(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 669 246**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014 PCT/EP2014/078117**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091591**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014 E 14821586 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 3084432**

(54) Título: **Cuantificación de glucocorticoides en escamas, espinas, radios de aletas u otolitos de peces como biomarcadores de estrés crónico**

(30) Prioridad:

19.12.2013 EP 13198450
17.06.2014 EP 14172747

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2018

(73) Titular/es:

UNIVERSITEIT GENT (50.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25,
9000 Ghent, BE y
INSTITUUT VOOR LANDBOUW- EN VISSERIJONDERZOEK (ILVO) (50.0%)

(72) Inventor/es:

AERTS, JOHAN y
DE SAEGER, SARAH

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 669 246 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cuantificación de glucocorticoides en escamas, espinas, radios de aletas u otolitos de peces como biomarcadores de estrés crónico

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a la determinación del nivel de estrés experimentado por los peces, que puede usarse en la evaluación del estado de estrés crónico de peces. Más en particular, la presente invención se refiere al uso de escamas así como de otros tejidos calcificados tales como espinas, radio de aleta blando y otolitos tomados como muestra de peces para cuantificar los niveles de glucocorticoides en dichas escamas y otras matrices. Los niveles de dichos glucocorticoides - tal como cortisol o corticosterona - se acumulan a lo largo del tiempo en las escamas y reflejan las condiciones de larga duración y estresantes que han experimentado los peces durante sus vidas y que han afectado a su nivel de estrés. Por tanto, la presente invención da a conocer métodos *in vitro* para cuantificar el nivel de estrés crónico en peces usando escamas como matriz viable logística, y no invasiva, para una cuantificación exacta y precisa de dichas hormonas del estrés.

Técnica anterior

Los peces atraen cada vez más atención pública, científica y política por todo el mundo. Las pescas recreativa y comercial son importantes en nuestras sociedades; las cuestiones relacionadas con los peces tienen una posición sumamente relevante en las discusiones relacionadas con la biología de conservación (1) y los esfuerzos de protección medioambiental (por ejemplo, efectos del cambio climático, nuevos depredadores, nuevas relaciones animal-entorno sobre el estrés y como consecuencia sobre el estado físico) (2, 3). Las actividades antropogénicas (por ejemplo, la producción de energía, el tráfico marítimo, la contaminación industrial) comprometen las poblaciones silvestres (4). Por tanto, diversos esquemas de monitorización internacionales pretenden aclarar científicamente su impacto sobre el estado de salud de nichos oceánicos. Existe una situación similar para las poblaciones de aguas dulces, ya que están bajo amenaza por la erosión del suelo, fertilizantes, etc. a medida que aumenta la agricultura. La población humana sigue aumentando, convirtiendo en una prioridad primordial global la necesidad de una producción de alimentos sostenible. La proteína de los peces es una de las fuentes de proteína más importantes para el consumo humano. Ahora que las pesquerías alcanzan límites de rendimiento, la acuicultura se expande rápidamente por todo el mundo e impone una presión creciente a los acuicultores para producir de una manera óptima, sostenible y respetuosa con los animales (5, 6). Muchos peces (por ejemplo el pez cebra y la medaka) se usan como modelos de vertebrados y alternativas a los roedores en la investigación biomédica (por ejemplo en la investigación de la fisiología ósea). La obligación de mantener una innovación impulsada por la investigación en este sector, mientras el rendimiento económico global disminuye, se suma a la explotación del pescado. En el pasado reciente, la ética relativa al sufrimiento y el bienestar de los peces ha exigido más atención porque grandes números de peces están implicados en las pesquerías (7), las industrias de acuicultura con un crecimiento y una intensificación rápidos (8, 9), los acuarios públicos (10, 11) y los laboratorios de investigación científica (12). Apreciar y entender la biología de los peces como base para la gestión, el control y la toma de decisiones en la explotación de peces supone un reto fenomenal para los implicados, que proceden de una multitud de disciplinas (desde la biología molecular hasta la ecofisiología), con vistas desde múltiples ángulos (todas las diferentes partes interesadas) y representando una experiencia altamente específica y preciada. En este marco, nuevos biomarcadores validados científicamente para evaluar los niveles de estrés en peces, en particular de estrés crónico, son de máxima importancia.

El bienestar de los peces se ve comprometido fácilmente, y está creciendo el consenso de que una evaluación apropiada del bienestar requiere indicadores fisiológicos, de base animal, que sean superior a parámetros relacionados con la explotación indirectos, menos consistentes, tal como la calidad del agua. Sin embargo, existe una escasez de biomarcadores prácticos, fiables y validados para el estrés crónico. Un biomarcador usado frecuentemente, aparentemente lógico, para los peces es el nivel sanguíneo del “esteroide de estrés” cortisol. Los peces que se enfrentan a estímulos estresantes lanzan una respuesta al estrés endocrina a través de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal (HPI) para liberar cortisol (13, 14) a la sangre. El cortisol provoca un conjunto de cambios fisiológicos y de comportamiento (15-17) que permiten que el pez haga frente a las situaciones alteradas (18-20). El valor adaptativo de las acciones de cortisol a corto plazo está ampliamente reconocido (21, 22). Mucho menos se conoce sobre el estrés persistente y sus consecuencias en su mayor parte perjudiciales para la salud, el crecimiento y la reproducción (19, 20). Por tanto, la definición de un biomarcador de estrés crónico robusto, que pueda realizarse fácilmente y validado científicamente es de máxima importancia. Los niveles de glucocorticoides en plasma de peces muestran una variación en veinticuatro horas (23), no revelan la exposición durante la vida de los peces al estrés, y no proporcionan más que una instantánea del estado de cortisol en el momento del muestreo (24, 25). Además, el muestreo de sangre es invasivo y provoca inevitablemente estrés por confusión en los peces debido a la captura, la exposición al aire y la manipulación. Esto hace que el cortisol en plasma tienda a estar sesgado ya que los niveles aumentan rápidamente unos pocos minutos tras la confrontación con un factor de estrés (13). Los anestésicos adoptados para facilitar el muestreo de sangre pueden en sí mismos reducir o bloquear la activación del eje HPI, afectando de ese modo a la liberación de cortisol en la sangre y dando como resultado resultados erróneos (26, 27). También se aplican restricciones al ensayo de cortisol en matrices alternativas tal como secreción mucosa

(28, 29), el contenido de las tripas (29), las heces (30) y el agua (31, 32). La bibliografía pertinente carece de datos sobre el cortisol en una matriz adecuada para la evaluación del estrés crónico. Hasta el momento, la mayoría de los estudios han abordado solo el cortisol, y los informes sobre la(s) ruta(s) de producción de glucocorticoides (33) o su significación en el estrés crónico son escasos. Bertatto *et al.* (Aquaculture Reseach, 2009) explican que el cortisol puede medirse en el plasma, secreción mucosa de la piel, el contenido de las tripas, el músculo lateral y la aleta caudal de los peces. Scott *et al.* (General and Comparative endocrinology, Acad Press US, 2007) indica que los esteroides de los peces se miden en agua.

