Khan GA, Banerjee P, Ray U, Sinha AK. 2003. Inhibition of human blood platelet aggregation and the stimulation of nitric oxide synthesis by aspirin. *Platelets*;14(7-8):421-7.
- Cho JY. 2007. Immunomodulatory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the clinically available doses. *Arch Pharm Res*;30(1):64-74.
- Choczynski S.M, Mergl J. 2007. Successful Management of Acute Erysipelothrix rhusiopathiae Septicemia in a Beluga Whale (*Delphinapterus leucas*). IAAAM Congress 2007.
- Chowdhury S.R, Djordjevic J, Albensi B.C, Fernyhough P. 2016. Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci Rep*;36(1):e00286.
- Cimminiello C, Milani M, Uberti T, Arpaia G, Bonfardeci G. 1989. Effects of ticlopidine and indobufen on platelet aggregation induced by A23187 and adrenaline in the presence of different anticoagulants. *J Int Med Res*;17(6):514-20.
- Cosola C, Sabatino A, di Bari I, Fiaccadori E, Gesualdo L. 2018. Nutrients, Nutraceuticals, and Xenobiotics Affecting Renal Health. *Nutrients*; 23;10(7):808.
- Cozzi B, Huggenberger S and Oelschläger H. 2016. Chapter 4: Diving: Breathing, Respiration, and the Circulatory System. Anatomy of dolphins: Insights into body structure and function. E. Academic Press: 91-131.
- Creed S, McKenzie M. 2019. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). *Methods Mol Biol*;1928:69-76.
- Creed S, McKenzie M. 2019. Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM). *Methods Mol Biol*;1928:69-76.
- Crocker D.E and Costa D.P. 2018. Pinniped Physiology. Encyclopedia of marine mammals. Academic Press: 873-878.

- Culik B.M. 2004. Review of Small Cetaceans Distribution, Behaviour, Migration and Threats. *Marine Mammal Action Plan / Regional Seas Reports and Studies* no. 177, 2004 United Nations Environment Programme (UNEP)/ Convention on Migratory Species (CMS): 315-325.
- De Guise S, Bernier J, Martineau D, Béland P, Fournier M. 1997. Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies. *Dev Comp Immunol*; 21(5):425-33.
- De Guise S, Flipo D, Boehm J.R, Martineau D, Béland P, Fournier M. 1995. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol*;47(3-4):351-62.
- De Guise S, Erickson K, Blanchard M, DiMolfetto L, Lepper H, Wang J, Stott J.L, Ferrick D.A.1998. Characterization of a monoclonal antibody that recognizes a lymphocyte surface antigen for the cetacean homologue to CD45R. *Immunology*;94(2):207-12.
- De Guise S, Erickson K, Blanchard M, DiMolfetto L, Lepper H.D, Stott J.L, Ferrick D.A. 2004. Characterization of F21.A, a monoclonal antibody that recognize a leucocyte surface antigen for killer whale homologue to beta-2 integrin. *Vet Immunol Immunopathol*;97(3-4):195-206.
- De Guise S, Erickson K, Blanchard M, DiMolfetto L, Lepper H.D, Wang J, Stott J.L, Ferrick D.A. 2002. Monoclonal antibodies to lymphocyte surface antigens for cetacean homologues to CD2, CD19 and CD21. *Vet Immunol Immunopathol*;84(3-4):209-21.
- De Jong I, Gunnink H, Rommers, M, Bracke M. 2013. Effect of substrate during early rearing on floor- and feather pecking behaviour in young and adult laying hens. *Arch Geflugelk*; 77: 15-22.
- De Mello D.M.D, Da Silva V.M.F. 2019. Hematologic profile of Amazon river dolphins *Inia geoffrensis* and its variation during acute capture stress. *PLoS One*;14(12):e0226955.
- Delport T.C, Harcourt R.G, Beaumont L.J, Webster K.N, Power M.L. 2015. Molecular detection of antibiotic-resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from the endangered australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Journal of Wildlife Diseases*; 51(3): 555-563.
- Demaster D.P, Fowler C.W, Perry S.L, and Richlen M.F. 2001. Predation and competition: the impact of fisheries on marine-mammal populations over the next one hundred years. *Journal of Mammalogy*, 82(3):641–651.

- Desbiolles F, Malleret L, Tiliacos C, Wong-Wah-Chung P, Laffont-Schwob I. 2018. Occurrence and ecotoxicological assessment of pharmaceuticals: Is there a risk for the Mediterranean aquatic environment? *Sci Total Environ*; 639:1334-1348.
- Desforges J.P, Levin M, Jasperse L, De Guise S, Eulaers I, et al. 2017. Effects of Polar Bear and Killer Whale Derived Contaminant Cocktails on Marine Mammal Immunity. *Environ Sci Technol*;51(19):11431-11439.
- Desportes G, Bjorge A, Rosing-Asvid A, and Waring G.T. 1986. *Harbour seals in the North Atlantic and the Baltic*. NAMMCO Scientific Publications, Tromso, Norway. 2010.
- Díaz S, Settele J, Brondízio E, et al., 2019. Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. *Report of the Plenary of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on the work of its seventh session*. IPBES/7/10/Add.1.
- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal L 327 , 22/12/2000 P. 0001 – 0073.
- Dolman S.J y Brakes P. 2018. Sustainable Fisheries Management and the Welfare of Bycaught and Entangled Cetaceans. *Front. Vet. Sci.* 5:287.
- Domingo M, Ferrer L, Pumarola M, Marco A, Plana J, Kennedy S, McAliskey M, Rima B.K.1990. Morbillivirus in dolphins. *Nature*;348(6296):21.
- Driver B, Marks DC, van der Wal DE. 2019. Not all (N)SAID and done: Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol intake on platelets. *Res Pract Thromb Haemost.*;4(1):36-45.
- Dubovsky SL, Daurignac E, Leonard KE. 2014. Increased platelet intracellular calcium ion concentration is specific to bipolar disorder. *J Affect Disord.*;164:38-42.
- Duignan P.J, Geraci J.R, Raga J.A, Calzada N.1992. Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Can J Vet Res*;56(3):242-8.
- Durante C.A, Moura Reis B.M, Azevedo A, Crespo E.A, Lailson-Brito J. 2019. Trace elements in trophic webs from South Atlantic: The use of cetaceans as sentinels. *Mar Pollut Bull*; 150:110674.
- Durante C.A, Santos-Neto E.B, Azevedo A, Crespo E.A, Lailson-Brito J. 2016. POPs in the South Latin America: Bioaccumulation of DDT, PCB, HCB, HCH and Mirex in blubber of

