

Efecto del proceso de transportación sobre el estrés en delfines nariz de botella *Tursiops truncatus*.

Luz María Hernández Ballesteros
Omar Hernández Pérez

Resumen

Para conocer el efecto de la transportación (por períodos de 3 a 18 horas) sobre el estrés en los delfines nariz de botella (*Tursiops truncatus*), se midieron los niveles séricos de cortisol, de la b-glucuronidasa y del malondialdehído antes y después de su transportación de un delfinario a otro. Los valores a las 3 horas muestran un aumento significativo (Kruskall-Wallis $p < 0.05$) del cortisol cuando se comparan con el valor inicial (32 ± 3 vs. 68 ± 18 ng/ml). El mismo comportamiento mostró la actividad de la b-glucuronidasa (0.47 ± 0.06 vs. 1.09 ± 0.15 ng/mg prot/hora). Los valores de ambos parámetros (cortisol y b-glucuronidasa) al inicio y al final del transporte de 18 horas fueron similares 42 vs 34 ng/ml y 70 vs 72 ng/mg prot/hora. Los valores para la determinación del malondialdehído (MDA) durante ambos tiempos de transporte son más altos al final que al inicio del experimento (66 ± 14 vs. 91 ± 16 y 88.5 ± 5.5 vs. 108.5 ± 2.5 nmoles /mg prot respectivamente). Estos resultados sugieren que los delfines que viajan por tres horas se estresan más y que conforme transcurre la transportación (18 horas) parece haber un proceso de aclimatación.

Abstract

To know the effect of transportation (periods 3 to 18 hours) on the stress of the bottle nose dolphin *Tursiops truncatus* the blood levels of cortisol, the activity of b-(glucuronidase), and the concentration of (malondialdehyde) (MDA) were measured previous to, and/or during, the process of transportation from one dolphin aquarium to another. The values or cortisol at 3 hours increase significantly (Kruskal-Wallis $p < 0.05$) compared with the initial values (32 ± 3 vs 68 ± 18 mg/ml). The same behavior is show in the activity of b-glucuronidase (0.47 ± 0.06 vs 1.09 ± 0.15 ng/mg prot/hour). The values of both parameters (cortisol, b-glucuronidase) at the initial and the final of the process of transportation of 18 hours were similar (42 vs 34 ng/ml and 70 vs 72 ng/mg prot/hour). The values of determination of malondialdehyde (MDA) in both times of the process of transportation were higher at the final than at the initial of the experiment (66 ± 14 vs 91 ± 16 and 88.5 ± 5.5 vs 108.5 ± 2.5 nmoles/mg prot respectively). These results indicate that the dolphins which travel 3 hours gets more stressed and as the transportation process occurs, there seems to be an acclimation process.

Résumé

Pour connaître l'effet du transport (périodes de 3 à 18 heures) sur le stress des dauphins "nez de bouteille" (*Tursiops truncatus*), on a mesuré les niveaux sériques de cortisol, de la b-glucuronidase et du dialdéhyde malonique avant et après leur déplacement d'un dauphinarium à un autre. Les valeurs après 3 heures montrent une augmentation significative du cortisol (Kruskall-Wallis $p < 0,05$) quand on le compare avec la valeur initiale (de 32 ± 3 contre 68 ± 18 mg/ml). Le même comportement a montré l'activité de la b-glucuronidase ($0,47 \pm 0,06$ contre $1,09 \pm 0,15$ ng/mg prot./heure). Les valeurs des deux paramètres (cortisol et b-glucuronidase) au début et à la fin du transport d'une durée de 18 heures ont été similaires: 42 contre 34 ng/ml et de 70 contre 72 ng/mg prot./heure. Les valeurs pour la détermination du dialdéhyde malonique (MDA) durant les deux transports sont plus hautes à la fin qu'au début de l'expérience (66 ± 14 contre 91 ± 16 et $88,5 \pm 5,5$ contre $108,5 \pm 2,5$ nmoles/mg prot. respectivement). Ces résultats suggèrent que les dauphins qui voyagent trois heures se stressent plus que quand ils voyagent pour une durée de 18 heures, où il semble que se crée un processus d'acclimation.

