

Hepatitis Reactivas no Específicas en Delfines Mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las Islas Canarias: Estudio Patológico e Inmunohistoquímico

Jaber, J. R.*; Pérez, C.(1); Carrascosa, C.; Peña, S.; Monzón, M.; Suárez-Bonnet, A.; Díaz, B.; Zafra, R.(1); Herráez, P.; Fernández, T.; Fernández, A.

Facultad de Veterinaria, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Islas Canarias (España)

(1) Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, España.

RESUMEN: Este trabajo describe los hallazgos macroscópicos, histopatológicos e inmunohistoquímicos en lesiones de hepatitis reactivas no específicas (NSRH) en 17 delfines mulares (*Tursiops truncatus*) varados en las costas de las Islas Canarias. La apariencia histológica de las NSRH estaba caracterizado por una proliferación de células de Kupffer y la presencia de granulocitos, así como de linfocitos y células plasmáticas distribuidas por el parénquima hepático y en el estroma portal o perivenular, con o sin evidencia mínima de necrosis de hepatocitos. La NSRH fue diagnosticada en todos los animales del estudio, donde 14 de los 17 cetáceos del estudio eran del tipo crónico, y los 3 restantes, presentaban la forma activa reactiva crónica. La NSRH presentaba un infiltrado inflamatorio compuesto de linfocitos T CD3⁺ y células plasmáticas IgG⁺ en los espacios porta y sinusoides hepáticos. El anticuerpo policlonal anti-S100 reaccionó con un número variable de linfocitos de los espacios porta y los sinusoides hepáticos, así como con las células de Kupffer y las células epiteliales de los conductos biliares. La presencia de sustancias contaminantes, así como las infestaciones parasitarias o infecciones encontradas en el hígado y otros órganos fueron asociadas con la NSRH.

Palabras Clave: hígado, delfín, hepatitis, contaminantes, inmunohistoquímica.

Non-specific chronic reactive hepatitis in Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*), stranded in the Canary Islands: pathological and immunohistochemical study

SUMMARY: This paper describes the gross, histopathological and immunohistochemical features of non-specific reactive hepatitis (NSRH) lesions in 17 bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded on the coast of Canary Islands (Spain). The histological appearance of NSRH was the proliferation of Kupffer cells and presence of granulocytes, as well as lymphocytes and plasma cells scattered thorough the liver parenchyma and in the portal or perivenular stroma, without or with minimal evidence of hepatocyte necrosis. NSRH was diagnosed in all the animals of the study, where 14 out of 17 showed the chronic reactive stage, and the remaining three animals presented the chronic reactive active stage. NSRH was composed of inflammatory infiltration of CD3⁺ T lymphocytes and IgG⁺ plasma cells in portal spaces and hepatic sinusoids. The anti-S100 polyclonal antibody reacted with a variable number of lymphocytes from portal areas and hepatic sinusoids, as well as with Kupffer cells and epithelial cells of the bile ducts. The presence of persistent pollutants, as well as parasitic infestation or infections in the liver was related with the incidence of NSRH in animals of the study.

Keys words: liver, dolphin, hepatitis, contaminants, immunohistochemistry.

Correspondencia

Autor principal. Tel.: +34 928 457428. Email: jjaber@dmor.ulpgc.es (J.R. Jaber).

Introducción

Las hepatitis han sido diagnosticadas tanto en delfines de vida libre como en cautividad (1, 6, 8, 16, 24, 30). Los desórdenes hepáticos crónicos de causa desconocida son comunes en delfines y suelen estar caracterizados clínicamente por pérdida de peso e ictericia. Las lesiones hepáticas consisten en la degeneración de hepatocitos, cambios grasos y fibrosis. La hepatitis aguda en delfines puede estar causada por toxinas alimenticias o ambientales, y agentes biológicos como virus, bacterias, hongos y parásitos. Generalmente, Los cambio histopatológicos del hígado pueden dar una idea de la etiología de este tipo de hepatitis en delfines (30). En todos estos estudios previos, las formas más comunes de hepatitis fueron hepatitis no purulentas, hepatitis intersticiales y pericolangitis subaguda o crónica. Sin embargo, solo en algunos de éstos ha sido descrita la hepatitis reactiva crónica no específica (NSRH) (16).

En mamíferos terrestres, la NSRH es una forma de hepatitis crónica que se define como una entidad morfológica ampliamente distribuida por el hígado, representando el residuo de una enfermedad intrahepática inflamatoria previa o una respuesta a una variedad de procesos extrahepáticos como por ejemplo enfermedades febriles, inflamación en alguna parte del lecho visceral o enfermedad celíaca (26, 27, 28, 32).

Los delfines, como otros cetáceos, están en la cima de la cadena alimentaria marina y pueden acumular contaminantes en sus tejidos durante su vida. Los compuestos organoclorados (OCs), especialmente bifenilos policlorados (PCBs) y diclorodifeniltricloroetanos (DDTs) han tenido una gran repercusión por sus efectos perjudiciales en la salud de los mamíferos marinos (2, 3, 7, 12, 17, 18, 20, 31).