Los peces registran los eventos (a)bióticos y almacenan esta historia en tejidos calcificados (34-37). Como las plumas de los pájaros (38) y el pelo de los mamíferos (39), la matriz ideal para la evaluación del estrés crónico en peces debe cumplir al menos los siguientes criterios: (i) incorporación de glucocorticoides; (ii) crecimiento lento pero persistente; y (iii) facilidad de muestreo.

Las escamas elasmoideas, estructuras exoesqueléticas dérmicas calcificadas (40), crecen junto con los peces y consisten en una matriz colagenosa acelular, que se mineraliza con hidroxiapatita de calcio en la capa externa y revestida con una monocapa de células con propiedades similares a los osteoblastos y osteoclastos. Tras su retirada, una escama se regenerará en el plazo de días (41). Las escamas son una diana para los estímulos endocrinos. Una unión a estradiol-17b de alta afinidad y de baja capacidad se encontró en el citosol de escleroblastos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (42) y se han detectado inmunohistoquímicamente receptores de estrógenos en escamas de tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y de pargo dorado (*Sparus auratus*) (43). Una escama se recoge fácil y rápidamente con una lesión y un estrés insignificante para los peces sin confundir sus niveles de cortisol debido al procedimiento de muestreo.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Rutas principales de las hormonas esteroideas y analitos implicados en la respuesta al estrés crónico.[44]

Figura 2: Vista general esquemática del método.

Figura 3: Cantidades óptimas de matriz para escama, espina y radio de aleta blando para su validación.

Figura 4: Optimización del tiempo de extracción y repeticiones para el cortisol en escama, espina y radio de aleta blando.

Figura 5: Curva de calibración en diluyente y en matriz para cortisol en escamas de peces.

Figura 6: Análisis de plasma de cortisol (nM), glucosa (mM), lactato (mM), calcio total (mM) y osmolalidad (mOsmol kg^{-1}) en el día 42 de tratamiento. El cincuenta por ciento de las observaciones se producen entre los bordes inferior y superior de la caja (los cuartiles primero y tercero) y los bigotes se extienden hasta la observación más extrema, que no es más de 1,5 veces la amplitud intercuartilo de la caja; los círculos huecos representan valores fuera de la amplitud mencionada.

Figura 7: Análisis de genes hipotalámicos (*crf*), de la parte distal de la hipófisis (*pomc*) e interrenal (*star*) (expresión normalizada media - MNE) en el día 42 de tratamiento. Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 6.

Figura 8: Expresión génica de *atp1a1a* en laminillas (MNE) tras 42 días de tratamiento. Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 6.

Figura 9: Cortisol (pmol por escama) en escamas ontogenéticas tras 21 y 42 días de tratamiento (CCα = límite de decisión y CCβ = capacidad de detección). Un valor (2,8 pmol por escama) de ESTRÉS día 42 se omitió en el diagrama de caja por motivos de presentación. Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 6.

Figura 10: Diagrama de bolsas de la expresión de *col1a1* relativa de escamas ontogenéticas y de regeneración (MNE) frente a cortisol en plasma (nM). La bolsa contiene el 50 por ciento de todas las observaciones. El recuadro muestra cortisol (pmol por escama) en escamas de regeneración de 21 días. Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 6.

Figura 11: Análisis de plasma de cortisol (nM), glucosa (mM), calcio total (mM) y osmolalidad (mOsmol kg^{-1}) en el día 42 de tratamiento. El cincuenta por ciento de las observaciones se produce entre los bordes inferior y superior de la caja (los cuartiles primero y tercero) y los bigotes se extienden hasta la observación más extrema, que no es más de 1,5 veces la amplitud intercuartilo de la caja; los círculos huecos representan valores fuera de la amplitud mencionada.

Figura 12: Cortisol (pmol por escama) en escamas ontogenéticas tras 21 y 42 días de tratamiento (CCα = límite de decisión y CCβ = capacidad de detección). Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 11.

Figura 13: Cortisol (pmol por escama) en escamas de regeneración de 21 días de tratamiento (CCα = límite de decisión y CCβ = capacidad de detección). Los bigotes en los diagramas de caja se definen como en la Figura 11.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere al hallazgo de que el perfil de glucocorticoides en peces se captura en las escamas, y que los niveles de glucocorticoides en estas placas óseas dérmicas reflejan una muestra integrada en el tiempo del grado de estrés de los peces experimentado a lo largo del tiempo. De hecho, se considera que las escamas son una matriz ideal para la monitorización del estrés crónico en los peces ya que las escamas se muestrean fácilmente de una manera no invasiva y ya que las escamas permiten una preparación de muestras conveniente para una cuantificación adicional de los niveles de glucocorticoides en dichas escamas. Por tanto, la presente invención se refiere a métodos exactos, precisos y robustos para la cuantificación de glucocorticoides tales como cortisol en escamas de peces para evaluar la exposición de los peces al estrés durante un periodo de tiempo prolongado.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para cuantificar el nivel de estrés crónico en un pez que comprende:

- obtener al menos una escama de dicho pez,

- extraer glucocorticoides de dichas escamas,

- purificar los glucocorticoides extraídos de dichas escamas,

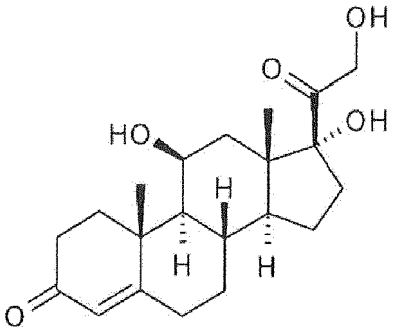
- cuantificar dichos glucocorticoides purificados, y

- correlacionar dichos glucocorticoides cuantificados con un nivel de estrés crónico

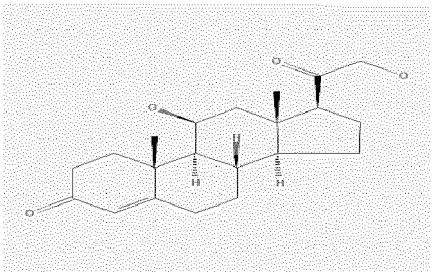
El término “glucocorticoides” significa cortisol cuando se toman escamas (elasmoideas) de un pez (*Pisces*) que pertenece a la infraclase *Teleostei,* y/o significa corticosterona cuanto se toman escamas (ganoides) de un pez que pertenece a la clase *Chondrichtyes,* y/o significa - cuando se requiere adicionalmente la detección de rutas extrainterrenales posibles - precursores de cortisol tal como 17α-hidroxiprogesterona y/o 11-desoxicortisol y/o precursores de corticosterona tal como 11-desoxicorticosterona, y/o significa metabolitos de cortisol tal como cortisona, U de Reichstein (o 20-dihidrocortisona), tetrahidrocortisol y/o tetrahidrocortisona y/o metabolitos de corticosterona ya que estos metabolitos pueden influir en los niveles de glucocorticoides en las escamas, de modo que se requiere adicionalmente su detección.