* Instituto de Recursos, Universidad del Mar.

* Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Investigación Médica en Bioquímica, I.M.S.S.

Introducción

El delfín de nariz de botella *Tursiops truncatus* (Montagu) es quizás el delfín más conocido y el mejor estudiado a causa de la facilidad con que se adapta al cautiverio, también es el mayor de los delfines, llegando a medir cuando es adulto hasta 4 m con un peso de 650 Kg (Harrison y Bryden,1991).

A principios de este siglo los delfines comenzaron a tener importancia para fines recreativos, y hasta hace pocos años con fines científicos. Por ejemplo, el estudio de los delfines en cautiverio ha proporcionado los conocimientos científicos suficientes para el control adecuado de la calidad de agua de los delfinarios (Martín, 1990). La mayoría de los cetáceos en cautiverio en los últimos 50 años se capturaron directamente en el medio silvestre, aunque existen datos de que en 1983 el 32% de los delfines cautivos en los Estados Unidos había nacido en delfinarios (Reeves y Leatherwood, 1987). A veces son animales que han encallado, pero generalmente han sido animales libres, los cuales normalmente son capturados con red, ya sea individualmente o como grupos. Desafortunadamente el estrés que causa la captura, el transporte y el cautiverio inicial a menudo resulta con la muerte del animal durante los primeros días o semanas, así que éste es un periodo muy crítico (Martin,1990).

Se ha definido al estrés como la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda que se hace sobre él (Dierauf,1996). Esta demanda puede ser una quemadura, ejercicio, captura, cautiverio, transportación y muchas otras situaciones (Stahl y Dörner.1982). La definición anterior involucra un síndrome de adaptación general el cual se puede dividir en tres fases:

1.- Fase de alarma, caracterizada por una respuesta fisiológica rápida en la cual se estimula el eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA).

2.- Fase de compensación o adaptación, donde después de una exposición prolongada al agente estresante el organismo se adapta y compensa las condiciones alteradas que causan el estrés.

3.- Por último si el estrés es de suficiente intensidad y duración, la compensación puede no ser posible y el organismo entra a la tercera fase, o etapa de la mala adaptación o agotamiento del eje HHA (Dierauf,1990).

Dentro de las glándulas endocrinas relacionadas con el estrés se encuentran las suprarrenales, las cuales poseen una parte central, llamada médula suprarrenal y una porción externa denominada corteza suprarrenal. Todas las hormonas de la corteza suprarrenal son esteroides sintetizados a partir del colesterol. Producen en cantidades significativas sólo tres tipos de hormonas:

1. Andrógenos, 2. Mineralocorticoides, y 3. Glucocorticoides. En este último se incluye el cortisol, el cual es el que nos interesa, fundamentalmente por ser la hormona más importante en el proceso de adaptación del organismo al estrés (Solomon, et.al.,1996). El cortisol, también llamado hidrocortisona representa alrededor del 95% de los glucocorticoides suprarrenales y ayuda a asegurar el suministro adecuado de combustible para las células cuando el organismo está en estrés. Induce a las células hepáticas a la gluconeogénesis, es decir, la producción de glucosa a partir de otros nutrientes estimulando el transporte de aminoácidos hacia los hepatocitos. Promueve la movilización de grasas, para que haya ácidos grasos disponibles para su conversión a glucosa (Guyton y Hali,1996).

Los primeros estudios del sistema endocrino en los cetáceos consistieron en la descripción de las glándulas endocrinas en las ballenas obtenidas de la industria ballenera, así como la de los animales muertos por varamientos (Kirby, 1990). El seguimiento hormonal de la función adrenal es relativamente nuevo en los mamíferos marinos. Los primeros niveles de cortisol en vida libre que se reportaron fueron en la foca gris, la foca manchada o harpa y la foca de weddell y en cautiverio han sido reportados en la foca manchada o harpa, en el delfín nariz de botella y en la Beluga (Kirby,1990).