A pesar del gran número de estudios toxicológicos realizados en delfines, no se han realizado trabajos que correlacionen los estudios toxico-

lógicos e histopatológicos del hígado. Dichos estudios podrían proporcionar una valiosa información sobre la causa de hepatitis crónica y otras enfermedades que afectan a mamíferos marinos.

El propósito de este estudio consistió en describir los cambios histopatológicos y la naturaleza del infiltrado inflamatorio en las lesiones de NSRH observadas en 17 delfines mulares varados en las Islas Canarias, correlacionando la gravedad de la NSRH con los niveles de un número de contaminantes en la grasa y el hígado, y la presencia de otras infecciones y enfermedades sistémicas.

Material y métodos

Animales y estudio patológico

Un total de 17 delfines mulares (9 machos y 8 hembras) fueron incluidos en este estudio. El examen post-mortem fue realizado según el protocolo estándar para los cetáceos (25). Tres muestras de cada hígado, así como de los nódulos linfáticos fueron incluidos en el estudio, para después ser fijadas en formol al 10%, deshidratadas en alcohol e incluidas en parafina. Las secciones (4 mm de grosor) fueron cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina para su examen histopatológico. El número de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas presentes en el infiltrado inflamatorio se contaron en 15 campos seleccionados al azar de 640x, incluyendo espacios porta y sinusoides hepáticos. Las NSRH fueron clasificadas como leves, cuando

se observaban entre 20-50 células por campo; moderadas (entre 50-75 células por campo) y severas (mas de 75 células por campo).

Estudio inmunohistoquímico

Las secciones seleccionadas fueron teñidas con el test de inmunoperoxidasa para morbilivirus (23). El método de la avidina-biotina-peroxidasa (ABC) fue utilizado para estudiar el inmunofenotipo del infiltrado inflamatorio presente en las lesiones hepáticas (15). La actividad endógena de la peroxidasa fue bloqueada por la incubación en peróxido de hidrógeno al 0.3% en metanol durante 30 minutos. La incubación en pronasa al 0.01% (Sigma Chemicals, St Louis, MO, EEUU) durante 10 minutos a temperatura ambiente fue utilizada como método en la recuperación del antígeno para todos los anticuerpos a excepción del MHC de Clase II, donde se aplicó incubación en ácido cítrico al 0.01 M en microondas a 100° durante 7 minutos (Tabla 1). Posteriormente, las secciones fueron aclaradas en solución tampón fosfato salino (PBS) al 0.01 M, pH 7.2 e incubadas durante 30 minutos con suero normal de cabra al 10% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a temperatura ambiente (20-25°C).

Después de tres aclarados en PBS, un suero biotinilado de cabra para anticuerpos anti-inmunoglobulina G de conejo diluido en PBS (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) fue utilizado durante 30 minutos como reactivo secundario para los

Tabla 1. Detalle de los anticuerpos primarios usados en este estudio.

Especificidad	Especies de origen	Método de tratamiento*	Dilución	Fuente†
CD3 (pAb)	Humana	Pronasa	1/200	Dako
IgG (pAb)	Humana	Pronasa	1/50	Dako
MHC Clase II (pAb)	Humana	Microondas	1/50	Daki
Proteína S100 (pAb)	Bovina	Pronasa	1/200	Dako
Lisozima (pAb)	Humana	Pronasa	1/250	Dako

* Mejor método de tratamiento de los tres testados para cada anticuerpo

† Dako (Glostrup, Denmark).