La estructura química de los glucocorticoides indicados anteriormente es la siguiente[45]:

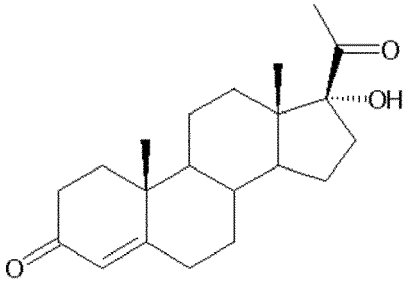
- Cortisol o 11β,17α,21-trihidroxipregn-4-eno-3,20-diona:



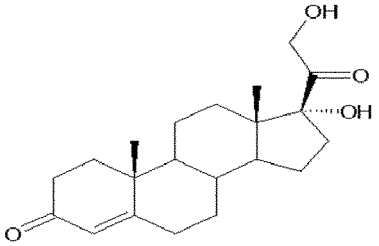
- Corticosterona o 11β,21-Dihidroxi-4-pregneno-3,20-diona:



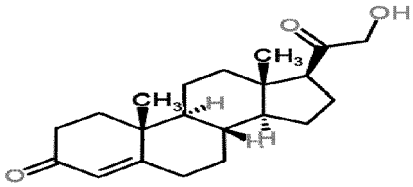
- 17α-Hidroxiprogesterona o 17α-Hidroxipregn-4-eno-3,20-diona:



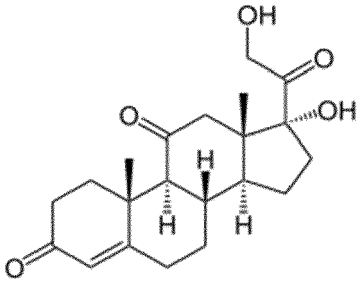
- 11-Desoxicortisol o 17α, 21-Dihidroxipregn-4-eno-3, 20-diona:



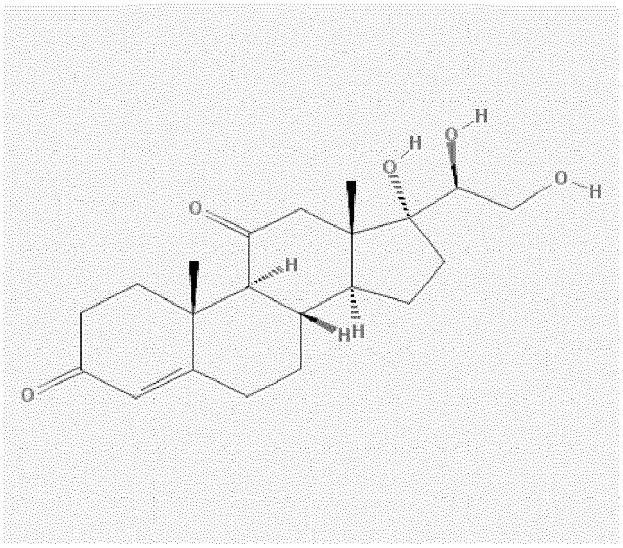
- 11-Desoxicorticosterona o 21-hidroxipregn-4-eno-3,20-diona



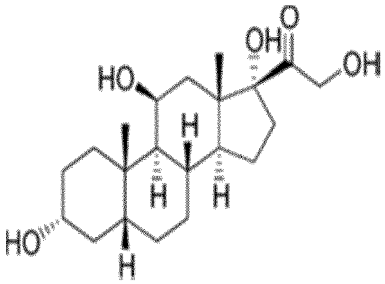
- Cortisona o 17α,21-Dihidroxi-pregn-4-eeno-3,11,20-triona:



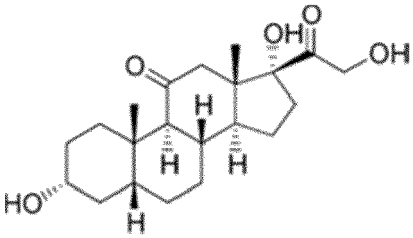
- U de Reichstein o 20-dihidrocortisona o 17a,20,21-trihidroxi-pregn-4-eeno-3,11-diona



- Tetrahidrocortisol o 3α,11β,17α,21-tetrahidroxi-5β-pregnaan-20-ona:



- Tetrahidrocortisona o 3α,17α,21-trihidroxi-5f3-pregnaan-11. 20-diona:



Por tanto, la presente invención se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dichos glucocorticoides son cortisol, 17α-hidroxiprogesterona, 11-desoxicortisol, corticosterona, 11-desoxicorticosterona cortisona, U de Reichstein, tetrahidrocortisol y/o tetrahidrocortisona. Como parámetro clásico considerado que refleja la respuesta al estrés en peces teleósteos, el cortisol se libera a la circulación sanguínea haciendo posible la incorporación en estructuras calcificadas y de ese modo un analito diana primario para la investigación del estrés crónico. Sus precursores 17α-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol se incluyeron en el método para desentrañar la existencia de posibles rutas extrainterrenales. Como la existencia de rutas extrainterrenales en los peces no se conoce en la actualidad, pero como hay indicaciones de rutas extraadrenales en humanos[46], ambos analitos se incorporaron en el método con fines de investigación futura. La existencia de una ruta de este tipo podría tener un profundo efecto sobre nuestra comprensión del eje HPI y como consecuencia del estrés. Los metabolitos cortisona, U de Reichstein, tetrahidrocortisol y tetrahidrocortisona también se incluyeron en el método ya que los glucocorticoides exógenos en el agua (procedentes de otros peces, actividades antropogénicas, etc...) pueden actuar como disruptor endocrino que influye posiblemente en el perfil de glucocorticoides en las escamas.

El término “peces” significa en esencia cualquier animal acuático vertebrado con laminillas, que tenga escamas, pero se refiere específicamente a peces que pertenecen a la clase taxonómica de *Chondrichtyes* (peces cartilaginosos) o la infraclase taxonómica de *Teleostei* (peces óseos).

La presente invención se refiere además específicamente a un método tal como se describió anteriormente, en el que dichos peces pertenecen a la infraclase de *Teleostei.*

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dichos peces que pertenecen a la infraclase de *Teleostei* son peces que pertenecen a la familia *Moronidae (*por ejemplo lubina), la familia *Sparidae* (por ejemplo pargos), la familia *Soleidae (*por ejemplo *Solea solea* y *Solea senegalensis*), la familia *Salmonidae* (por ejemplo salmón, trucha), el denominado pez real (por ejemplo seriola), la familia *Scombridae* (por ejemplo atún), la familia *Gadidae* (por ejemplo bacalao), la familia *Cyprinidae* (por ejemplo carpa común, carpa koi) y peces cíclidos (por ejemplo tilapia de Mozambique así como del Nilo).