- common dolphin (*Delphinus delphis*) and Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*) from Argentina. *Sci Total Environ.*;572:352-360.
- Emery M.P, O'Dell, B.L.1993. Low zinc status in rats impairs calcium uptake and aggregation of platelets stimulated by fluoride. *Proc Soc Exp Biol Med*;203(4):480-4.
  - Evans P.G.H, Canwell P.J. and Lewis, E.J. 1992. An experimental study of the effects of pleasure craft noise upon bottlenose dolphins in Cardigan Bay, West Wales. *European Research on Cetaceans* 6: (Ed) P.
  - FAWC (Farm Animal Welfare Council). 1979. Five freedoms. Available in: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20121010012427/http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>.
  - Feoktistov I.A, Paul S, Hollister A.S, Robertson D, Biaggioni I.1992. Role of cyclic AMP in adenosine inhibition of intracellular calcium rise in human platelets. Comparison of adenosine effects on thrombin- and epinephrine-induced platelet stimulation. *Am J Hypertens*;5(6 Pt 2):147S-153S.
  - Fernández A, Edwards J. F, Rodríguez F, Espinosa de los Monteros A, Herráez P, Castro P, Jaber J. R, Martín V, Arbelo M. 2005. “Gas and fat embolic syndrome” involving a mass stranding of beaked whales (family Ziphiidae) exposed to anthropogenic sonar signals. *Veterinary Pathology*; 42, 446-457.
  - Fernández-Contreras M.M, Cardona L, Lockyer C. H, and Aguilar A. Incidental bycatch of short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) by pairtrawlers off northwestern Spain. *2010 International Council for the Exploration of the Sea*. Published by Oxford Journals.<https://academic.oup.com/icesjms/article-abstract/67/8/1732/605256>. Downloaded on 29 November 2019.
  - Field C.L, Tablin F. 2012. Response of Northern Elephant Seal platelets to pressure and temperature changes: a comparison with human platelets. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*;162(4):289-95.
  - Field C.L, Walker N.J, Tablin F. 2001. Northern elephant seal platelets: analysis of shape change and response to platelet agonists. *Thromb Res*;101(4):267-77.
  - Foote A.D, Osborne R.W, Hoelzel A. R. 2004. Whale-call response to masking boat noise. *Nature* (London), 428- 910.
  - Forster, P.M., Forster, H.I., Evans, M.J. *et al.* 2020.Current and future global climate impacts resulting from COVID-19. *Nat. Clim. Chang.* **10**, 913–919.

- Foster G, Jahans K.L, Reid R.J, Ross H.M. 1996. Isolation of *Brucella* species from cetaceans, seals and an otter. *Vet Rec*;138(24):583-6.
- Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I.1996. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*;354(3):262-7.
- Freitas M, Costa VM, Ribeiro D, Couto D, Porto G, Carvalho F, Fernandes E. 2013. Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils. *Toxicol Lett*;219(2):170-7.
- Frouin H, Lebeuf M, Saint-Louis R, Hammill M, Pelletier E, Fournier M. 2008. Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro. *Aquat Toxicol*;90(3):243-51.
- Fulham M, Power M, Gray R. 2018. Comparative ecology of *Escherichia coli* in endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) pups. *Infect Genet Evol* ;62:262-269.
- Furman M.I, Gardner T.M, Goldschmidt-Clermont P.J. 1993. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Tromb Haemost*; 70 (1)229-232.
- Furst SM, Khan KN, Komocsar WJ, Fan L, Mennear J. 2005. Screening New Drugs for Immunotoxic Potential: II. Assessment of the Effects of Selective and Nonselective COX-2 Inhibitors on Complement Activation, Superoxide Anion Production and Leukocyte Chemotaxis and Migration Through Endothelial Cells. *J Immunotoxicol.*;2(2):85-96.
- Garcia Párraga D, Moore M, Fahlman A. 2018. Pulmonary ventilation-perfusion mismatch: a novel hypothesis for how diving vertebrates may avoid the bends. *Proc Biol Sci.*;285(1877).
- García-Martínez M.C, Labiós M, Hermenegildo C, Tarín J.J, O'Connor E, Cano A. 2004. The effect of hormone replacement therapy on Ca<sup>2+</sup> mobilization and P-selectin (CD62P) expression in platelets examined under flow cytometry. *Blood Coagul Fibrinolysis*;15(1):1-8.
- Geraci J.R, Sauer R.M, Medway W. 1966. Erysipelas in dolphins. *Am J Vet Res*;27(117):597-606.
- Godinho A, Jepson P, Deville R, Castro P, Jaber J, Fernández A. 2006. Intracytoplasmic eosinophilic globules in hepatocytes of by-caught harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Poster Presentation at the 20th Annual Meeting of the European Cetacean Society*. Gdynia, Poland.

- Goldberg L.R. 1990. An Alternative "Description of Personality": The Big-Five Factor Structure. *Journal of Personality and Social Psychology*; vol. 59, No. 6,1216-1229.
- Gómez González B, Escobar A. 2006. Estrés y sistema inmune. *Rev Mex Neuroci*; 7(1): 30-38.
- Gómez-Oliván LM, Neri-Cruz N, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, García-Medina S.2014. Binary mixtures of diclofenac with paracetamol, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid and these pharmaceuticals in isolated form induce oxidative stress on *Hyalella azteca*. *Environ Monit Assess*;186(11):7259-71.
- González-Pleiter M, Rioboo C, Reguera M, Abreu I, Leganés F, Cid Á, Fernández-Piñas F. 2017. Calcium mediates the cellular response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the emerging aquatic pollutant Triclosan. *Aquat Toxicol*;186:50-66.
- Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. 2011. Does non-steroidal anti-inflammatory (NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environ Toxicol Pharmacol*;33(2):361-71.
- Gordillo-Bastidas D, Ocegüera-Contreras E, Salazar-Montes A, González-Cuevas J, Hernández-Ortega LD, Armendáriz-Borunda J. 2013. Nrf2 and Snail-1 in the prevention of experimental liver fibrosis by caffeine. *World J Gastroenterol*;19(47):9020-33.
- Grandi M.F, Dans S.L, Crespo E.A, and García, N.A. 2012. Sexual maturity and corporal growth of the South American sea lion, *Otaria flavescens*, in Patagonia. *Estado de situación del lobo marino común en su área de distribución. 2012*, Editorial Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile. 144p.
- Green, D. R, Reed J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*; 281, pp: 1309–1312.
- Griffeth R.J, García-Párraga D, Mellado-López M, Crespo-Picazo J.L, Soriano-Navarro M, Martínez-Romero A, Moreno-Manzano V. 2014. Platelet-rich plasma and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine-associated treatments in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *PLoS One*; 9(9):e108439.
- Guillette LJ Jr, Gunderson MP.2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*;122(6):857-64.
- Gülçin I. 2008. In vitro prooxidant effect of caffeine. *J Enzyme Inhib Med Chem*;23(1):149-52.

- Gulland, F.M., Koski, M., Lowenstine, L.J., Colagross, A., Morgan, L., Spraker, T., 1996. Leptospirosis in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded along the central California coast, 1981–1994. *J. Wildl. Dis.* 32, 572–580.
- Gürsoy M, Haznedaroğlu IC, Celik I, Sayinalp N, Ozcebe OI, Dündar SV. 1996. Agranulocytosis, plasmacytosis, and thrombocytosis followed by a leukemoid reaction due to acute acetaminophen toxicity. *Ann Pharmacother*;30(7-8):762-5.
- Gutiérrez-Noya VM, Gómez-Oliván LM, Ramírez-Montero MDC, Islas-Flores H, Galar-Martínez M, Dublán-García O, Romero R. 2019. Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus carpio*. *Sci Total Environ*;710:136327.
- Hall A.J, Wells R.S, Sweeney J.C, Townsend F.I, Balmer B.C, Hohn A.A, Rhinehart H.L. 2007. Annual, seasonal and individual variation in hematology and clinical blood chemistry profiles in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from Sarasota Bay, Florida. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*;148(2):266-77.
- Hamidu J.A, Rieger A.M, Fassenko G.M, Barreda D.R. 2010. Dissociation of chicken blastoderm for examination of apoptosis and necrosis by flow cytometry. *Poult Sci*;89(5):901-9.
- Harewood E, McGowan C. 2005. Behavioral and physiological responses to stabling in naive horses. *J Equine Vet Sci*; 25: 164-170.
- Härkönen T, and Heide-Jorgensen M.P. 1990. Comparative life histories of East Atlantic and other harbour seal populations. *Ophelia* 32: 211-235.
- Hart L.B, Beckingham B, Wells R.S, Alten Flagg M, Wischusen K, Moors A, Kucklick J, Pisarski E, Wirth E. 2018. Urinary Phthalate Metabolites in Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) From Sarasota Bay, FL, USA. *Geohealth*;2(10):313-326.
- Hastie G. D, Russell D.J.F, McConnell B, Moss S, Thompson D, and Janik V.M. 2015. Sound exposure in harbour seals during the installation of an offshore wind farm: predictions of auditory damage. *Journal of Applied Ecology* 52: 631-640.
- Hedley B.D, Llewellyn-Smith N, Lang S, Hsia C.C, MacNamara N, Rosenfeld D, Keeney M. 2015. Combined accurate platelet enumeration and reticulated platelet determination by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*;88(5):330-7.
- Hiemstra P.S, Daha M.R. 1998. Opsonization. In: P.J, Delves, Encyclopedia of Immunology. 2<sup>o</sup> Ed. Reference Work. 1885-1888.