pAb: anticuerpo policlonal; mAb: anticuerpo monoclonal

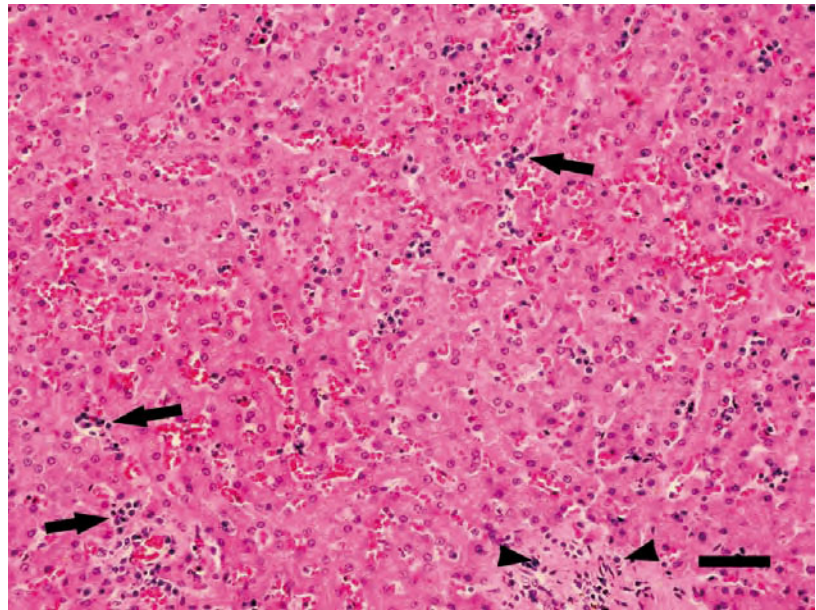
anticuerpos policlonales primarios (pAbs), mientras que este mismo suero de cabra biotilado para anticuerpos anti-inmunoglobulina de ratón diluido en PBS (Dako) se utilizó como reactivo secundario para los anticuerpos monoclonales primarios (mAbs) durante 30 minutos. El complejo ABC (vector) diluido en PBS fue aplicado como tercer reactivo. Entonces, estas secciones fueron incubadas con 3,3'-tetrahidroclorido de diaminobencidina (sigma), diluido al 0.035% en tampón salino (pH 7.6) conteniendo peróxido de hidrógeno al 0.01%. Finalmente, las secciones fueron aclaradas en agua corriente, contrateñidas con hematoxilina de Mayer y montadas con Eukitt. Como controles negativos, los anticuerpos primarios específicos fueron sustituidos por un tampón fosfato salino de conejo o ratón. Como controles positivos se utilizaron secciones de tejido procedentes de nódulos linfáticos mesentéricos de delfín y humano. Las secciones de tejido de animales sin evidencia de enfermedad hepática fueron utilizadas como hígados control.

Estudio toxicológico

Para llevar a cabo este estudio se analizaron muestras de grasa e hígado para detectar las concentraciones de PCB y DDT en 11 de 17 delfines mulares. La concentración total de PCB fue calculada como la suma de 11 derivados policlorados bifenílicos (PCBs) (IUPAC # 28, 52, 101, 105, 118, 138, 149, 153, 156, 180 y 187). Las concentraciones de DDTs se calcularon como la suma de seis compuestos de DDT (pp'-DDE, pp'-DDT, pp'-DDD, op'-DDE, op'-DDT, op'-DDD). Los niveles de PCB y DDT se compararon con el umbral toxicológico de aquellas concentraciones encontradas en otros estudios en mamíferos marinos (5, 12, 18, 19).

Resultados

La hepatitis reactiva crónica no específica (NSRH) fue diagnosticada en



▲ Figura 1. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específica, infiltrado inflamatorio en el estroma de áreas portales (flecha) y sinusoides hepáticos, donde se identifican acumulaciones de linfocitos y células plasmáticas (flecha). HE, Bar = 200 μ m.

todos los animales examinados, donde se observó como 2 de las 17 eran severas, otras 2 eran moderadas, y las restantes fueron consideradas como leves. La única evidencia macroscópica de esta enfermedad fue un moderado aumento en el tamaño del hígado. De acuerdo a la composición y gravedad del infiltrado inflamatorio identificado en estos tejidos se distinguieron dos tipos diferentes de NSRH: Hepatitis reactiva activa crónica no específica y hepatitis reactiva crónica no específica.

Histologicamente, la NSRH estaba compuesta por un infiltrado inflamatorio en las áreas portales y en el parénquima sin evidencias de necrosis hepatocelular; en el primer tipo (hepatitis reactiva activa crónica no específica) había un infiltrado leve-moderado, compuesto principalmente por neutrófilos en el estroma de las áreas portales y de diferente intensidad entre las mismas, que incluía tractos portales normales, así como de una leve a marcada proliferación de leucocitos y células de Kupffer en los sinusoides y algunos neutrófilos en el estroma alrededor de las venas hepáticas. En el segundo tipo (hepatitis crónica reactiva no específica), la inflamación estaba compuesta por

células plasmáticas y linfocitos en el estroma de las áreas portales, alrededor de las venas hepáticas y también dentro de los sinusoides hepáticos (Fig. 1).

La hepatitis reactiva activa crónica no específica fue diagnosticada en 3 de los 17 animales del estudio; donde también se detectó colangitis parasitaria. Los cetáceos con severa NSRH (una del tipo crónica y otra del tipo activo) mostraron abundante infiltrado inflamatorio de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas en las áreas portales y los sinusoides hepáticos, en estos últimos se observaron acúmulos intravasculares de linfocitos y células plasmáticas (Fig. 1).

Cinco animales con NSRH mostraron parásitos en conductos biliares que fueron identificados como *Campyla spp.*. Estos trematodos producían un daño severo en los conductos biliares, dando lugar a colangitis focal supurativa, colangitis necrotizante severa o una colangitis crónica granulomatosa. Estos parásitos también fueron encontrados en los conductos pancreáticos de dos de los animales examinados con NSRH.