El término “escama” significa placas óseas dérmicas que se encuentran normalmente en la piel de los peces que presentan aros concéntricos o anillos dependientes del crecimiento. Más específicamente, el término “escama” se refiere a una “escama elasmoidea” tal como se encuentra en teleósteos y se refiere a una “escama ganoidea” tal como se encuentra en *Chondrichtyes*.

El término “estrés crónico” en peces significa el estrés acumulado a lo largo del tiempo y que refleja condiciones de larga duración y estresantes debido a la manipulación, la mala calidad del agua, la densidad de población, depredación y varios otros factores antropogénicos tales como aeroturbinas, tráfico marítimo, toques, etc. Por tanto, el estrés crónico es una condición de larga duración de la que los peces no pueden recuperarse completamente. Los efectos directos de los factores de estrés, así como los cambios que se producen a nivel endocrinológico, el sistema inmunitario o a nivel funcional pueden ser responsables de las consecuencias (pre)patológicas que reducen el bienestar de dichos peces.

El término “obtener escamas de un pez” significa retirar al menos una escama de la piel de dicho pez (vivo o muerto) con por ejemplo unas pinzas finas. Dichas escamas pueden tomarse de cualquier parte del cuerpo de dicho pez: es decir dorsales, cranioventrales, medioventrales, caudales, del lado izquierdo o derecho, etc. Para estandarizar el método de la presente invención, se tomaron escamas de la zona mediodorsoventral dorsalmente con respecto a la aleta pectoral. Esta manera no invasiva de recogida de muestras no tiene ningún efecto sobre los peces ya que las escamas retiradas vuelven a crecer en un periodo de tiempo breve. Se ha comprobado que estas escamas regeneradas presentan el mismo perfil de incorporación de glucocorticoides en términos de estrés experimentado y proporcionan como tal una herramienta adicional para cuantificar el estrés crónico en un marco de tiempo bien definido.

Como el peso de una única escama depende de la especie de pez así como de la edad del pez, con escamas más pequeñas en peces juveniles, el número de escamas necesarias depende de ambos de estos factores. Por este motivo, el método de la presente invención se estandarizó usando una cantidad estandarizada de escamas que correspondía a por ejemplo 100 mg de escamas, aunque pruebas señalan que también pueden usarse cantidades más pequeñas (tal como 80, 60, 40, 20, 10, 5, 1 mg, etc. de escamas). El número de escamas que corresponde a 100 mg de escamas es a menudo aproximadamente de 40 a 80 escamas, tal como 60 escamas, pero debe quedar claro que el método de la presente invención puede realizarse usando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más escamas, teniendo en cuenta ambos factores que se mencionaron anteriormente.

Por tanto, la presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicho obtener al menos una escama de dicho pez es obtener entre 40 y 80 escamas de dicho pez.

El término “extraer glucocorticoides de dicha escama” se refiere a cualquier método para separar/extraer glucocorticoides de dichas escamas. Los métodos de extracción típicos - pero no limitativos - de la presente invención implican la extracción de glucocorticoides de una fase acuosa y a una fase orgánica. Disolventes de extracción que pueden usarse por ejemplo son metanol, 2-propanol, acetonitrilo, dietil éter, etc. Sin embargo, el metanol es un disolvente preferido.

Por tanto, la presente invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicho extraer glucocorticoides se lleva a cabo añadiendo metanol como disolvente de extracción. Un ejemplo de una extracción de la presente invención es tal como sigue: de la muestra de escamas homogeneizadas se pesan 0,1 g $\pm$ 0,001 g en un tubo de ensayo de 10 ml. Posteriormente se añaden 8 ml de metanol como disolvente de extracción y se añaden 10 μl de una disolución de cortisol-d_4 de 0,5 μg L^{-1} como patrón interno. La muestra se mezcla con vórtex durante 30 s, se pone en un agitador superior a 60 rpm durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifuga durante 10 min a 3500 g a 7ºC. Se toma todo el sobrenadante, se evapora hasta sequedad bajo nitrógeno a 60ºC usando un evaporador de nitrógeno y se reconstituyó en 5 ml de H_2O/MeOH (80:20; v/v) para una extracción en fase sólida (SPE) posterior.

El término “purificar los glucocorticoides extraídos de dicha escama” se refiere a cualquier método para convertir los glucocorticoides de la presente invención en puros o más puros así como concentrados o más concentrados, y/o, a eliminar impurezas tanto como sea posible.

Más en particular, la presente invención se refiere también a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicha extracción con metanol va seguida de una SPE (extracción en fase sólida). Un ejemplo no limitativo de una etapa de purificación de la presente invención es tal como sigue: tras acondicionar una columna C18 SPE con 3 ml de metanol seguido de 3 ml de agua ultrapura, se carga una muestra tal como se obtuvo anteriormente. Se lava la columna con 4,5 ml de H_2O/MeOH (65:35; v/v) y se eluyen los compuestos retenidos con 2,5 ml de H_2O/MeOH (20:80; v/v) en un tubo de ensayo de 10 ml y se evaporan hasta sequedad bajo nitrógeno a 60ºC usando un evaporador de nitrógeno. La muestra se reconstituye finalmente en 100 μl de H_2O/MeOH (80:20; v/v) en un vial y se analiza por medio de cromatografía de líquidos de resolución ultraalta acoplada con espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

El término “cuantificar dicho glucocorticoide purificado” se refiere a cualquier método para determinar la cantidad de glucocorticoides obtenidos tras la extracción/purificación tal como se describió anteriormente.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicho cuantificar glucocorticoides extraídos y purificados se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem ((U)HPLC-MS/MS)[47-48], cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con detección ultravioleta (HPLC-UV) y detección con red de diodos (HPLC-DAD)[49-50], o detección de fluorescencia (HPLC-FL)[51-52], cromatografía de gases (GC)[53-54], un (radio)inmunoensayo (enzimático) (RIA)[55-56] (EIA)[57-58] o una técnica a base de sensor[59-60].

La presente invención también se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicha cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem es espectrometría de masas en tándem de líquidos de resolución ultraalta.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método tal como se describió anteriormente, en el que dicho inmunoensayo es un radioinmunoensayo o un inmunoensayo enzimático.