En términos generales se considera que los valores normales del cortisol para los delfines nariz de botella podrían estar comprendidos en-

tre los 11 y 47 ng/ml. Estos valores se obtuvieron en delfines tanto recién capturados, como con bastante tiempo en cautiverio (Kirby, 1990).

También se ha demostrado que el estrés denominado emocional por algunos investigadores, está acompañado por una activación de los procesos fisiológicos mediados por radicales libres, particularmente la peroxidación de lípidos (Sosnovsky, *et al.*, 1993; Liu y Mora, 1994 y Sudakov y Sosnovsky, 1996). La oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (lípidos) involucra muchas reacciones complejas; produciéndose entre otros compuestos el malondialdehído (MDA). El MDA se produce principalmente por la peroxidación de ácidos grasos con más de tres dobles ligaduras separadas por un metileno, por lo tanto se origina del ácido araquidónico y del docosaexanoico (Gardner, 1989).

El método más usual para medir la concentración de los productos derivados de la lipoperoxidación, está basado sobre la reacción del MDA y de otros aldehídos con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico para constituir lo que se ha denominado sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Gardner, 1989).

La homeostasis, definida como la tendencia de los organismos a mantener el ambiente interno relativamente constante, se encuentra regulada por varias hormonas y se mantiene en equilibrio gracias a los cambios que ocurren en el metabolismo celular, permitiendo de esta manera la adaptación del organismo al estrés (Miluk, *et al.*, 1994).

Existe una buena evidencia de que el aumento de los niveles sanguíneos del cortisol en algunos mamíferos incluido el humano reflejan una respuesta a un estado de estrés (Miluk, *et al.*, 1994). La importancia de realizar una investigación que permita adaptar dichos hallazgos a los mamíferos marinos es evidente ya que en la actualidad es necesario tener una medida cuantitativa confiable y reproducible de los efectos de diversos factores causantes del estrés, sobre la regulación del metabolismo, entre los cuales se encuentran el cautiverio y la transportación (Dierauf, 1990).

Por otro lado se sabe que los cambios en los niveles de glucocorticoides pueden modificar la estabilidad membranal de los lisosomas aumentándola o disminuyéndola en diferentes casos (Esterbauer, Schahur y Zollner, 1991; Weissman y Thomas, 1962) Además el cortisol parece poseer un efecto directo favorecedor de la oxidación de los ácidos grasos en las células (Guyton y Hali, 1996).

La relación entre los cambios en los niveles de cortisol con los subsecuentes cambios en otros parámetros bioquímicos podrían proporcionar información útil para esclarecer un poco más los mecanismos a través de los cuales los delfines manejan el estrés. Hasta la fecha no se ha estudiado la relación entre el grado de estrés producido por el transporte de los tursiones en cautiverio y los niveles séricos de cortisol, enzimas lisosomales y peroxidación de lípidos en los delfines nariz de botella. Por lo que la hipótesis de este trabajo fue que el proceso de transportación produce en los delfines nariz de botella un estado de estrés el cual modifica los niveles de 3 parámetros bioquímicos: el cortisol, la actividad de la enzima b-glucuronidasa y los del malondialdehído del suero sanguíneo.

Material y Métodos

Se usaron cinco delfines (dos hembras y tres machos) adultos, con edades de cautiverio de 2-5 años. Para el transporte de 3 horas se utilizaron 3 delfines y para el transporte de 18 horas 2 delfines. Antes de su transportación, los animales se sometieron a un ayuno previo de 12 a 14 horas.

Para su transporte, los delfines fueron acorralados hacia una zona de poca profundidad por medio de una red para sacarlos y colocarlos en una camilla con las características necesarias para no dañar al animal. Dichas camillas fueron colocadas en cajas contenedoras con la suficiente cantidad de agua con hielo para poder mantener la temperatura e hidratar a los animales durante el tiempo que duró el transporte. Además para evitar la deshidratación, se cubrieron con una pomada querotoplástica a base de Vitamina A, Calciferol, Aceite de hígado de bacalao y óxido de zinc cuyo nombre comercial es capent.