Todos los animales diagnosticados de NSRH presentaron algún proceso extrahepático pre-existente que podía

Tabla 2. Diagnóstico de causas extrahepáticas en animales con diferente grado de NSRH.

Diagnóstico			
Sinusitis parasitaria	Pneumonia	Gastritis	Enteritis
3 (1, 1, 1)	8 (3, 3, 2, 1, 1, 1, 1, 1)	4 (2, 1, 1, 1)	2 (1, 1)

(1) NSRH leve, (2) NSRH Moderada, (3) NSRH Severa

Tabla 3. DDTs y PCBs en blubber (ng g⁻¹ wet wt) e hígado (ng g⁻¹ wet wt) de *Tursiops truncatus* y grado de NRSR.

	Blubber		Hígado		grado
	PCBs	DDT	PCBs	DDT	NRSR
TT 43	--	--	1,035	460	1
	301	147			
TT 50			833	220	2
	(990)*	147			
	19,970	15,592			
TT 78			52,374	2,529	3
	(107,549)	(152,862)		3	
TT 93	--	--	6,638	3,171	3
	1,972	950			
TTC 94			2,028	706	1
	(3,912)	(1,885)			
	33,212	21,050			
TT 124			2,597	1,190	1
	(136,679)	(86,625)			
	10,133	3,347			
TT 144			--	--	1
	(18,062)	(5,977)			
	585	222			
TT 145			--	--	1
	(1,069)	(406)			
	7269	6,830			
TT 168			373	265	1
	(12,664)	(11,899)			
	7810	4,207			
TT 171			--	--	1
	(14,021)	(7,553)			
	12,859	464			
TT 311			--	--	1
	(36,740)	(1,326)			

TT = *Tursiops truncatus* con su número de referencia.

*En parentesis concentración en grasa también en ng g⁻¹ lipid wt.

haber influido en la aparición de las NSRH (Tabla 2). De esta manera, se observó una abundante infestación por *nasitrema spp* en los sacos paranasales de 3 de los animales con NRSR. Varios tipos de neumonía fueron encontrados en los cetáceos de este estudio. Seis de estos casos con grave o leve infestación por parásitos pulmonares (*Pseudalius inflexus* y *Stenurus minor*), mostrando lesiones macroscópicas e histológicas

consistentes con neumonía parasitaria, mientras que otros 2 casos de neumonía rean debidos a una infección bacteriana (*Corynebacterium spp.* y, *Staphylococcus spp.*). Otros animales fueron diagnosticados de gastritis y/o enteritis; en 4 animales. la gastritis se debía a una infestación por el nematodo *Anisakis simplex*. Otros 2 animales con NRSR presentaron enteritis de etiología desconocida.

No se detectaron antígenos para *Morbillivirus* en ninguno de los animales del presente estudio. El patrón de inmunoreactividad y la distribución de las células inmunomarcadas con anticuerpos CD3, IgG, S-100, lisozima y MHC de Clase II fue muy similar en los nódulos linfáticos humanos y de delfín mular. En los hígados control sólo se aislaron linfocitos T CD3⁺ y en menor cantidad células plasmáticas IgG⁺ tanto en los espacios porta como en los sinusoides hepáticos. El MHC de Clase II fue expresado ocasionalmente por células dentríticas en los espacios porta, mientras que la lisozima era expresada por células de Kupffer, monocitos circulantes y macrófagos aislados dentro de los espacios porta. En las NSRH, el infiltrado inflamatorio estaba compuesto por células plasmáticas y algunos linfocitos localizados en el parénquima hepático y las áreas portales. En estas lesiones se encontraron pequeños grupos de células T CD3⁺ tanto en los espacios porta, como en los sinusoides hepáticos (Figura 2). Algunos macrófagos en los espacios porta, así como células de Kupffer, y ocasionalmente monocitos circulantes fueron positivos a lisozima. El anti-S100 pAb reaccionó con un número variable de linfocitos en las áreas portales y sinusoides hepáticos, así como con células de Kupffer y células epiteliales de los conductos biliares. Un escaso número de macrófagos localizado en las áreas portales, así como de células de Kupffer fueron positivos para el MHC de Clase II. La mayoría de las células plasmáticas observadas en las áreas portales y los sinusoides hepáticos fueron positivos para IgG (Figura 3).