- Highfill L. E; Kuczaj, S.A. 2007. Do Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) Have Distinct and Stable Personalities? *Aquatic Mammals*; 33(3), 380-389.
- Hjemdahl P, Wallén N.H.1997. Calcium antagonist treatment, sympathetic activity and platelet function. *Eur Heart J*;18 Suppl A:A36-50.
- Ibrulj S, Rahmanovic A, Haveric S, Haveric A, Pasic AD. 2007. Cytogenetic evaluation of paracetamol effects in human lymphocytes culture. *Drug Chem Toxicol*;30(2):133-43.
- Ishibe T, Kimura A, Ishida Y, Takayasu T, Hayashi T, Tsuneyama K, Matsushima K, Sakata I, Mukaida N, Kondo T. 2009. Reduced acetaminophen-induced liver injury in mice by genetic disruption of IL-1 receptor antagonist. *Lab Invest*;89(1):68-79.
- Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Neri-Cruz N, Dublán-García O. 2013. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ Sci Pollut Res Int*;21(7):5157-66.
- Italiano J.E Jr, Mairuhu A.T, Flaumenhaft R. 2010. Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol*;17(6):578-84.
- IUCN, 2020. <https://www.iucnredlist.org/> consultado en abril de 2020.
- Jaber J.R, Fernández A, Herráez P, Espinosa de los Monteros A, Ramírez G.A, García P.M, Fernández T, Arbelo M, Pérez J.2003. Cross-reactivity of human and bovine antibodies in striped dolphin paraffin wax-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol*;96(1-2):65-72.
- Jakubíková J, Duraj T, Takácsová X, Hunáková L, Chorváth B, Sedlák J. 2001. Non-steroidal anti-inflammatory agent ibuprofen-induced apoptosis, cell necrosis and cell cycle alterations in human leukemic cells in vitro. *Neoplasma*;48(3):208-13. PMID: 11583291.
- Janicke, R., ML. S.,Wati M, Porter A. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J. Biol. Chem*; 273, 9357–9360.
- Jensen F. H. et al. 2009. Vessel noise effects on delphinid communication; 395, 161–175.
- Jepson P. D, Arbelo M, Deaville R, Patterson I. A. P, Castro P, Baker J. R, et al. 2003. Gas-bubble lesions in stranded cetaceans. *Nature*; 245: 575-576.
- Jiménez MD, Martín MJ, Alarcón de la Lastra C, Bruseghini L, Esteras A, Herrerías JM, Motilva V. 2004. Role of L-arginine in ibuprofen-induced oxidative stress and neutrophil infiltration in gastric mucosa. *Free Radic Res*;38(9):903-11.
- Johnson KE, Ceglowski JR, Roweth HG, Forward JA, Tippy MD, El-Husayni S, Kulenthirarajan R, Malloy MW, Machlus KR, Chen WY, Italiano JE Jr, Battinelli EM. 2019.



- Aspirin inhibits platelets from reprogramming breast tumor cells and promoting metastasis. *Blood Adv*;3(2):198-211.
- Johnson, W.T, Dufault, S.N. 1993. Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim Biophys Acta*;1175(3):263-8.
  - Jorgensen S. E. 2016. Ecotoxicology and Chemistry Applications in Environmental Management. CRC Press. Copenhagen University, Denmark. 326 pp.
  - Kang SH, Jung YH, Kim HY, Seo JH, Lee JY, Kwon JW, Kim BJ, Kim HB, Lee SY, Jang GC, Song DJ, Kim WK, Shim JY, Kim JH, Kang MJ, Yu HS, Yu J, Hong SJ.2013. Effect of paracetamol use on the modification of the development of asthma by reactive oxygen species genes. *Ann Allergy Asthma Immunol*;110(5):364-369.e1.
  - Kasamatsu M, Kawauchi R, Tsunokawa M, Ueda K, Uchida E, Oikawa S, Higuchi H, Kawajiri T, Uchida S, Nagahata H. 2008. Comparison of serum lipid compositions, lipid peroxide, alpha-tocopherol and lipoproteins in captive marine mammals (bottlenose dolphins, spotted seals and West Indian manatees) and terrestrial mammals. *Res Vet Sci*;86(2):216-22.
  - Katler E, Weissmann G. Steroids, aspirin, and inflammation. 1977. *Inflammation*;2(4):295-307.
  - Keogh M.J, Spoon T, Ridgway S.H, Jensen E, Van Bonn W, Romano T.A. 2011. Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol*;144(3-4):468-75.
  - Kikusato M, Toyomizu M. 2013. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One*;8(5):e64412.
  - Kinsel M.J, Boehm J.R, Harris B, Murnane R.D. 1997. Fatal Erysipelothrix rhusiopathiae septicemia in a captive Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J Zoo Wildl Med*;28(4):494-7.
  - Kostka B, Krajewska U, Rieske P. 1997. Platelet activation by mercuric compounds. *Platelets*; 8: 413–417.
  - Koudouovoh-Tripp P, Hüfner K, Egeter J, Kandler C, Giesinger JM, Sopper S, Humpel C, Sperner-Unterweger B. 2021. Stress Enhances Proinflammatory Platelet Activity: the Impact of Acute and Chronic Mental Stress. *J Neuroimmune Pharmacol*;16(2):500-512.

- Kovacs K.M, Lemons P, MacCracken J.G, Lydersen C. 2015. Walruses in a Time of Climate Change. *Arctic Program*. Arctic Report Card: Update for 2015. Warmer air and sea, declining ice continue to trigger Arctic change.
- Kretzschmar M, Klinger W. 1990. The hepatic glutathione system--influences of xenobiotics. *Exp Pathol*;38(3):145-64.
- Labiós M, Martínez M, Gabriel F, Guiral V, Ruiz-Aja S, Aznar J.2006. Cytoplasmic free calcium mobilization in platelets, expression of P-selectin, phosphatidylserine, and microparticle formation, measured by whole blood flow cytometry, in hypertensive patients. Effect of doxazosin GITS. *Thromb Res*;117(4):403-9.
- Lacotte J, Perrin C, Mosquet B, Moulin M, Bazin C. 1990. Agranulocytose au paracétamol. A propos d'un cas [Agranulocytosis caused by paracetamol. A case report]. *Therapie*;45(5):438-9.
- Lahvis G.P, Wells R.S, Kuehl D.W, Stewart J.L, Rhinehart H.L, Via C.S. 1995. Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environ Health Perspect*;103 Suppl 4:67-72.
- Lakkis N, Dokainish H, Abuzahra M, Tsyboulev V, Jorgensen J, Ponce De Leon A, Saleem A. 2004. Reticulated platelets in acute coronary syndrome: a marker of platelet activity. *J Am Coll Cardiol*; 44(10):2091-3.
- Lally JSV, Jain SS, Han XX, Snook LA, Glatz JFC, Luiken JJFP, McFarlan J, Holloway GP, Bonen A. 2012. Caffeine-stimulated fatty acid oxidation is blunted in CD36 null mice. *Acta Physiol (Oxf)*;205(1):71-81.
- Larsen A.K, Nymo I.H, Boysen P, Tryland M, Godfroid J. 2013. Entry and elimination of marine mammal *Brucella* spp. by hooded seal (*Cystophora cristata*) alveolar macrophages in vitro. *PLoS One*;8(7):e70186.
- Le Quéré, C., Jackson, R.B., Jones, M.W. *et al.* Temporary reduction in daily global CO<sub>2</sub> emissions during the COVID-19 forced confinement. *Nat. Clim. Chang.* **10**, 647–653 (2020).
- Leidgens V, Seliger C, Jachnik B, Welz T, Leukel P, Vollmann-Zwerenz A, Bogdahn U, Kreutz M, Grauer OM, Hau P. 2015. Ibuprofen and Diclofenac Restrict Migration and Proliferation of Human Glioma Cells by Distinct Molecular Mechanisms. *PLoS One.*;10(10):e0140613.