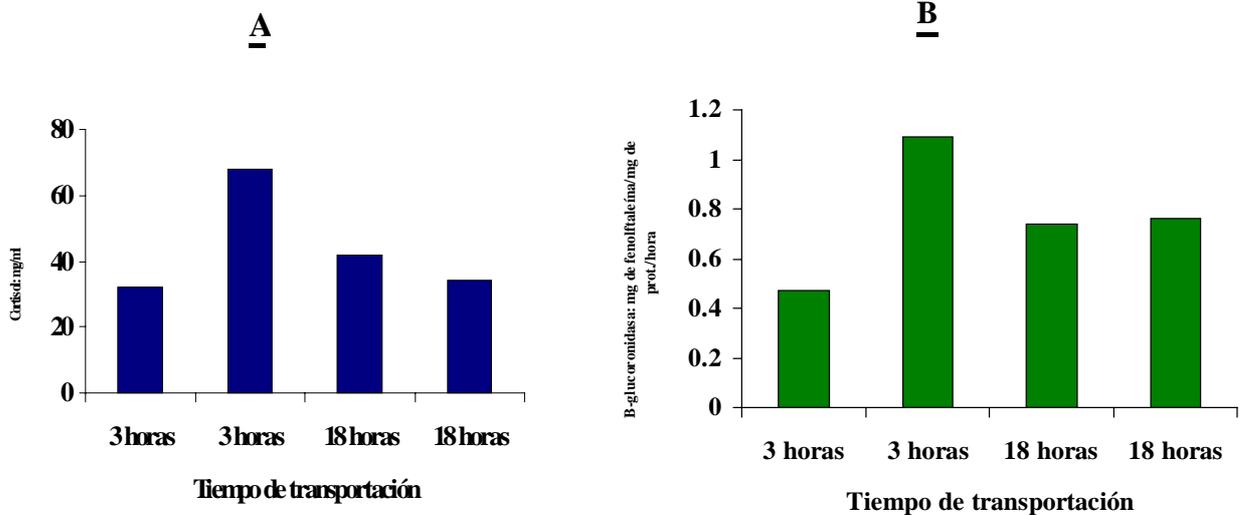


Figura 1. Concentración de malondialdehído medida en el suero de los delfines *Tursiops truncatus* que viajaron durante 3 y 18 horas. Los valores graficados representan el promedio \pm la desviación estándar de 3 animales (66 ± 14 vs. 91 ± 16 nmolas/mg prot) para el transporte de 3 horas y el promedio y los valores límites (superior e inferior) de 2 animales ($88,5 \pm 5,5$ vs. $108,5 \pm 2,5$ nmolas/mg prot) para el transporte de 18 horas.

Una vez que los animales estuvieron fuera del agua antes de la transportación y antes de colocarlos en el agua al final del transporte se tomaron muestras de sangre por lo que cada animal es su propio control.

Hay que hacer la aclaración que en el caso del transporte de 18 horas no se pudo realizar una medición a las 3 horas, debido a que la toma de muestra de sangre no es fácil por las condiciones en las que se transportan a los delfines, por lo que se tomó la decisión de no realizar esa toma de sangre.

Dichas muestras se tomaron con un sistema vacutainer: recogiendo la sangre en tubos sin anticoagulante de la vena del pedúnculo caudal. Estos tubos se colocaron dentro de una hielera (4°C) y se transportaron al laboratorio para ser centrifugados a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esto con el fin de separar el suero y congelarlo (-70°C) hasta su análisis posterior.

En estas muestras se midió la concentración de cortisol por el método de radioinmunoensayo establecido por Fahmy, Read y Hiller (1975). La actividad de la b-glucuronidasa fue evaluada por el método de Fischman y Barnfeld (1995). La determinación del malondialdehído se

realizó siguiendo el método de Yoshioka y cols (1979). Las proteínas se midieron por el método de Lowry y cols (1951).