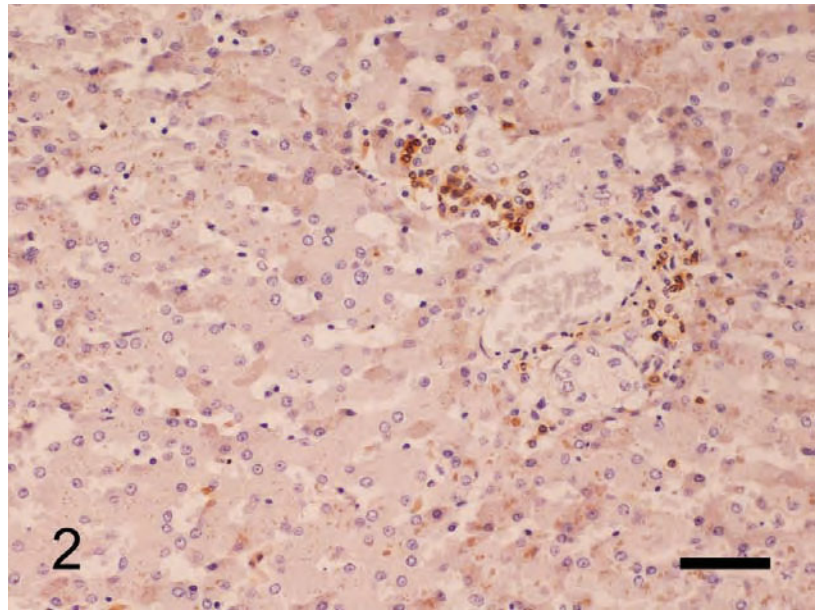
Los niveles de compuestos organoclorados (OCs) en el blubber y el hígado de los delfines mulares se presenta en la tabla 3. De todos estos compuestos, fueron los PCBs los que presentaban mayor concentración en los tejidos analizados. En general, se observó que los niveles de PCB en el hígado eran menores que los encontrados en el blubber. En este último, los niveles oscilaron entre 301 y 33,212

ng/g ww, mientras que en hígado se situaron entre 373 y 52,374 ng/g ww. Similar composición de derivados de PCB fue identificada en los dos tejidos, aparentemente con gran contribución de hexa y heptaclorobifenilos. Dentro de los pesticidas organoclorados, el DDT, estuvo presente en mayor concentración (Tabla 3). La concentración de DDTs en el blubber oscilaron entre 147 y 21,050 ng /g ww y en el hígado entre 220 y 3171 ng/g ww. El *p,p'*-DDE fue el componente, del grupo del DDT, con mayor concentración en los dos tejidos analizados.

Discusión

Los cambios hepáticos en la serie de cetáceos estudiados fueron similares a los hallados en un grupo de 14 ejemplares de delfín común (15). De esta manera, la hepatitis reactiva crónica no específica fue la lesión hepática más común en este estudio. Esta lesión ha sido definida en humanos (11, 13, 27, 28) y perros (9, 32) como una entidad caracterizada por la proliferación de células de Kupffer y la presencia de granulocitos así como células mononucleares diseminadas por todo el parénquima hepático y el estroma portal o perivenular, sin o con mínima evidencia de necrosis hepática. La causa de este tipo de hepatitis no es bien conocida y se han sugerido diferentes etiologías incluyendo endotoxinas debido a sepsis o incremento de la absorción gastrointestinal, una reacción inmunológica en el hígado por una enfermedad sistémica, enfermedades febriles o inflamación en el lecho visceral (32).

Una variedad de procesos inflamatorios hepáticos y extrahepáticos fue hallado en los animales con NRSR de nuestro estudio. Con frecuencia se observaba la acumulación de linfocitos y de células plasmáticas intrasinusoidales en aquellos cetáceos con severa NSRH en asociación con parasitosis de los conductos biliares, parásitos pulmonares e infestación de sacos paranasales, así como



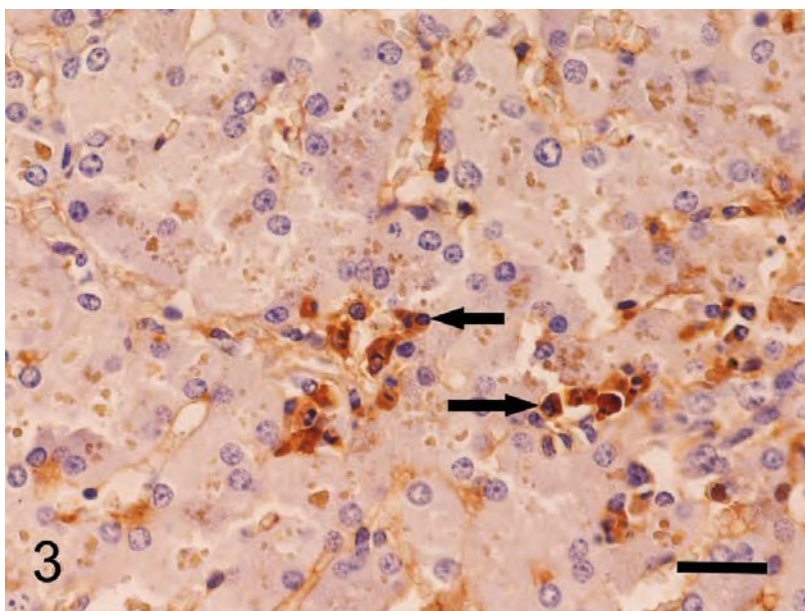
▲ Figura 2. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específica, se observan pequeños grupos de células CD3⁺ T en espacios porta y sinusoides hepáticos. ABC, Bar = 200 μ m.

infecciones bacterianas. Por lo tanto, este hallazgo, probablemente, sea consecuencia de la persistencia local o sistémica de la estimulación antigénica del sistema inmune causada por la infección o la infestación, lo cual ha sido descrito en seres humanos (28) y perros (9, 32).