El término “correlacionar dichos glucocorticoides cuantificados con un nivel de estrés crónico” se refiere al hecho de que los peces teleósteos estresados producen cortisol que se libera a la circulación sanguínea. Cuando esta carga de estrés se prolonga en el tiempo, el cortisol circula durante este tiempo prolongado en la sangre. Teniendo en cuenta la estructura de una escama, un cierto porcentaje de este cortisol bioactivo y que circula libremente se incorpora a la escama. Como las escamas crecen en el tiempo, esto da la oportunidad de cuantificar el cortisol y por tanto la carga de estrés en el tiempo. Conociendo esto, las escamas de peces expuestos a una carga de estrés variable pueden analizarse para determinar los glucocorticoides. Por ejemplo, los peces que se exponen a una carga de estrés menor (es decir confinamiento en un volumen reducido (tal como el 25% del volumen “original”) durante 30 min cada 2º día) tienen una cantidad de cortisol promedio de 1,70 $\mu g\ kg^{-1}$, mientras que este es de 3,44 $\mu g\ kg^{-1}$ en peces muy estresados (es decir confinamiento en el 10% de volumen durante 30 min, + persecución 5 min cada 2º día, + exposición al aire durante 1 min una vez a la semana).

Por tanto, la presente se refiere en esencia al uso de escamas de peces tomadas de un pez para determinar o cuantificar el nivel de estrés crónico de dicho pez.

La presente invención se refiere al uso tal como se describió anteriormente en el que dicha cuantificación/determinación se lleva a cabo mediante un método según los métodos descritos anteriormente.

Las escamas son la matriz más importante para la cuantificación del estrés crónico ya que se recogen de una manera no invasiva. Sin embargo, pueden usarse - en ciertas circunstancias - otras matrices calcificadas tales como otolitos, espinas y radios de aletas así como matrices para la cuantificación del estrés crónico. La última cuantificación puede llevarse a cabo de la misma manera que se describió anteriormente para las escamas. En particular, se cortan espinas y radio de aleta con tijeras y se homogeneizan cortándolos en trozos pequeños, mientras que los otolitos se retiran con un bisturí y se homogeneizan triturando usando un mortero.

Los radios de aleta blandos son flexibles, están segmentados y ramificados en la parte distal elongándose añadiendo un nuevo segmento a la punta. Las espinas no están segmentadas sino fusionadas desde la base y presentan un crecimiento continuo. Los otolitos forman parte de los órganos del equilibrio en el oído interno y se componen principalmente de carbonato de calcio cristalizado en forma de aragonita y de una proteína fibrosa, similar al colágeno, denominada otolina. Presentan incrementos diarios fácilmente discernibles que se depositan radialmente y se mantienen cuando el crecimiento somático es inexistente. Los radios de aleta blandos y las escamas pueden regenerarse rápidamente cuando se pierden o dañan.

Por tanto, la presente invención se refiere además al uso de las otras matrices calcificadas tal como una espina, un radio de aleta o un otolito tomados como muestra de un pez para cuantificar el nivel de estrés crónico de dicho pez.

Por tanto, la presente invención se refiere también a un método *in vitro* para cuantificar el nivel de estrés crónico en un pez que comprende:

- obtener al menos una espina, radio de aleta u otolito de dicho pez,

- extraer glucocorticoides de dicha espina, radio de aleta u otolito,

- purificar los glucocorticoides extraídos de dicha espina, radio de aleta u otolito,

- cuantificar dichos glucocorticoides purificados, y

- correlacionar dichos glucocorticoides cuantificados con un nivel de estrés crónico.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1: Desarrollo y validación de un método de UPLC-MS/MS para cuantificar glucocorticoides en escamas de lubina (*Dicentrarchus labrax*)

MÉTODOS Y MATERIALES

Instrumentación, materiales y reactivos

Se realizó un análisis cromatográfico en un Acquity UPLC-MS/MS Premier XE usando una columna Acquity Ultra Performance LC BEH C18 (1,7 μm; 2,1 x 100 mm) (Waters, Milford, USA). Se evaporaron las muestras hasta la sequedad con un evaporador de nitrógeno Turbovap™ (Biotage, Suecia). Se obtuvieron columnas Grace Pure™ SPE C18-Max (500 mg, 6 ml) para la extracción en fase sólida (SPE) de Grace Davison Discovery Sciences (Lokeren, Bélgica). Se obtuvo metanol de calidad como gradiente para cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Hipersolv Chromanorm) como disolvente de extracción de VWR International BVBA (Leuven, Bélgica), mientras que se usaron metanol absoluto LC-MS así como ácido fórmico de calidad ULC-MS de Biosolve BV (Valquenswaard, Países Bajos) y agua ultrapura de un Milli-Q gradient Q-Gard 2 de Millipore (Billerica, EE. UU.) como disolventes de fase móvil.

Compuestos, patrones y disoluciones

Solo se usaron productos con certificado de análisis. El cortisol, la cortisona, la 17α-hidroxiprogesterona y el 11-desoxicortisol eran de Sigma-Aldrich (Diegem, Bélgica). El tetrahidrocortisol y la tetrahidrocortisona eran de Sequoia Research Products Ltd (Pangbourne, Reino Unido). El cortisol-d_4 de CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canadá) se usó como patrón interno.

Se prepararon en metanol disoluciones patrón de reserva individuales de 1 mg ml^{-1} de todos los compuestos y patrón interno y se almacenaron a 4ºC. Se prepararon patrones de calibración, que oscilaban entre 0,005 mg l^{-1} y 0,1 mg l^{-1}, mediante la adición de 10 μl de una disolución de cortisol-d_4 de 0,5 μg l^{-1} a 0,5 μl, 1 μl, 2,5 μl, 5 μl y 10 μl de una disolución patrón de 1 μg l^{-1} en 100 μl de H_2O/MeOH (80:20; v/v), respectivamente. Como se usaron 100 mg de muestra, esto correspondía a un intervalo de desde 5 μg kg^{-1} hasta 100 μg kg^{-1} en matriz.

Muestreo

Todas las estructuras calcificadas se tomaron como muestra de lubina (*Dicentrarchus labrax*) sacrificada usando anestesia profunda con 2-fenoxietanol y matada mediante transección espinal. Todos los peces pesaban alrededor de 100 g. Se retiraron sesenta escamas de la zona mediodorsoventral izquierda dorsalmente con respecto a la aleta pectoral de la piel con pinzas finas. Se recuperaron cuatro espinas dorsales y seis radios de aleta blandos de la aleta caudal usando tijeras. Se tomaron dos otolitos sagitales del cráneo abierto. Todas las muestras se aclararon con agua ultrapura y se secaron al aire sobre un pañuelo de papel a temperatura ambiente.