Resultados

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de cortisol y para la actividad de la b-glucuronidasa después de 3 ó 18 horas de transportación. Cuando los valores de la concentración de cortisol obtenidos de suero de 3 delfines que viajaron durante tres horas (F) se comparan con los valores obtenidos antes de iniciar el transporte (I), se observa que aquellos muestran un incremento significativo de 32 a 68 ng/ml.

Este mismo comportamiento se observa para la actividad de la b-glucuronidasa, aunque el incremento al final del transporte es mucho mayor (0.47 vs. 1.09 ng/mg prot/hora, $p < 0.005$) que para el cortisol.

En esta misma figura se muestran los resultados obtenidos al inicio (I) y al final (F) de un transporte de dieciocho horas. Curiosamente, los valores a este tiempo de ambos parámetros (Cortisol y b-glucuronidasa) fueron similares (Mann-Whitney, $p = 0.33$ y $p = 1.00$ respectivamente),

Tabla I. Capacidad de respuesta al tiempo de transportación del delfín *Tursiops truncatus*.

	3 horas	18 horas
Cortisol (ng/ml)	2.1	0.8
β -glucuronidasa (ng fenoltaleína/mg prot/hr)	2.4	1.02

incluso la concentración de cortisol al final del transporte (F) sufrió un pequeño descenso aunque no significativo ($p=0.33$). Cuando se analiza la capacidad de respuesta al estresor ó índice de estrés, calculada por la relación F/I se observa que el índice de estrés es mayor en lapsos de transporte cortos (3 horas) que cuando los delfines viajan por periodos largos de 18 horas (tabla I). También puede observarse que esta capacidad de respuesta siempre fue mayor para la b-glucuronidasa que para el cortisol.

Los valores de malondialdehído (MDA) en el suero de los delfines durante el proceso de transporte tanto a las 3 como a las 18 horas, muestran que dichos valores son más altos al final (F) que al inicio (I) del experimento (66 ± 14 vs. 91 ± 16 y 88.5 ± 5.5 vs. 108.5 ± 2.5 nmolas/ mg prot respectivamente).

Además, los valores obtenidos en la figura 2 indican que para el transporte de 3 horas la diferencia es estadísticamente significativa (Mann-Whitney $p<0.05$) mientras que para el transporte de 18 horas el aumento al final del proceso, no es significativo.

Discusión

Existen muy pocos estudios que establezcan los niveles normales de cortisol en delfines. Además, parece evidente que la captura y la subsecuente separación de los animales del agua antes de obtener las muestras, inducen cierto grado de estrés. No obstante Thompson y Geraci (1986) encontraron valores “reposo” de cortisol sanguíneo,

es decir dentro de los 10 minutos posteriores, a lo que dichos autores han considerado como una captura tranquila, de 11.0-14.5 ng/ml, valores muy similares a los encontrados en otros animales silvestres medidos dentro del mismo lapso después de la captura (Vial *et al.*, 1979, Van Heerden y Bertschinger, 1982). A este respecto nuestros resultados presentados en la figura 1 sobre los niveles de cortisol medidos en las muestras tomadas después de la captura y poco antes del inicio (I) son más altos (30-34 ng/ml), que los valores “reposo” encontrados por Thompson y Geraci. Esta discrepancia en nuestros resultados probablemente se debe a que en nuestros experimentos las muestras se tomaron entre los 45-60 minutos, tiempo que transcurrió desde el inicio de la captura y hasta colocar a los delfines en la camilla correspondiente. Thompson y Geraci (1986) encontraron que 30 minutos después de sacar a los delfines del agua los niveles de cortisol se elevaron entre 66 y 70%.

Cuando las concentraciones de cortisol y la actividad de la b-glucuronidasa se midieron en el suero de los delfines que viajaron 18 horas, los valores obtenidos resultaron muy interesantes (figura1). Ya que después de 18 horas los delfines parecen compensar el efecto estresante del proceso de transportación.