- León-Carmona JR, Galano A. 2011. Is caffeine a good scavenger of oxygenated free radicals? *J Phys Chem B.*;115(15):4538-46.
- León-Regal M.L, Alvarado-Borges A, De Armas García J.O, Miranda-Alvarado L, Varens-Cedeño J.A, Cuesta del Sol J.A. 2016. Inflammatory Acute Response. Biochemical and Cellular Considerations. *Revista Finlay*; Vol: 5 (1): 47-62.
- Lesage V, Barrette C, Kingsley M. C. S, Sjare B. 1999. The effect of vessel noise on the vocal behavior of belugas in the St. Lawrence River Estuary, Canada. *Marine Mammal Science*; 15(1), 65-84.
- Levin M, Morsey B, Mori C, Nambiar P.R, De Guise S. 2005. PCBs and TCDD, alone and in mixtures, modulate marine mammal but not B6C3F1 mouse leukocyte phagocytosis. *J Toxicol Environ Health A* ;68(8):635-56.
- Li W.T, Chang H.W, Yang W.C, Lo C, Wang L.Y, Pang V.F, Chen M.H, Jeng C.R. 2018. Immunotoxicity of Silver Nanoparticles (AgNPs) on the Leukocytes of Common Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). *Scientific Reports.*; 8(1):5593.
- Lloret A, Del Barrio I, and Aranda I.M. 2012. Estrategias marinas: evaluación inicial, buen estado ambiental y objetivos ambientales. *Estrategia marina demarcación marina levantino-balear evaluación inicial parte II: análisis de presiones e impactos*. Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente.
- Lloyd T.W. 1961. Agranulocytosis associated with paracetamol. *Lancet*;1(7168):114-5.
- Lockwood, S.K., Chovan, J.L., Gaydos, J.K., 2006. Aerobic bacterial isolations from harbor seals (*Phoca vitulina*) stranded in Washington: 1992–2003. *J. Zoo Wildl. Med.* 37, 281–291.
- Lokhandwala S, Gautam P. 2020. Indirect impact of COVID-19 on environment: A brief study in Indian context. *Environ Res*;188:109807.
- Lowry, L. 2016. *Odobenus rosmarus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T15106A45228501. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20161.RLTS.T15106A45228501.en>. Downloaded on 17 March 2020.
- Lundholm C.E, Bartonek M.1991. A study of the effects of p,p'-DDE and other related chlorinated hydrocarbons on inhibition of platelet aggregation. *Arch Toxicol*;65(7):570-4.
- Luo X, Zhang L, Li H, Zhang S, Jiao Y, Wang S, Xue C, Fan R. 2013. Comparison of enzymatic activity of two linoleic acid isomerases expressed in *E. coli*. *Mol Biol Rep.* 2013;40(10):5913-9.

- MacCracken J.G. 2012. Pacific Walrus and climate change: observations and predictions. *Ecology and Evolution*; 2(8): 2072–2090.
- Madden D, Thom S.R, Milovanova T.N, Yang M, Bhopale V.M, Ljubkovic M, Dujic Z. 2014. Exercise before SCUBA diving ameliorates decompression-induced neutrophil activation; 46: 1928 –1935.
- Mahmoud F, Al-Ozairi E, Haines D, Novotny L, Dashti A, Ibrahim B, Abdel-Hamid M. 2014. Effect of Diabetea tea™ consumption on inflammatory cytokines and metabolic biomarkers in type 2 diabetes patients. *J Ethnopharmacol*;194:1069-1077.
- Malmberg M, Rubio-Guerri C, Hayer J, García-Párraga D, Nieto-Pelegri E, Melero M, Álvaro T, Valls M, Sánchez-Vizcaíno J.M, Belák S, Granberg F. 2017. Phylogenomic analysis of the complete sequence of a gastroenteritis-associated cetacean adenovirus (bottlenose dolphin adenovirus 1) reveals a high degree of genetic divergence. *Infect Genet Evol*; 53:47-55.
- Malme C. I, Miles P. R, Clark C. W, Tyack P, Bird, J. E. 1984. Investigations of the Potential Effects of Underwater Noise from Petroleum Industry Activities on Migrating Gray Whale Behavior. Phase II: January 1984 Migration. *Report of Bolt Beranek & Newman, Inc., Cambridge, MA, to U.S. Minerals Management Service, Anchorage.* NTIS PB86-218377.
- Marquis NR, Vigdahl RL, Tavormina PA. 1969. Platelet aggregation. I. Regulation by cyclic AMP and prostaglandin E1. *Biochem Biophys Res Commun.*;36(6):965-72.
- Martin A.R, Smith T.G. 1999. Strategy and capability of wild belugas, *Delphinapterus leucas*, during deep, benthic diving. *Can. J. Zool*; 77: 1783-1793.
- Martínez-López E, Peñalver J, Escriña A, Lara L, Gens M.J, María Dolores E, Alcaraz A, García-Fernández A.J.2019. Trace metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) stranded along the Murcia coastline, Mediterranean Sea, during the period 2009-2015. *Chemosphere*;229:580-588.
- Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, Ellis S, Kelly PN, Ekert PG, Metcalf D, Roberts AW, Huang DC, Kile BT. 2007. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell*;128(6):1173-86.
- Matsuhisa F, Kitamura N, Satoh E. 2014. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. *Stress*;17(2):186-92.
- McAnulty S, McAnulty L, Nieman D, Morrow J, Dumke C, Henson D. 2006. Effect of NSAID on muscle injury and oxidative stress. *Int J Sports Med*;28(11):909-15.

- McCabe D.J.H, Harrison P, Sidhu P.S, Brown M.M, Machin S.J.2004. Circulating reticulated platelets in the early and late phases after ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Br J Haematol*; 126(6):861-9.
- Metro D, Cernaro V, Santoro D, Papa M, Buemi M, Benvenga S, Manasseri L. 2017. Beneficial effects of oral pure caffeine on oxidative stress. *J Clin Transl Endocrinol*;10:22-27.
- Miksis-Olds J. L, Donaghay P. L, Miller J. H, Tyack P. L, Reynolds J. E.2007. Simulated vessel approaches elicit differential responses from manatees. *Marine Mammal Scienc*; 23(3): 629-649.
- Mikuni M, Kagaya A, Takahashi K, Meltzer HY. 1992. Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization of platelets is enhanced in affective disorders. *Psychopharmacology (Berl)*;106(3):311-4.
- Minette HP. 1986. Salmonellosis in the marine environment. A review and commentary. *Int J Zoonoses*;13(2):71-5.
- Ministerio para la transición ecológica. 2019. Inventario Nacional de emisiones de Gases de Efecto Invernadero: Informe Resumen Edición 2019. pp: 1-6.
- Monreal-Pawlowsky T, Carbajal A, Tallo-Parra O, Sabés-Alsina M, Monclús L, Almunia J, Fernández-Bellon H, Lopez-Bejar M. 2017. Daily salivary cortisol levels in response to stress factors in captive common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*): a potential welfare indicator. *Veterinary Record*.
- Monteiro M.C, Gonçalves M.J, Sansonetty F, O'Connor J.E. 2003. Flow cytometric analysis of calcium mobilization in whole-blood platelets. *Curr Protoc Cytom*; Chapter 9:Unit 9.20.
- Monteiro M.C, O'Connor J.E, Martínez M. 2001. La Citometría de Flujo en el Análisis de las Plaquetas. (I) Aspectos Estructurales y Funcionales de las Plaquetas. *Rev Diagn Biol*; vol.50 no.3.
- Monteiro M.C, Sansonetty F, Gonçalves M.J, O'Connor J.E. 1999. Flow Cytometric Kinetic Assay of Calcium Mobilization in Whole Blood Platelets Using Fluo-3 and CD41. *Cytometry* 35:302–310.
- Montoya GA, Bakuradze T, Eirich M, Erk T, Baum M, Habermeyer M, Eisenbrand G, Richling E. 2013. Modulation of 3',5'-cyclic AMP homeostasis in human platelets by coffee and individual coffee constituents. *Br J Nutr.*;112(9):1427-37.