Preparación de muestras

Se cortaron escamas, espinas y radios de aleta blandos en trozos finos usando tijeras. Se trituraron los otolitos en un mortero. Se aclararon las tijeras y el mortero con etanol seguido de agua ultrapura y se secaron con un pañuelo de papel. De la muestra homogeneizada se pesaron 0,1 g ± 0,001 g en un tubo de ensayo de 10 ml. Posteriormente se añadieron 8 ml de metanol como disolvente de extracción y se añadieron 10 μl de una disolución de cortisol d_4 de 0,5 μg l^{-1} como patrón interno. La muestra se mezcló con vórtex durante 30 s, se puso en un agitador superior a 60 rpm durante 1 h a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 min a 3500 g a 7ºC. Se tomó todo el sobrenadante, se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno a 60ºC usando un evaporador de nitrógeno, y se reconstituyó en 5 ml de H_2O/MeOH (80:20; v/v). Tras el acondicionamiento se cargó una columna C18 SPE con 3 ml de metanol seguido de 3 ml de agua ultrapura, muestra. Se lavó la columna con 4,5 ml de H_2O/MeOH (65:35; v/v) y los compuestos retenidos se eluyeron con 2,5 ml de H_2O/MeOH (20:80; v/v) en un tubo de ensayo de 10 ml y se evaporaron hasta sequedad bajo nitrógeno a 60ºC usando un evaporador de nitrógeno. La muestra se reconstituyó finalmente en 100 μl de H_2O/MeOH (80:20; v/v) en un vial y se analizó por medio de UPLC-MS/MS.

Análisis de LC-MS/MS

Se separaron los glucocorticoides usando una elución en gradiente de las fases móviles A y B. La fase móvil A era una mezcla de agua ultrapura con el 0,1% de ácido fórmico, mientras que la fase móvil B era una mezcla de metanol con el 0,1% de ácido fórmico. Inicialmente, la elución en gradiente comenzó al 20% (v/v) de fase móvil B. Posteriormente, la fase móvil B se aumentó hasta el 56% a 1,5 min, hasta el 63% a 6,5 min, hasta el 99,1% a 7,5 min tras lo cual se mantuvo al 99,1% hasta 8 min, y finalmente disminuyó hasta el 20% a 9 min y se mantuvo de esta manera hasta 10 min. La tasa de flujo se mantuvo constante a 0,4 ml min^{-1}, dando como resultado un tiempo de ejecución de 10 min. Las muestras se enfriaron a 7ºC en el muestreador automático. El volumen de inyección se fijó a 40 μl, mientras que la temperatura de la columna se mantuvo a 30ºC.

Se realizó un análisis cromatográfico en un espectrómetro de masas usado en el modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM) con el fin de conseguir una sensibilidad y selectividad óptimas. Para cada analito diana, se determinaron dos transiciones iónicas de fragmentos precursores. Se optimizaron los parámetros instrumentales mediante la infusión directa de 10 μg l^{-1} de disolución patrón en metanol + el 0,1% de ácido fórmico a una tasa de flujo de 10 μl min^{-1}. El uso de dos transiciones iónicas de fragmentos precursores permitió la determinación de la relación entre ambas transiciones, que se usó junto con el tiempo de retención relativo para la identificación y confirmación de la identidad de cada analito según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE[61]. El espectrómetro de masas se usó en el modo de ionización por electrospray positiva (ESI^+). Todos los compuestos se analizaron como sus aductos de protones $[M+H]^+$. Los ajustes del detector de MS se fijaron a los siguientes valores: una temperatura de fuente de 120ºC, una temperatura de desolvatación de 300ºC a un flujo de gas de 800 l h^{-1}, un flujo de gas cónico de 50 l h^{-1} y un voltaje capilar de 3 kV. Se usó argón como gas de colisión a una presión de 1,11. 10^{-2} mbar. Las condiciones de UPLC-MS/MS optimizadas con indicación del tiempo de retención, el ión precursor, los iones producto, el voltaje cónico y la energía de colisión para todos los compuestos se facilitan en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de UPLC-MS/MS optimizadas por compuesto

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ión precursor (m/z)	Cuantificación* y calificación de iones de fragmentos y traza (m/z)	Voltaje cónico (V)	Energía de colisión (eV)
‘20Dihidrocortisona	2,80	363,3	163,00*	35	25
			267,20		22
Cortisona	2,88	361,2	121,00*	45	37
			163,00		24
Cortisol-d_4	3,14	367,2	121,10*	35	20
			331,30		18
Cortisol	3,15	363,2	121,10*	35	20
			327,30		18
11-Desoxicortisol	3,95	347,2	97,10*	40	25
			109,10		30
Tetrahidrocortisol	4,26	367,1	313,20*	20	10
			331,30		10
Tetrahidrocortisona	4,49	365,1	329,20*	30	15
			347,20		12
17α-	5,66	331,2	97,00*	35	25
Hidroxiprogesterona			109,10		25

El análisis de los datos se realizó usando el software Quan/Targetlynx de Waters; los resultados del análisis se notificaron como el valor (μg kg^{-1}) ± la incertidumbre de medición expandida (μg kg^{-1}) con un factor de cobertura (k) de 2 (intervalo de confidencialidad del 95%).

Validación

Se hicieron muestras de validación para cada estructura calcificada combinando escamas, espinas, radios de aleta blandos y otolitos de 51, 51, 57 y 118 peces, respectivamente, criados en condiciones similares. No existe material de referencia certificado, pruebas de comparación dentro del laboratorio ni ningún otro método validado para las combinaciones de analito/matriz mencionadas anteriormente, y por tanto la validación se realizó usando adición de patrón a muestras de validación. Para cada estructura calcificada se sometieron a prueba cinco niveles de concentración, que oscilaban entre 1 y 50 μg kg^{-1}, por quintuplicado y esto se repitió en cuatro días diferentes en un

periodo de un mes en condiciones de intrarreproducibilidad, es decir por dos personas usando disoluciones diferentes y un sistema de UPLC-MS/MS. Todos los experimentos de validación se llevaron a cabo por personal autorizado en un entorno controlado con equipo calibrado y disoluciones controladas según los requisitos de la norma EN ISO/IEC 17025:2005[62]. Se realizó el análisis usando secuencias estandarizadas que consistían en diferentes patrones de calibración, blancos, controles negativos y positivos (todos en diluyente). Los resultados para cada compuesto se evaluaron evaluando el tiempo de retención (relativo) y las intensidades iónicas relativas del compuesto y fragmentos. Todos los parámetros de validación se determinaron y evaluaron según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE: exactitud, precisión, rango de trabajo, linealidad, límite de decisión (CCα), capacidad de detección (CCβ), sensibilidad y selectividad.

La recuperación aparente así como la precisión (repetibilidad y reproducibilidad dentro del laboratorio) para todos los compuestos se determinaron en condiciones de intrarreproducibilidad dando como resultado 20 análisis para cada nivel de concentración y un total de 100 análisis por compuesto y matriz. Debido a los bajos niveles de concentración, se realizaron una prueba de resultados discrepantes de Dixon[63] así como una prueba de Grubbs[64] para detectar posibles resultados discrepantes. El límite de decisión (CCα) se calculó como la intersección de la curva de calibración más 2,33 veces la desviación estándar en la reproducibilidad dentro del laboratorio (α = 1%), mientras que la capacidad de detección (CCβ) se calculó como la concentración de CCα más 1,64 veces la desviación estándar en la reproducibilidad dentro del laboratorio (β = 5%). La incertidumbre de medición expandida se basó en los datos de validación para la exactitud y la reproducibilidad dentro del laboratorio y se determinó usando dos enfoques diferentes, mediante suma lineal y mediante suma cuadrática o el método Nordtest. Además se monitorizaron la robustez del método y la estabilidad de los analitos en el diluyente así como en la matriz durante el desarrollo del método. Finalmente se determinó la incertidumbre de medición expandida mediante suma lineal así como mediante suma cuadrática o el método de Nordtest[47-52] (no hay consenso en la bibliografía sobre un método preferido).