Si además se toma en cuenta que el volumen para medir b-glucuronidasa es 10 veces menor que el necesario para medir cortisol, resulta evidente que medir la actividad de algunas otras enzimas lisosomales; sobre todo aquellas relacionadas con la degradación de

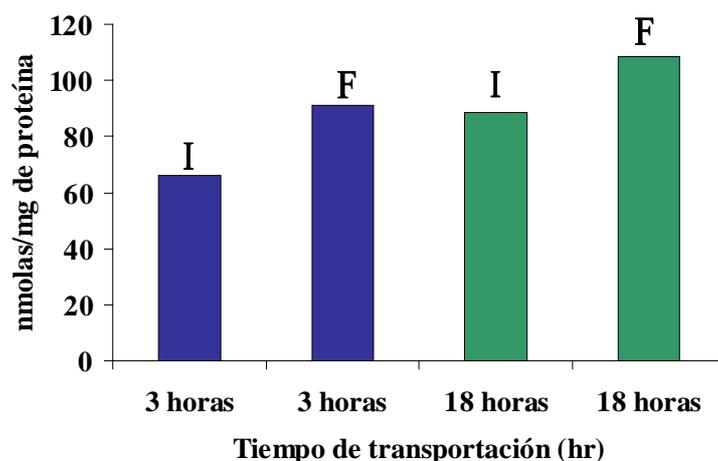


Figura 2. Efecto del tiempo de transportación sobre los niveles séricos del cortisol (Panel A) y de la actividad de la beta-glucuronidasa (Panel B) de los delfines *Tursiops truncatus*. Las barras representan, para el transporte de 3 horas, el promedio de 3 determinaciones y para el transporte de 18 horas, el promedio de 2 animales. La prueba de Kruskal - Wallis seguida por el método de comparaciones múltiples de Dunn, indica una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) sólo entre los valores al inicio (I) y al final (F) del transporte de 3 horas tanto para el cortisol como para la beta-glucuronidasa.

macromoléculas capaces de proporcionar energía, podría tener ciertas ventajas para medir el efecto de diferentes estresores.

Recientemente se ha demostrado que el estrés emocional se acompaña de la activación de procesos mediados por radicales libres particularmente la peroxidación de lípidos (Liu y Mori, 1994, Sosnovsky, *et al.*, 1993). La lipoperoxidación es frecuentemente el primer parámetro al cual se enfocan los investigadores cuando quieren probar la intervención de los radicales libres en el daño celular.

En el estado sano, la lipoperoxidación esta implicada en la regulación de la permeabilidad membranal y la actividad de enzimas unidas a la membrana incluyendo las enzimas lisosomales. Por otro lado los lisosomas regulan tanto la hidroperoxidación de lípidos así como la hidrólisis de los productos de la lipoperoxidación.

Estos procesos, normalmente, están regulados por sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Byung, 1994). Sin embargo el grupo de Mori (1994) ha demostrado que el estrés emocional puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS en inglés) que dañan estas defensas antioxidantes. Este proceso

produce un cambio considerable en el balance entre los factores oxidativos y antioxidativos particularmente en el cerebro.

Cuando se analizan los resultados obtenidos (figura 2) para la determinación del contenido de malondialdehído (como índice de la peroxidación de lípidos) en el suero de los delfines sometidos a estrés por inmovilización y transporte, observamos nuevamente un aumento al final (F) de dicho proceso comparado con los valores obtenidos al inicio (I). Estos resultados podrían indicar que la inmovilización a la que son sometidos los delfines durante el transporte induce la peroxidación de lípidos.

En nuestros experimentos es probable que la actividad de la b-glucuronidasa la cual es prácticamente igual al principio que al final de las 18 horas de transporte sea una consecuencia de la lipoperoxidación de los lípidos presentes en las membranas celulares, particularmente la membrana lisosomal disminuyendo su fluidez y haciéndola más rígida y por lo tanto inhibiendo a largo tiempo la liberación de enzimas lisosomales.