- Moon HG, Kang CS, Choi JP, Choi DS, Choi HI, Choi YW, Jeon SG, Yoo JY, Jang MH, Gho YS, Kim YK. 2013. Acetyl salicylic acid inhibits Th17 airway inflammation via blockade of IL-6 and IL-17 positive feedback. *Exp Mol Med*;45(1):e6.
- Moore JK, MacKinnon AC, Man TY, Manning JR, Forbes SJ, Simpson KJ. 2017. Patients with the worst outcomes after paracetamol (acetaminophen)-induced liver failure have an early monocytopenia. *Aliment Pharmacol Ther*;45(3):443-454.
- Moore M.J, Bogomolni A.L, Dennison S.E, Early G, Garner M.M, Hayward B. A, Lentell B. J, and Rotstei D.S. 2009. Gas Bubbles in Seals, Dolphins, and Porpoises Entangled and Drowned at Depth in Gillnets. *Vet Pathol* 46:536–547.
- Morris N, Rigg K, Hogg K. 2015. Towards evidence-based emergency medicine: best BETs from the Manchester Royal Infirmary. BET 1: Which form of aspirin is the fastest to inhibit platelet aggregation in emergency department patients with non-ST segment elevation myocardial infarction? *Emerg Med J.*;32(10):823-6.
- Morse EE. 1977. Effects of drugs on platelet function. *Ann Clin Lab Sci*;7(1):68-72.
- Mörtberg J, Lundwall K, Mobarrez F, Wallén H, Jacobson S.H, Spaak J. 2019. Increased concentrations of platelet- and endothelial-derived microparticles in patients with myocardial infarction and reduced renal function- a descriptive study. *BMC Nephrol* 20(1):71.
- Moscoso M.S. 2009. From the mind to the cell: the impact of stress on psiconeuroimmunoendocrinology. *SciELO Perú*.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-48272009000200008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-48272009000200008). Downloaded on 21 March 2020.
- Mucio-Ramírez J.S.2007. La neuroquímica del estrés y el papel de los péptidos opioides. *REB* 26(4): 121-128.
- Mukhopadhyay S, Addya S, Bhattacharya D.K, Chatterjee G.C.1988. Effects of cadmium treatment in vitro on the antioxidant protection mechanism and activation of human blood platelets. *Thromb Res*;50(3):419-27.
- Munaron D, Tapie N, Budzinski H, Andral B and Gonzalez J.L. 2012. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. Volum 114, p: 82-92.
- Munsterhjelm E, Niemi TT, Ylikorkala O, Silvanto M, Rosenberg PH. 2005. Characterization of inhibition of platelet function by paracetamol and its interaction with diclofenac in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand*;49(6):840-6.

- Muñiz JA, Gomez G, González B, Rivero-Echeto MC, Cadet JL, García-Rill E, Urbano FJ, Bisagno V. 2016. Combined Effects of Simultaneous Exposure to Caffeine and Cocaine in the Mouse Striatum. *Neurotox Res*;29(4):525-38
- Nayak MK, Dash A, Singh N, Dash D. 2014. Aspirin delimits platelet life span by proteasomal inhibition. *PLoS One*;9(8):e105049.
- Newman M. C. 2014. Fundamentals of Ecotoxicology: The Science of Pollution. Fourth Edition. CRC Press. New York. 633 pp.
- Nieman DC, Oley K, Henson DA, et al. 2006. Ibuprofen use, endotoxemia, inflammation, and plasma cytokines during ultramarathon competition. *Brain Behav Immun.*;20:578-584.
- Nilnumkhum A, Kanlaya R, Yoodee S, Thongboonkerd V. 2019. Caffeine inhibits hypoxia-induced renal fibroblast activation by antioxidant mechanism. *Cell Adh Migr*; 13(1):260-272.
- Nimse SB, Pal D. 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv*;5:27986–28006.
- NOAA (National Centers for Environmental Information). <https://www.ncei.noaa.gov/> consultado en enero de 2021.
- Noda K, Aoki M, Akiyoshi H, Asaki H, Ogata T, Yamauchi K, Shimada T, Ohashi F. 2006. Effect of bovine lactoferrin on the immune responses of captive bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*) being transported over long distances. *Vet Rec*; 30;159(26):885-8.
- Noda K, Aoki M, Akiyoshi H, Asaki H, Shimada T, Ohashi F. 2003. Evaluation of the polymorphonuclear cell functions of bottlenose dolphins. *J Vet Med Sci*; 65(6):727-9.
- Nontarach A, Srihirun S, Chaturapanich G, Unchern S, Swaddiwudhipong W, Pattanapanyasat K, Chamchoi A, Vivithanaporn P, Visoottiviseth P, Sibmooh N. 2016. Increased platelet activation in subjects chronically exposed to cadmium: A pilot study. *Platelets*;27(2):136-42.
- Nouri-Shirazi M, Bible B.F, Zeng M, Tamjidi S, Bossart G.D. 2017. Phenotyping and comparing the immune cell populations of free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and dolphins under human care. *BMC Vet Res* ;13(1):78.
- O'Brien J.M, Beck S, Berrow S.D, André M , van der Schaar M , O'Connor I , McKeown E.P. 2016. Chapter 95 The Use of Deep Water Berths and the Effect of Noise on Bottlenose Dolphins in the Shannon Estuary cSAC . In: The Effects of Noise on Aquatic Life II,

Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science+Business Media New York 2016. Pp:775- 784.

- O'Corry-Crowe G.M, Suydam R.S, Rosenberg A, Frost K.J and Dizon A.E. 1997. Phylogeography, population structure and dispersal patterns of the beluga whale *Delphinapterus leucas* in the western Nearctic revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. Vol. 6 (10): 955-970.
- Ogata H, Teixeira MM, Sousa RC, Silva MV, Correia D, Rodrigues Junior V, Levy BD, Rogério Ade P. 2016. Effects of aspirin-triggered resolvin D1 on peripheral blood mononuclear cells from patients with Chagas' heart disease. *Eur J Pharmacol*;777:26-32.
- Olas B, Bryś M. 2019. Effects of coffee, energy drinks and their components on hemostasis: The hypothetical mechanisms of their action. *Food Chem Toxicol*;127:31-41.
- Oppenheimer C.H, Kelly A.L. 1952. *Escherichia coli* in the Intestine of a Wild Sea Lion. *Science*;115(2993):527-8.
- Ormaza-González FI, Ponce-Villao GE, Pin-Hidalgo GM. 2020. Low mercury, cadmium and lead concentrations in tuna products from the eastern Pacific. *Heliyon*;6(7):e04576.
- Palmer C.J, Schroeder J.P, Fujioka R.S, Douglas J.T. 1991. *Staphylococcus aureus* infection in newly captured Pacific bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus gilli*). *J. Zoo Wildl Med*;22 (3):330-338.
- Panseri S, Chiesa L, Ghisleni G, Marano G, Boracchi P, Ranghieri V, Malandra RM, Roccabianca P, Tecilla M. 2019. Persistent organic pollutants in fish: biomonitoring and cocktail effect with implications for food safety. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*;36(4):601-611.
- Pasalic L, Pennings J.G, Connor D, Campbell H, Kritharides L, Chen V.M. 2017. Flow Cytometry Protocols for Assessment of Platelet Function in Whole Blood. *Methods Mol Biol*;1646:369-389.
- Patterson W.R, Dalton L.M, McGlasson D.L, Cissik J.H.1993. Aggregation of killer whale platelets. *Thromb Res*;70(3):225-31.
- Pattyn F, Ritz C, Hanna E, Asay-Davis X, DeConto R, Durand G, Favier L, et al. 2018. The Greenland and Antarctic ice sheets under 1.5 °C global warming. *Nature Climate Change*; vol 8: 1053–1061.
- Pauly D, Trites A. W, Capuli E, and Christensen V.1998. Diet composition and trophic levels of marine mammals. *ICES Journal of Marine Science*, 55: 467–481.