RESULTADOS

Se desarrolló un método de cuantificación de UPLC-MS/MS para cortisol, sus precursores 17α-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol, cortisona y los metabolitos clave tetrahidrocortisol y tetrahidrocortisona en escamas de peces en un entorno acreditado según la norma EN ISO/IEC 17025:2005 y se validó según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE. Como parámetro clásico que se considera que refleja la respuesta al estrés en la mayoría de los peces, el cortisol se libera a la circulación sanguínea haciendo posible su incorporación en estructuras calcificadas y de ese modo un analito diana para la investigación del estrés crónico. Sus precursores 17α-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol se incluyeron en los análisis para cubrir la detección de posibles rutas extrainterrenales. Los metabolitos tetrahidrocortisol y tetrahidrocortisona también se incluyeron ya que los glucocorticoides exógenos (en el agua) pueden actuar como disruptor endocrino e influir en el perfil de glucocorticoides de las estructuras calcificadas estudiadas. El método se sometió a prueba y se validó para espina, radio de aleta blando y otolito también. Se aborda la conveniencia de la toma de muestras de escamas.

Desarrollo del método

Toma de muestras y preparación de muestras

Para cada estructura calcificada se determinó la ubicación para la toma de muestras. Las escamas son elementos esqueléticos mesodérmicos en los peces postmetamorfosis. No se encontraron diferencias en el contenido de cortisol en escamas tomadas de diversos lados (por ejemplo dorsal, cranioventral, medioventral o caudal) de los peces ni entre escamas tomadas del lado izquierdo y derecho. Deben evitarse las escamas para la línea lateral ya que difieren en la estructura. Por facilidad y propósitos de investigación futura (teniendo en cuenta la aplicabilidad en acuicultura) se eligieron escamas de la zona mediodorsoventral dorsalmente con respecto a la aleta pectoral. Las espinas en la lubina se encuentran entre otras en la parte craneal de la primera aleta dorsal (de 8 a 10 espinas). Las espinas no están segmentadas, sino fusionadas en la base y son por tanto más rígidas que los radios de aleta blandos. Se encontró una concentración mayor de glucocorticoides en espinas en su base, lo que requiere un mejor ajuste fino de la incorporación de cortisol a lo largo del tiempo en este tejido. Además, todas excepto las partes distales de la espina están cubiertas mediante epitelio. No se encontraron diferencias en el contenido de cortisol en radios de aleta blandos tomados de las aletas dorsales, cranioventrales, medioventrales y caudales. Teniendo en cuenta la aplicabilidad en acuicultura, se eligieron radios de aleta blandos de la aleta caudal. Se eligieron otolitos sagitales ya que son los más grandes y fáciles de retirar.

Con respecto a una combinación óptima de viabilidad logística y rendimiento analítico, la cantidad óptima de matriz para del análisis se determinó para cada estructura calcificada añadiendo de manera conocida diferentes cantidades de muestra, es decir diferente número de escamas, espinas y radios de aleta blandos del mismo pez, con 5 $\mu g\ kg^{-1}$ de los analitos diana. Los resultados para escama, espina y radio de aleta blando se presentan en la Figura 3. Teniendo en cuenta la aplicabilidad futura en acuicultura y la vida salvaje se eligieron 0,1 g de cada estructura calcificada para su validación.

Figura 3. Cantidades óptimas de matriz para escama, espina y radio de aleta blando para su validación

Para retirar la secreción mucosa, que se sabe que contiene glucocorticoides endógenos[65], así como exógenos, se llevó a cabo un lavado intenso de todas las muestras con agua ultrapura.

Se sometieron a prueba cuatro disolventes con diferente eficacia de extracción: metanol, 2-propanol, acetonitrilo y dietil éter. El metanol dio los mejores resultados para los diversos glucocorticoides en escamas así como en espinas y radios de aleta blandos; en otolitos no se observó una diferencia clara entre disolventes (datos no mostrados). A continuación, se sometió a prueba la dependencia del tiempo de incubación con metanol (15, 60, 120 min y 16 h) así como la extracción repetida. Para el cortisol en escamas de peces no se observó mejora de extracción tras 60 min de incubación. No se observó mejora de una segunda extracción, ni de una combinación de 15 min para 2 ciclos (frente a 1 ciclo de 60 min). Los resultados para escama, espina y radio de aleta blando se presentan en la Figura 4.

Figura 4. Optimización del tiempo de extracción y repeticiones para cortisol en escama, espina y radio de aleta blando

Como se necesita un método de alto rendimiento y económico, se estandarizó la extracción en escamas con 8 ml de metanol durante 1 h en un agitador superior a temperatura ambiente.

Procedimiento de SPE

Se usaron satisfactoriamente cartuchos C18 phase SPE para extraer glucocorticoides de muestras biológicas tales como plasma[66], orina[67], heces[68], y por tanto se eligió este tipo de columna para optimizar la extracción y purificación de los glucocorticoides seleccionados de la estructuras calcificadas en este estudio.