Otra posibilidad que podría explicar los resultados encontrados es que sea a nivel del cerebro donde se produce una lipoperoxidación, particularmente en el hipotálamo. Este proceso

inhibe la señal para la liberación de cortisol por las adrenales y por tanto una disminución en los niveles de cortisol después de un largo tiempo de estrés (18 horas). Por lo tanto 1.- Que este mecanismo no necesariamente es un proceso dañino al cerebro del delfín sino que forme parte de un mecanismo regulador de la respuesta o aclimatación al estrés y 2.- Que esta hipótesis es tentativa y que la comprobación de la misma podría involucrar estudios más complejos fuera del alcance de este trabajo.

Conclusiones

Puesto que la actividad de la b-glucuronidasa presenta modificaciones similares a las del cortisol en relación al estrés producido en los delfines; consideramos que este es el primer estudio en el que se demuestra que la medición de esta enzima lisosomal puede servir como un indicador del grado de estrés al que pueden estar sometidos los mamíferos incluido el humano.

Consideramos también que la medición, aun en sangre, de la b-glucuronidasa es más fácil de realizar que la medición de los niveles sanguíneos de cortisol, para determinar el grado de estrés en animales y aún en el humano.

Finalmente, concluimos que la peroxidación de lípidos a través de procesos metabólicos inducidos por radicales libres y cuyo metabolito principal es el malondialdehído podría servir como un parámetro más para evaluar condiciones de estrés, aunque desde luego se requiere un mayor número de estudios y quizás con otras especies las cuales puedan ser mejor controladas.

Pensamos que este trabajo es relevante debido a que las mediciones que se utilizaron como índices de estrés pueden ser aplicadas a cualquier mamífero tanto de laboratorios o bioterios, como de zoológicos para determinar el estrés al que están sometidos en condiciones de cautiverio y manejo.

Consideramos que es conveniente realizar estudios del curso temporal durante el transporte de los cambios del cortisol en relación con

otros parámetros fisiológicos los cuales podrían proporcionar información muy útil del mecanismo de aclimatación de los delfines al estrés.

En este sentido, una clara propuesta involucra el trabajar con el mayor número de individuos, de las diferentes especies de mamíferos marinos sujetos a estas condiciones de cautiverio y transportación.

La toma de muestras, en intervalos regulares durante el periodo de transportación, permitiría elaborar curvas de cambios en los niveles hormonales. Estas curvas serían un parámetro importante a considerar durante la planeación del transporte de los animales. Esto en el sentido de poder tener una idea clara del grado de estrés y aclimatación que sufrirá el individuo. Esto sería de relevante importancia dada la constante transportación de ejemplares.

De esta manera el presente trabajo, a pesar de sus limitaciones, representa un primer paso que bien puede indicar el curso a seguir en futuras investigaciones.

Es evidente que faltan estudios más pormenorizados de validación de los métodos de RIA, para cortisol y fotométricos, para los otros parámetros tanto para los delfines como para las otras especies de mamíferos marinos.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la Q.F.B. Luz María Ballesteros Negrete, su invaluable ayuda en el desarrollo de las técnicas utilizadas en este trabajo y la orientación sobre el comportamiento científico en el laboratorio. A la química Miriam Enriqueta Pérez Albarán, por su valiosa ayuda en el manejo del paquete para determinar cortisol. Del mismo modo, se aprecia el apoyo de las autoridades de Convimar, S.A., en especial al Dr. José Luis Solorzano, por todas las facilidades generosamente otorgadas para la realización de este trabajo. Finalmente a las autoridades del Instituto Mexicano del Seguro Social por facilidades prestadas para que este trabajo se realizara en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Bioquímica.