Los anticuerpos anti-CD3, IgG, lisozima y proteína S100 expresaron inmunoreacción en los cortes procedentes de nódulos linfáticos de delfín, con un patrón similar a la obtenida en la especie de origen u otras especies (29). Estos resultados sugieren que estos anticuerpos son apropiados para estudios inmunohistoquímicos en tejidos fijados en formol. Esto es de interés debido a la escasez del número de anticuerpos de los leucocitos utilizados en tejidos. El estudio inmunohistoquímico reveló que la NSRH estaba compuesta principalmente por infiltración de células plasmáticas IgG⁺ dentro de los sinusoides y en los espacios porta, y en menor número de linfocitos T CD3⁺, principalmente localizados en los espacios porta. En otras especies, como el perro, la hepatitis crónica reactiva no específica está también caracterizada por un infiltrado linfoplasmocitario en los espacios portales y sinusoides

hepáticos (9, 32); sin embargo, todavía el inmunofenotipo de este infiltrado no ha sido descrito. La naturaleza del infiltrado inflamatorio observado en los cetáceos de este estudio sugiere una respuesta humoral local ya que las células IgG eran abundantes, mientras que la cantidad variable de linfocitos CD3⁺ indica una respuesta celular local variable.

La bioacumulación de Ocs en tejidos de delfines ha sido descrita en delfines (10, 14, 39), pero las implicaciones patológicas no están del todo claras (4, 37). Los niveles de PCB y DDT en el blubber y el hígado se consideraron en el rango medio con respecto a otras poblaciones de delfines (7, 35). La concentración de PCB en el blubber de cuatro de nuestros delfines fue más elevada que la concentración umbral establecida para mamíferos marinos (21). En los siete animales donde se detectaron PCBs, también se observó NSRH. Dos de los animales con mayor severidad de NSRH mostraron mayor concentración de derivados de PCBs, lo que podría estar relacionado con la patogenia de este proceso. Las concentraciones de DDT en algunos machos adultos analizados en este estudio puede haber sido peligrosa.



▲ Figura 3. Hígado de delfín mular. Hepatitis reactivas crónicas no específicas, mostrando un infiltrado inflamatorio en el parénquima hepático compuesto por numerosas células plasmáticas IgG⁺ (flechas). ABC, Bar = 50 μm.

Así, las concentraciones de DDTs en el hígado de tres machos adultos (TT 78, TT 93, C124) fueron más del doble de la dosis efectiva que produce desórdenes endocrinos en mamíferos terrestres (22) y marinos (36). Todos los animales analizados con pesticidas organoclorados mostraron NSRH, pero en éstos últimos la NSRH fue más severa. Lesiones hepáticas similares fueron observadas en especies salvajes como los osos polares y los zorros árticos expuestos a contaminantes orgánicos persistentes en su dieta natural (33, 34) donde las lesiones más comunes fueron hepatomegalia, esteatosis, leve hiperplasia biliar e infiltración vascular de leucocitos.

En conclusión, las hepatitis reactivas crónicas no específicas fueron observadas en animales con desórdenes extrahepáticos relacionados con procesos infecciosos o parasitarios y presencia de contaminantes persistentes en el blubber y el hígado. Los delfines con severa NSRH mostraron los niveles más elevados de PCBs en hígado. Aunque un efecto directo no puede ser establecido para cualquiera de estas etiologías es razonable presumir que la acción combinada de

estos contaminantes podría afectar a la salud de los animales estudiados. Grupos más amplios de animales deberían ser estudiados para saber más sobre los efectos fisiológicos de estos contaminantes en mamíferos marinos.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por la Consejería de Educación, Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias (Pi 2005/170). También queremos agradecer a Marisa Mohamad y Jamal Jaber por sus comentarios para la realización de este trabajo.

Bibliografía

- 1.- Baker, J.R. (1992). Causes of mortality and parasites and incidental lesions in dolphins and whales from British waters. *The Veterinary Record*, 130, 569-572.
- 2.- Bull, J.C., Jepson, P.D., Ssuna, R.K., Deaville, R., Allchin, C.R., Law, R.J., Fenton, A. (2006). The relationship between polychlorinated biphenyls in blubber and levels of nematode infestations in harbour porpoises, *Phocoena phocoena*. *Parasitology*, 132, 565-573.