- Peñín I, Levin M, Acevedo-Whitehouse K, Jasperse L, Gebhard E, Gulland F.M.D, De Guise S. 2018. Effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on California sea lion (*Zalophus californianus*) lymphocyte functions upon in vitro exposure. *Environ Res*; 167:708-717.
- Perlingeiro R.C, Queiroz M.L. 1995. Measurement of the respiratory burst and chemotaxis in polymorphonuclear leukocytes from mercury-exposed workers. *Hum Exp Toxicol*;14(3):281-6.
- Perry A.L, Low P.J, Ellis J.R, Reynolds J.D. 2005. Climate Change and Distribution Shifts in Marine Fishes. *Science*;308(5730):1912-5.
- Petrucci R, Zollo G, Curulli A, Marrosu G. 2018. A new insight into the oxidative mechanism of caffeine and related methylxanthines in aprotic medium: May caffeine be really considered as an antioxidant? *Biochim Biophys Acta Gen Subj*;1862(8):1781-1789.
- Pierce G.J, Thompson P.M, Miller A, Diack J.S.W, Miller D, and Boyle P.R. 1991. Seasonal-variation in the diet of common seals (*Phoca vitulina*) in the Moray Firth area of Scotland. *Journal of Zoology* 223: 641-652.
- Pillon- Barcelos RP, Souza MA, Amaral GP, Stefanello ST, Bresciani G, Fighera MR, Soares FA, Barbosa NV. 2013. Caffeine supplementation modulates oxidative stress markers in the liver of trained rats. *Life Sci*;96(1-2):40-5.
- Piperno E, Mosher AH, Berssenbruegge DA, Winkler JD, Smith RB. 1978. Pathophysiology of acetaminophen overdose toxicity: implications for management. *Pediatrics*;62(5 Pt 2 Suppl):880-9.
- Ponomareva A.A, Nevzorova T, Mordakhanova E.R, Andrianova I.A, Rauova L, Litvinov R.I, Weisel J.W. 2017. Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles. *J Thromb Haemost*; 15(8):1655-1667.
- Ponomareva AA, Nevzorova TA, Mordakhanova ER, Andrianova IA, Rauova L, Litvinov RI, Weisel JW. 2017. Intracellular origin and ultrastructure of platelet-derived microparticles. *J Thromb Haemost*;15(8):1655-1667.
- Prescott LF. 1980. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol*;10 Suppl 2(Suppl 2):291S-298S.
- Raulf M, König W. 1991. In vitro effects of polychlorinated biphenyls on human platelets. *Immunology*;72(2):287-91.
- Ray, S. D., C. L. Sorge, J. L. Raucy & C. G.B.1990. Early loss of large genomic DNA in vivo with accumulation of Ca<sup>2+</sup> in the nucleus during acetaminophen-induced liver injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol*; 106, 346–351.

- Raza H, John A, Benedict S. 2011. Acetylsalicylic acid-induced oxidative stress, cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma HepG2 cells. *Eur J Pharmacol* 668: 15–24.
- Raza H, John A. 2012. Implications of altered glutathione metabolism in aspirin-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in HepG2 cells. *PLoS One.*;7(4):e36325.
- Read A.J, Drinker P, Northridge S. 2005. Bycatch of Marine Mammals in U.S. and Global Fisheries. *Conservation Biology* Volume 20, No. 1, 163–169.
- Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas. Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino «BOE» núm. 46, de 23 de febrero de 2011 Referencia: BOE-A-2011-3582
- Real Decreto 1997/1995, de 7 de diciembre, por el que se establecen medidas para contribuir a garantizar la biodiversidad mediante la conservación de los hábitats naturales y de la fauna y flora silvestres. «BOE» núm. 310, de 28 de diciembre de 1995, páginas 37310 a 37333 (24 págs.) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. BOE-A-1995-27761.
- Reeves R. R., Smith B.D, Crespo E, Notarbartolo di Sciara D, and the Cetacean Specialist Group. 2003. Dolphins, whales, and porpoises: 2003–2010 Conservation action plan for the world’s cetaceans. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland.
- Reeves R.R, Berggren P , Crespo E.A , Gales N , Northridge S.P , Notarbartolo di Sciara D , Perrin W.F , Read A.J , Rogan E , Smith B.D, Van Waerebeek K. Global Priorities for Reduction of Cetacean Bycatch. [file:///C:/Users/Mar/Downloads/243210%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Mar/Downloads/243210%20(1).pdf). Downloaded on 19 March 2020.
- Rehtanz M, Ghim S, Rector A, Van Ranst M, Fair P.A, Bossart G.D, Jenson A.B. 2006. Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin papillomavirus: *Tursiops truncatus* papillomavirus type 2. *Journal Of General Virology*; Vol: 87, Issue 12.
- Reif J.S, Peden-Adams M.M, Romano T.A, Rice C.D, Fair P.A, Bossart G.D. 2009. Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with lobomycosis. *Med Mycol* ;47(2):125-35.
- Reijnders P. J. H. Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *Nature* 324: 456-457.
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. 2000. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr.*;72(1):30-5.

- Rendell L. E, Gordon J. C. D. 1999. Vocal response of long-finned pilot whales (*Globicephala melas*) to military sonar in the Ligurian Sea. *Marine Mammal Science*; 15(1), 198-204.
- Reyes J.C. 1991. The conservation of small cetaceans: a review. Report prepared for the Secretariat of the Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals. UNEP/CMS Secretariat, Bonn.
- Richardson W. J, Greene C. R, Malme C. I, Thomson D. H. 1995. Marine Mammals and Noise. San Diego, CA: Academic Press, Inc. 576pp.
- Richardson W. J, Würsig B, Greene C. R. 1990. Reactions of bowhead whales, *Balaena mysticetus*, to drilling and dredging noise in the Canadian Beaufort Sea. *Marine Environmental Research*;29(2), 135-160.
- Riet-Sapriza F.G, Costa D.P, Franco-Trecu V, Marín Y, Chocca, J, González B, Beathyate G, Chilvers B.L, and Hückstadt L.A. 2013. Foraging behavior of lactating South American sea lions (*Otaria flavescens*) and spatial–temporal resource overlap with the Uruguayan fisheries. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 88-89: 106-119.
- Rodas L, Martinez S, Aguilo A, Tauler P. 2020. Caffeine supplementation induces higher IL-6 and IL-10 plasma levels in response to a treadmill exercise test. *J Int Soc Sports Nutr*;17(1):47.
- Romano T. A, Keogh M. J, Kelly C, Feng P, Berk L, Schlundt C. E, Carder D. A, Finneran, J. J. 2004. Anthropogenic sound and marine mammal health: Measures of the nervous and immune systems before and after intense sound exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*; 61, 1124-1134.
- Rosen J. 2017. AFTER THE ICE GOES Researchers look into the Arctic’s future for clues to save species and maybe even bring the ice back. *Nature*; Vol 542: 152-154.
- Ross P.S, Deswart R.L, Reijnders P.J.H, Vanloveren H, Vos J.G. and Osterhaus A. 1995. Contaminant related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody-responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environmental Health Perspectives* 103: 162-167.
- Rubio-Guerri C, Melero M, Esperón F, Bellière E.N, Arbelo M, Crespo JL, Sierra E, García-Párraga D, Sánchez-Vizcaíno J.M.2013. Unusual striped dolphin mass mortality episode related to cetacean morbillivirus in the Spanish Mediterranean sea. *BMC Vet Res.*;9:106.