Bibliografía

- Byung, P.Y., 1994. Cellular defenses against damage from reactive Oxygen species. *Fisiol. Rev.* 74: 139-162.
- Dierauf, L.A., 1990. Stress in marine mammals: In *CRC Handbook of marine mammals medicine: health, disease and rehabilitation*, Dierauf, L.A. (Ed). American Veterinary Medical Association Congressional Science. Capitol Hill, Washington, D.C. p 545-551.
- Esterbauer, H., R. J. Scahur., H. Zollner., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hidroxy-nonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free. Radic. Biol. Med.* 11: 81-128.
- Fahmy, D., G. F. Read y S. G. Hiller., 1975. Some observation on the determination of cortisol in human plasma by radioimmunoassay using antisera against cortisol-3 BSA. *Steroids* 25: 267-273.
- Fischman, W. H. and P. Bernfeld., 1995. *Methods in enzymology*. Vol. I. Acad. Press. NewYork. 262.
- Gardner, H.W., 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic. Biol. Med.* 7:65-86.
- Guyton, A.C., J.E. Hali., 1996. *Tratado de Fisiología*, Capítulo 77, Hormonas Corticoadrenales. Interamericana Mc Graw-Hill. México. 1047-1062.
- Harrison, R., M.N. Bryden., 1991. *Ballenas, Del-fines y Marsopas*, Ed Encuentro, S.A.Barcelona. 240 pp.
- Kirby, V.L., 1990. Endocrinology of marine mammals: In *CRC Handbook of marine mammals medicine: health, disease and rehabilitation*. Dierauf, L.A. (Ed) American Veterinary Medical Associations Congressional Science. Capitol Hill, Washington, D.C. p 303-342.
- Liu, J., A. Mori., 1994. Involvement of reactive Oxygen species in emotional Stress: A hypothesis based on the immobilization stress-induced oxidative damage an antioxidant defense changes in rat brain and the effect of antioxidant treatment with reduced glutathione. *Int J. Stress Manage.* 1: 249-263.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough., A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reactive. *J. Biol. Chem.* 193: 265-269.
- Martin, A. R., 1990, *The Illustrated Encyclopedia of Whales and Dolphins*. Portland House, New York. 192 pp.
- Miluk, K.B., Z. Obminski., R. Stupnicki and L. Golee. 1994. Effect of music treatment on salivary cortisol in patients exposed to presurgical stress. *Exp. Clin. Endocrinol.* 102: 118-120.
- Reeves, R.R. and S. Leatherwood., 1987. *The sea word book of dolphin*. Harcourt Brace Janvanovich. Publ. New York. 111 pp.
- Solomon, E. P., L. P. Berg., D.W. Martin and D.C. Ville. 1996. *Biología de Ville*. 3ª Ed. Capítulo 47 Hormonas animales: regulación endocrina. 931-954.
- Sosnovsky, A.S., T.S. Balashova. and A. A. kubatiev., 1993. Behavioral cluster and the rat brain antioxidant enzymes in immobilization stress. *Neurosciences.* 19:141-149.
- Stahl, F. and G. Dörner., 1982. Response of salivary cortisol levels to stress-situations. *Endokrinologie.* 80: 158-162.
- Sudakov, K.V. and A.S. Sosnovsky., 1996. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in brain regions after immobilization stress in august rats: Correlation with behavioral patterns. *Free Radicals in Brain Physiology and Disorders Academic Press.* New York. 377-386.
- Thomson, L. A. and J. R. Geraci., 1986. Cortisol, aldosterone and leucocytes in the stress response of bottle nose dolphin *Tursiops truncatus*. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 45: 1010-1016.
- Van Heerden, J. and H.J. Bertschinger., 1982. Serum cortisol concentration in captive tamed and untamed black-backed jackals (*Canis mesomelas*) and translocated dogs. *J.S. Af. Vet. Assoc.* 53: 235-237.
- Vial, G.C., G.H. Estabelfelt., C. E. Franti. and G.V. Ling., 1979. Influence of environmental of adrenocortical response at ATCH simulation in clinically normal dog. *Am. J. Vet. Res.* 40: 919-921.
- Weissman , G., I. Thomas., 1962. Studies on lysosomes. The effect of cortisone and enotoxin. *J.Clin. Invest.* 41: 1410. Abstracto.
- Yoshioka, T., K. Kawada., T. Shimada. Y M. Mori., 1979. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in theblood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 135: 372-376.