- 3.- Carballo, M., Arbelo, M., Esperón, F., Mendez, M., de la Torre, A., Muñoz, M.J. (2008). Organochlorine residues in the blubber and liver of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) stranded in the Canary Islands, North Atlantic Ocean. *Environmental Toxicology*, 23, 200-210.
- 4.- Carvan, M., Busbee, D., Hansen, L. (2003). Mechanisms 305 of aromatic hydrocarbon toxicity: Implications for dolphin morbidity and mortality. In: *Toxicology in Marine Mammals*, Vos J, Bossart G, Fournier M, O'Shea T, Editors, Taylor & Francis, London, pp 432-458.
- 5.- Castrillon, J., Gomez-Campos, E., Aguilar, A., Berdié, L., Borrell, A. (2010). PCB and DDT levels do not appear to have enhanced the mortality of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) in the 2007 Mediterranean epizootic. *Chemosphere*, 81, 459-463.
- 6.- Cornaglia, E., Reborá, L., Gili, C., Di Guardo, G. (2000). Histopathological and immunohistochemical studies on cetaceans found stranded on the coast of Italy between 1990 and 1997. *Journal of Veterinary Medicine, A Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 47, 129-142.
- 7.- Corsolini, S., Focardi, S., Kannan, K., Tanabe, S., Borrell, A., Tatsukawa, R. (1995). Congener profile and toxicity assessment of polychlorinated biphenyls in dolphins, sharks and tuna collected from Italian coastal waters. *Marine Environmental Research*, 40, 33-53.
- 8.- Di Guardo, G., Agrimi, U., Morelli, L., Cardeti, G., Terracciano, G., Kennedy, S. (1995). Post mortem investigations on cetaceans found stranded on the coast of Italy between 1990 and 1993. *The Veterinary Record*, 136, 439-442.
- 9.- Egenvall, A., Bjoersdorff, A., Lilliehook, I., Olsson, E., Karlstam, E., Artursson, K., Hedhammar, A.,

- Gunnarsson, A. (1998). Early manifestations of granulocytic ehrlichiosis in dogs inoculated experimentally 329 with a Swedish Ehrlichia species. *The Veterinary Record*, 143, 412-417.
- 10.-Fair, P.A., Adams J., Mitchum G., Hulsey C.T., Reif J.S., Houde, M., Muir, D., Wirth, E., Wetzel, D., Zolman, E., McFee, W., Bossart, G.D. (2010). Contaminant blubber burdens in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two southeastern US estuarine areas: concentrations and patterns of PCBs, pesticides, PBDEs, PFCs and PAHs. *Science Total Environment*, 408, 1577-1597.
- 11.-Geraghty, J.M., Goldin, R.D. (1994). Liver changes associated with cholecystitis. *Journal of Clinical Pathology*, 47, 457-460
- 12.-Hall, A.J., Hugunin, K., Deaville, R., Law, R.J., Allchin, C.R., Jepson, P.D. (2006). The risk of infection from polychlorinated biphenyl exposure in the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): a case-control approach. *Environmental Health Perspectives*, 114, 704-711.
- 13.-Healey, C.J., Chapman, R.W., Fleming, K.A. (1995). Liver histology in hepatitis C infection: a comparison between patients with persistently normal or abnormal transaminases. *Gut*, 37, 274-278.
- 14.-Houde, M., Hoekstra P.F., Solomon K.R., Muir D.C.G. (2005). Organohalogen contaminants in delphinoid cetaceans. *Review Environmental Contamination Toxicology*, 184,1-57.
- 15.-Jaber, J.R., Pérez, J., Arbelo, M., Herráez, 354 P., Espinosa de los Monteros, A., Guisado, F., Fernández, T., Fernández, A. (2003). Immunophenotypic characterization of the hepatic inflammatory cell infiltrates in common dolphins. *Journal of Comparative Pathology*, 129, 226-230.
- 16.-Jaber, J.R., Pérez, J., Arbelo, M., Andrada, M., Hidalgo, M., Gómez-Villamandos, J.C., Van Den Ingh, T., Fernández, A. (2004). Hepatic lesions in cetaceans stranded in the Canary Islands. *Veterinary Pathology*, 41, 147-153.
- 17.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Allchin, C.R., Law, R.J., Kuiken, T., Baker, J.R., Rogan, E., Kirkwood, J.K. (1999). Investigating potential associations between chronic exposure to polychlorinated biphenyls and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. *The Science of the Total Environment*, 15, 339-348.
- 18.-Jepson, P.D., Bennett, P.M., Deaville, R., Allchin, C.R., Baker, J.R., Law, R.J. (2005). Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 238-248.
- 19.-Kajiwara, N., Kunisue, T., Kamikawa, S., Ochi, Y., Yano, S., Tanabe, S. (2006). Organohalogen and organotin compounds in killer whales mass-stranded in the Shiretoko Peninsula, Hokkaido, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, 52, 1066-1076.
- 20.-Kajiwara, N., Watanabe, M., Wilson, S., Eybatov, 378 T., Mitrofanov, I.V., Aubrey, D.G., Khuraskin, L.S., Miyazaki, N., Tanabe, S. (2008). Persistent organic pollutants (POPs) in Caspian seals of unusual mortality event during 2000 and 2001. *Environmental Pollution*, 152, 431-442.
- 21.-Kannan K., Blakenship, A.L., Jones P.D., Giesy J.P. (2000). Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human Ecological Risk Assessment*, 6, 181-201.
- 22.-Kelce, W., Stone, C., Laws, S., Gray, L., Kempainen, J., Wilson, E. (1995). Persistent DDT metabolite, p,p-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 375,581-585.
- 23.-Kennedy, S., Smyth, J.A., Cush, P.F., Mcaliskey, M., McCulloughl, S., Rima, B.K. (1991). Histopathologic and immunocytochemical studies of distemper in harbor porpoises. *Veterinary Pathology*, 28, 1-7.
- 24.-Kirkwood, J.K., Bennett, P.M., Jepson, P.D., Kuiken, T., Simpson, V.R., Baker, J.R. (1997). Entanglement in fishing gear and other causes of death in cetaceans stranded on the coasts of England and Wales. *The Veterinary Record*, 14, 94-98.
- 25.-Kuiken, T., Baker, J.R. (1991). Guidelines for the postmortem examinations of cetaceans. London, Zoological Society of London.
- 26.-Liaw, Y.F., Sheen, 402 I.S, Chu, C.M, Chen, T.J. (1984). Chronic hepatitis with non specific histological changes. Is it a distinct variant of chronic hepatitis? *Liver*, 4,55-60.
- 27.-MacSween, R.N.M. (2002). Pathology of the liver. 4th ed. London, New York. Churchill Livingstone, pp 828.
- 28.-Mansuy, D. (1997). Molecular structure and hepatotoxicity: compared data about two closely related thiophene compounds. *Journal of Hepatology*, 26, 22-25.
- 29.-Pérez, J., García, P.M., Mozos, E., Bautista, M.J., Carrasco, L. (2001). Immunohistochemical characterization of hepatic lesions associated with migrating larvae of *Ascaris suum* in pigs. *Journal of Comparative Pathology*, 124,200-206.
- 30.-Ridgway, S.H. (1972). Homeostasis in the aquatic environment. In: *Mammals of the sea: Biology and Medicine*, ed. Ridgway SH. Thomas, Springfield, pp. 590-741.
- 31.-Ross, P., De Swart, R.L., Addison, R., van Loveren, H.,