- Ruutu T, Kosunen TU. 1972. In vitro effect of anti-inflammatory agents on phagocytosis and bacterial killing by human neutrophilic leukocytes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*;31(3):226-37.
- Sanmiguel-Plazas R.A, Plazas-Hernández F.A, Trujillo-Piso D.Y, Pérez-Rubio M.R, Peñuela-Sierra L.M, DiGiacinto A. 2018. Requirements For The Measurement Of Invasive And Non-Invasive Stress Indicators In Animal Production. *Rev Inv Vet*; 29(1): 15-30.
- Schaefer A.M, Bossart G.D , Mazzoil M, Fair P.A , Reif J. 2011. Risk factors for colonization of *E. coli* in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida. *J Environ Public Health*; Vol.2011.
- Schaefer AM, Bossart GD, Mazzoil M, Fair PA, Reif JS. 2011. Risk factors for colonization of *E. coli* in Atlantic Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Indian River Lagoon, Florida. *J Environ Public Health*;2011:597073.
- Sciuilli MG, Seta F, Tacconelli S, Capone ML, Ricciotti E, Pistritto G, Patrignani P. 2003. Effects of acetaminophen on constitutive and inducible prostanoid biosynthesis in human blood cells. *Br J Pharmacol*;138(4):634-41.
- Secretaría de Estado de Medio Ambiente Dirección General de Sostenibilidad de la Costa y del Mar División para la Protección del Mar. *Tursiops truncatus*. *Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente*, 1567, EUNIS - V. 2006, updated on 127/11/2015 (V.02).
- Secretaría de Estado de Medio Ambiente, 2015. Órgano MINISTERIO DE AGRICULTURA, ALIMENTACION Y MEDIO AMBIENTE. Publicado en BOE núm. 145 de 18 de Junio de 2015. Vigencia desde 08 de Julio de 2015
- Shalabi EA. 1992. Acetaminophen inhibits the human polymorphonuclear leukocyte function in vitro. *Immunopharmacology*;24(1):37-45.
- Shaw MK, Ingraham JL. 1965.Fatty Acid Composition of *Escherichia coli* as a Possible Controlling Factor of the Minimal Growth Temperature. *J Bacteriol*;90(1):141-6.
- Shoham-Frider E, Goffman O, Harlavan Y, Kress N, Morick D, Roditi-Elasar M, Shefer E, Kerem D. 2016. Trace elements in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Eastern Mediterranean: A 10-years perspective. *Mar Pollut Bull*;109(1):624-632.
- Sokolova O.V. 2004. Some immunological and biochemical indices of the Black Sea bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) during adaptation to the captivity conditions. *Dokl Biol Sci* ;395:149-53.

- Spielberg SP. 1980. Acetaminophen toxicity in human lymphocytes in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*;213(2):395-8.
- Stockin K.A, Lusseau D, Binedell V, Wiseman N, Orams M.B. 2008. Tourism affects the behavioural budget of the common dolphin *Delphinus sp.* in the Hauraki Gulf, New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*; Vol. 355: 287–295.
- Stryer L, Berg J.M, Timoczko J.L. 2004. Fosforilación oxidativa. In: Bioquímica. 5ª Ed. Reverte S.A. pp: 491-526.
- Tao KS, Wang W, Wang L, Cao DY, Li YQ, Wu SX, Dou KF. 2008. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. *Med Hypotheses*;71(5):730-6.
- Thom S.R, Bennett M, Banham N.D, Chin W, Blake D.F, Rosen A, Pollock N.W, Madden D, Barak O, Marroni A, Balestra C, Germonpre P, Pieri M, Cialoni D, Le P.N, Logue C, Lambert D, Hardy K.R, Sward D, Yang M, Bhopale V.B, Dujic Z. 2015. Association of microparticles and neutrophil activation with decompression sickness. *J Appl Physiol*;119(5):427-34.
- Thom S.R, Bennett M, Banham N.D, Chin W, Blake D.F, Rosen A, Pollock N.W, Madden D, Barak O, Marroni A, Balestra C, et al. 2015. Association of microparticles and neutrophil activation with decompression sickness. *J Appl Physiol* ;119(5):427-434.
- Thomson D.J.M and Barclay D.R. 2020. Real-time observations of the impact of COVID-19 on underwater noise. *The Journal of the Acoustical Society of America*;147, 3390.
- Tizard I.R. a. 2009. La defensa del organismo. En: Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Saunders. 8ª Ed. Pp: 1-10.
- Tizard I.R. b. 2009. Cómo se activa la inflamación. En: Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Saunders. 8ª Ed. Pp: 11-27.
- Tizard I.R. c. 2009. Los neutrófilos y sus productos. En: Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Saunders. 8ª Ed. Pp: 28-40.
- Tizard I.R. d. 2009. Linfocitos T colaboradores y su respuesta al antígeno. En: Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Saunders. 8ª Ed. Pp:139-151.
- Tizard I.R. e. 2009. Los linfocitos B y su respuesta al antígeno. En: Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Saunders. 8ª Ed. pp: 153-166.
- Todo M, Horinaka M, Tomosugi M, Tanaka R, Ikawa H, Sowa Y, Ishikawa H, Fujiwara H, Otsuji E, Sakai T. 2013. Ibuprofen enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation. *Oncol Rep*;30(5):2379-84.

- Tornero D, Ceña V, González-García C, Jordán J. 2002. The role of the mitochondrial permeability transition pore in neurodegenerative processes. *REV NEUROL*; 35 (4): 354-361.
- Trizio D, Basketter D.A, Botham P.A, Graepel P.H, Lambré C, Magda S.J, Pal T.M, Riley A.J, Ronneberger H, Van Sittert N.J, et al.1988. Identification of immunotoxic effects of chemicals and assessment of their relevance to man. *Food Chem Toxicol*. 1988;26(6):527-39.
- Trusel L.D, Das S.B, Osman M.B, Evans M.J, et al. 2018. Nonlinear rise in Greenland runoff in response to post-industrial Arctic warming. *Nature*; Vol 564: 104-122.
- Tudela S, Kai Kai A , Maynou F, El Andalossi M , Guglielmi P. 2004. Driftnet fishing and biodiversity conservation: the case study of the large-scale Moroccan driftnet fleet operating in the Alboran Sea (SW Mediterranean). *Biological Conservation*;121:65–78.
- Tulloch V, Grech A, Jonsen I, Pirota V, Harcourt R. 2019. Cost-effective mitigation strategies to reduce bycatch threats to cetaceans identified using return-on-investment analysis. *Conserv Biol*;34(1):168-179.
- Tyack P. L, Johnson M, Aguilar-Soto N, Sturlese A, Madsen P. T. 2006. Extreme diving of beaked whales. *Journal of Experimental Biology*; 209, 4238-4253.
- Urick R.J. 1983. Principles of Underwater Sound, 3rd edition. McGraw-Hill, New York. 423pp.
- van der Wal DE, Gitz E, Du VX, Lo K, Koekman CA, Versteeg S, et al. 2012. Arachidonic acid depletion extends survival of cold-stored platelets by interfering with the [glycoprotein Iba – 14-3-3ζ] association. *Haematologica*;97:1514–22.
- van Elk C.E, van Dep Bildt M.W.G, Martina B.E.E, Osterhaus A.D.M.E, Kuiken T. 2007. Escherichia coli septicemia associated with lack of maternally acquired immunity in a bottlenose dolphin calf. *Vet Pathol* ;44(1):88-92.
- van Furth AM, Seijmonsbergen EM, Langermans JA, van der Meide PH, van Furth R. 1995. Effect of xanthine derivatives and dexamethasone on Streptococcus pneumoniae-stimulated production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-10 by human leukocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*;2(6):689-92.
- van Rensburg M.J, van Rooy M, Bester M.J, Serem J.C, Venter C, Oberholzer H.M. 2018. Oxidative and haemostatic effects of copper, manganese and mercury, alone and in combination at physiologically relevant levels: An ex vivo study. *Hum Exp Toxicol*;38(4):419-433.