- Vos, J., Osterhaus A. (1996). Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk?. *Toxicology*, 112, 157-69.
- 32.-Rothuizen, J., Van Den Ingh, T. (1998). Hepatitis in dogs; a review. *Tijdschr Diergeneesk*, 123, 246-252.
- 33.-Sonne, C., Dietz, R., Leifsson, P.S., Born, 425 E.W., Letcher, R.J., Kirkegaard, M., Muir, D.C., Riget, F.F., Hyldstrup, L. (2005). Do organohalogen contaminants contribute to histopathology in liver from East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*)? *Environmental Health Perspectives*, 11, 1569-1574.
- 34.-Sonne, C., Wolkers, H., Leifsson, P.S., Jenssen, B.M., Fuglei, E., Ahlstrøm, O., Dietz, R., Kirkegaard, M., Muir, D.C., Jørgensen, E. (2008). Organochlorine-induced histopathology in kidney and liver tissue from Arctic fox (*Vulpes lagopus*) *Chemosphere*, 71, 1214-1224.
- 35.-Stein, J.E., Tilbury, K.L., Meador, J.P., Gorzelany, J., Worthy, G.A.J. and Krahn, M. (2003). Ecotoxicological investigations of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) strandings: accumulation of persistent organic chemicals and metals. In: *Toxicology in Marine Mammals*, J. Vos, G. Bossart, M. Fournier and T. O' Shea, Eds, Taylor and Francis, New York, pp. 458-488.
- 36.-Tanabe, S., Iwata, H., Tatsukama, R. (1994). Global contamination by persistent organochlorines and their ecotoxicological impact on marine mammals. *The Science of the Total Environment*, 154, 163-177.
- 37.-Troisi, G.M., Haraguchi, K., Kaydoo, D.S., Nyman, 449 M., Aguilar, A., Borrell, A., Siebert, U., Mason, C.F. (2001). Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenylethane (DDE) methyl sulfones in tissues of seal and dolphin morbillivirus epizootic victims. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 62, 1-8.
- 38.-Volta, U. (2008). Liver dysfunction in celiac disease. *Minerva Medica*, 99, 619-629.
- 39.-Weisbrod., A.V., Shea, D., Moore, M. J., Stegeman, J.J. (2001). Species, tissue and gender-related organochlorine bioaccumulation in white-sided dolphins, pilot whales and their common prey in the northwest Atlantic. *Marine Environmental Research*, 51, 29-50.