- van Zyl JM, Basson K, van der Walt BJ.1989. The inhibitory effect of acetaminophen on the myeloperoxidase-induced antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte. *Biochem Pharmacol.*;38(1):161-5.
- Varani K, Portaluppi F, Merighi S, Ongini E, Belardinelli L, Borea PA. 1999. Caffeine alters A2A adenosine receptors and their function in human platelets. *Circulation.*;99(19):2499-502.
- Verhoef J. 1998. Phagocytosis. In: P.J, Delves, Encyclopedia of Immunology. 2<sup>o</sup> Ed.Reference Work. 1935-1940.
- Vicente SJ, Ishimoto EY, Cruz RJ, Pereira CD, Torres EA. 2011. Increase of the activity of phase II antioxidant enzymes in rats after a single dose of coffee. *J Agric Food Chem*;59(20):10887-92.
- Vicente SJ, Ishimoto EY, Torres EA. 2013. Coffee modulates transcription factor Nrf2 and highly increases the activity of antioxidant enzymes in rats. *J Agric Food Chem.*;62(1):116-22.
- Vincent JE, Zijlstra FJ, Bonta IL. 1975. The effect of non-steroid anti-inflammatory drugs, dibutylryl cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and phosphodiesterase inhibitors on platelet aggregation and the platelet release reaction in normal and essential fatty acid deficient rats. *Prostaglandins*;10(5):899-911.
- Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B, von Knethen A. 2017. Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci.*;18(12):2772.
- von Känel R, Kudielka BM, Metzenthin P, Helfricht S, Preckel D, Haerberli A, Stutz M, Fischer JE. 2008. Aspirin, but not propranolol, attenuates the acute stress-induced increase in circulating levels of interleukin-6: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Brain Behav Immun*;22(2):150-7.
- Wagner S, Lang S, Popp T, Schmidt A, Thiermann H, Steinritz D, Kehe K. 2019. Evaluation of selective and non-selective cyclooxygenase inhibitors on sulfur mustard-induced pro-inflammatory cytokine formation in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett*;312:109-117.
- Walker GJ, Dziubak A, Houghton L, Prendergast C, Lim L, Bishop NC. 2007. The effect of caffeine ingestion on human neutrophil oxidative burst responses following time-trial cycling. *J Sports Sci*;26(6):611-9.
- Watson B.R, White N.A, Taylor K.A, Howes J.M, Malcor J.D.M , Bihan D, Sage S.O, Farndalea R.W, Pugn N. 2015. Zinc is a transmembrane agonist that induces platelet

- activation in a tyrosine phosphorylationdependent manner. *Royal Society of Chemistry. Metallomics*.
- Weillgart L. S. 2007. A brief review of known effects of noise on marine mammals. *International Journal of Comparative Psychology*; 20 (2), 159-168.
  - Wells R.S y Scott M.D.1999. Bottlenose dolphin – *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) In: Handbook of Marine Mammals (Ridgway SH, Harrison SR, eds.) Vol. 6: The second book of dolphins and porpoises. pp. 137-182.
  - Wilkinson, I.S., Duignan, P., Castinel, A., Grinberg, A., Chilvers, B., Robertson, B., 2006. *Klebsiella pneumoniae* epidemics: Possible impact on New Zealand sea lion recruitment. In: Trites, A.W., Atkinson, S.K., DeMaster, D.P., Fritz, L.W., Gelatt, T.S., Rea, L.D., Wynne, K.M. (Eds.), *Sea Lions of the World*, pp. 385–403.
  - Williams R, Lusseau D, Hammond, P. S. 2006. Estimating relative energetic costs of human disturbance to killer whales (*Orcinus orca*). *Biological Conservation*; 133(3), 301-311.
  - Wright A. J, Aguilar Soto N, Baldwin A. L, Bateson M, Beale C, Clark C., et al. 2007. Anthropogenic noise as a stressor in animals: a multidisciplinary perspective. *International Journal of Comparative Psychology*: 20 (2).
  - Wright A.J, Aguilar-Soto N, Baldwin A.L, Bateson M, et al. 2007. Do Marine Mammals Experience Stress Related to Anthropogenic Noise? *International Journal of Comparative Psychology*; 20: 274-316.
  - Wu Y, Zhai H, Wang Y, Li L, Wu J, Wang F, Sun S, Yao S, Shang Y. 2012. Aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub> attenuates lipopolysaccharide-induced intracellular ROS in BV2 microglia cells by inhibiting the function of NADPH oxidase. *Neurochem Res*;37(8):1690-6.
  - Yadav V.K, Singh P.K, Sharma D, Singh S.K, Agarwal V.2019. Mechanism underlying N-(3-oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone mediated intracellular calcium mobilization in human platelets. *Blood Cells Mol Dis*;79:102340.
  - Yi S, Wang Y, Huang Y, Xia L, Sun L, Lenaghan SC, Zhang M. 2014. Tea nanoparticles for immunostimulation and chemo-drug delivery in cancer treatment. *J Biomed Nanotechnol.*;10(6):1016-29.
  - Yu X, Yu R, Zhang X, Zhan F, Sun X, Wu Y. 2019. DDT exposure induces cell cycle arrest and apoptosis of skin fibroblasts from Indo-Pacific humpback dolphin via mitochondria dysfunction. *Aquat Toxicol*;213:105229.



- Yunus A.P, Masago Y, Hijioka Y. 2020. COVID-19 and surface water quality: improved lake water quality during the lockdown *Sci. Total Environ.*, 731, p. 139012.
- Zielińska M, Fenrych W. The application of a flow cytometric assay for evaluation of phagocytosis of neutrophils. *Acta Biochim Pol.* 1997;44(1):121-5.
- Zoccarato F, Ruzzene M, Cavallini L, Doni M.G, Francesconi M.A, Deana R, Alexandre A. 1991. Platelet responses promoted by the activation of protein kinase C or the increase of cytosolic Ca<sup>2+</sup> are potentiated by adrenaline. Effects of cAMP and staurosporine. *Biochim Biophys Acta*;1092(1):72-8.
- Zucker M.L, Murphy C.A, Rachel J.M, Martinez G.A, Abhyankar S, McGuirk J.P, Reid K.J, Plapp F.V. 2006. Immature platelet fraction as a predictor of platelet recovery following hematopoietic progenitor cell transplantation. *Lab Hematol*;12(3):125-30.
- Zupo V, Graber G, Kamel S, Plichta V, Granitzer S, Gundacker C, Wittmann KJ. 2019. Mercury accumulation in freshwater and marine fish from the wild and from aquaculture ponds. *Environ Pollut*;255(Pt 1):112975.