Las columnas Grace Pure™ SPE C18-Max (500 mg, 6 ml) son sorbentes de fase inversa con una carga de carbono del 17,1% unido poliméricamente en un soporte a base de sílice. El procedimiento de extracción en fase inversa se eligió dado que se une moderadamente a compuestos de polares a no polares de una matriz de muestras polares. Un tamaño de lecho de 500 mg da una capacidad de retención de sorbentes de 25 mg. Teniendo en cuenta el intervalo de concentración predicho de glucocorticoides en escamas así como en las otras estructuras calcificadas, esta capacidad de retención será suficiente para unirse a todos los analitos de interés. Las etapas de acondicionamiento, carga de muestra, lavado y elución para la SPE se optimizaron para el tipo de disolvente y el volumen. La etapa de acondicionamiento con 3 ml de metanol para activar los ligandos de sorbentes seguido de 3 ml de agua ultrapura para equilibrar el lecho de sorbentes dio los mejores resultados (recuperación promedio de cortisol > 90%). El volumen mínimo para ambos disolventes era 2,5 ml, mientras que pruebas usando volúmenes de más de 3 ml no mejoraron la purificación. La etapa de carga de muestra mediante la que se resuspendía la muestra evaporada en 5 ml de H_2O/MeOH (80:20; v/v) dio los mejores resultados. Las combinaciones de disolventes en las que se variaban la proporción de agua ultrapura y/o metanol dieron resultados inferiores a los óptimos. El lavado de la columna con 4,5 ml de H_2O/MeOH (65:35; v/v) dio los mejores resultados para la recuperación de glucocorticoides. Una concentración mayor de metanol condujo a la elución de glucocorticoides, mientras que una concentración inferior de metanol dio como resultado un aumento del ruido. Los compuestos retenidos se eluyeron con 2,5 ml de H_2O/MeOH (20:80; v/v) en un tubo de ensayo de 10 ml. Un menor volumen de elución o un aumento de agua ultrapura no recuperó todos los glucocorticoides, mientras que un mayor volumen de elución o un aumento de metanol era inferior al óptimo en cuanto a la rentabilidad y ya que eluye más compuestos interferentes de la matriz, respectivamente. Tras la evaporación, se reconstituyó la muestra en 100 μl de H_2O/MeOH (80:20; v/v) en un vial y se analizó por medio de LC-MS/MS. Se eligió la reconstitución en 100 μl por tener la posibilidad de una inyección doble. Las combinaciones de disolventes en las que se cambió la proporción agua ultrapura con respecto a metanol dieron resultados inferiores a los óptimos dado que el gradiente para el análisis cromatográfico se optimizó para comenzar a H_2O/Me-OH (80:20; v/v). La reconstitución en una concentración hasta H_2O/MeOH (20:80; v/v) era posible pero tenía efectos negativos sobre las formas de los picos cromatográficos.

Análisis cromatográfico

En una primera etapa para optimizar el análisis cromatográfico usando una columna Acquity Ultra Performance LC BEH C18 (1,7 μm; 2,1 x 100 mm), todos los compuestos así como el patrón interno se ajustaron usando el espectrómetro de masas en el modo de ionización por electrospray positiva (ESI^+) y negativa (ESI^-). Los resultados obtenidos en ESI^- dieron picos pequeños pero menos ruido, mientras que ESI^+ dio en general mejores resultados y se eligió para pruebas adicionales.

En una segunda etapa, se sometieron a prueba diferentes sistemas de gradientes usando agua ultrapura y disolventes no polares como metanol y acetonitrilo con el 0,1% de ácido fórmico. En primer lugar se sometieron a prueba gradientes usando agua ultrapura y acetonitrilo: una mayor concentración de partida de acetonitrilo dio un tiempo de retención más corto y solo se observó separación de cortisol, cortisona y 17α-hidroxiprogesterona; la ejecución de un gradiente que aumentaba lentamente la concentración de acetonitrilo dio como resultado la pérdida del pico de 17α-hidroxiprogesterona así como un tiempo de ejecución de 12 min convirtiendo el acetonitrilo en inadecuado como fase móvil. Posteriormente se sometieron a prueba gradientes usando agua ultrapura y metanol: tras ejecutar diferentes gradientes que oscilaban desde un aumento lento hasta uno muy rápido de la concentración

de metanol todos los compuestos se separaron completamente y se sometieron a prueba concentraciones variables de diferentes aditivos. El uso del 0,5% de ácido acético dio mejores resultados que formiato de amonio 2 mM a pH 3,0 o acetato de amonio a pH 5,0, pero peores que el 0,1% de ácido fórmico. Posteriormente se optimizó la concentración de ácido fórmico y se eligió el 0,1% de ácido fórmico; una concentración menor de ácido fórmico dio como resultado resultados inestables debido a la transferencia de métodos que usaban otros aditivos. Finalmente se optimizaron la temperatura de la columna y la tasa de flujo a 30ºC y 0,4 ml min^{-1}, respectivamente, para tener un tiempo de ejecución total de 10 min.

En una última etapa se optimizó el método de MS/MS: se aumentaron los tiempos de permanencia para una sensibilidad óptima para asegurar que los puntos por todo el pico para cada ión de todos los compuestos consistía en al menos 20 puntos de datos y las ventanas de marco de MS se optimizaron de manera correspondiente.

Validación

No están disponibles valores de concentración de glucocorticoides en escamas (o cualquier otra estructura calcificada) en la bibliografía publicada, lo que nos hizo optar por un rango de trabajo inicial de desde 1 $\mu g\ kg^{-1}$ hasta 50 $\mu g\ kg^{-1}$.

La recuperación aparente para cortisol en escamas de peces por debajo, a y por encima del nivel de CCβ oscilaba entre el 88,14% y el 98,85%, todas dentro del criterio de rendimiento del 80% al 110% según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE. A pesar del hecho de que la homogenización de la muestra de validación combinada no era óptima (es decir no era un polvo homogéneo, sino más bien una combinación de fragmentos muy finos), la repetibilidad para cortisol en escamas de peces oscilaba entre el 12,36% y el 17,15%. La reproducibilidad dentro del laboratorio oscilaba entre el 14,63% y el 20,02%. Los resultados para exactitud, precisión e incertidumbre de medición para los compuestos analizados en escamas de peces se presentan en la tabla 2.

Tabla 2: Valores para la exactitud (recuperación aparente AR, por ciento), valores de coeficiente de variación (CV, por ciento) para la precisión (repetibilidad CV_r y reproducibilidad dentro del laboratorio CV_R) e incertidumbre de medición expandida (U, por ciento) para todos los compuestos en escama de peces

Compuesto	Nivel (µg kg^{-1})	AR (%)	CV_r (%)	CV_R (%)	U^1(k=2) (%)	U^1(k=3) (%)	U^2(k=2) (%)
Cortisol	1	98,85	17,15	20,02	41,19	61,21	66,16
	5	88,14	12,36	15,01	41,88	56,89	58,08
	10	98,20	16,21	18,05	37,90	55,95	61,44
	25	90,97	13,81	14,85	38,73	53,58	56,08
	50	91,16	13,47	14,63	38,10	52,73	55,57
Precursores							
17α-Hidroxiprogesterona	1	114,00	27,83	32,08	78,16	110,24	106,46
	5	104,44	33,09	43,74	91,92	135,66	131,31
	10	123,75	13,09	21,98	67,71	89,69	91,08
	25	135,64	6,64	16,23	68,10	84,33	96,06
	50	141,34	7,79	18,38	78,10	96,48	109,63
11-Desoxicortisol	1	-[3]	-[3]	-[3]	-[3]	-[3]	-[3]
	5	68,53	20,09	26,44	84,35	110,79	96,79
	10	84,55	16,83	31,71	78,87	110,58	95,44
	25	102,42	8,59	15,37	33,16	48,53	56,19
	50	113,49	6,13	14,88	43,25	58,13	62,77
Metabolitos							
Cortisona	1	104,37	38,94	66,90	138,17	205,07	196,46
	5	96,88	27,81	38,51	80,14	118,65	112,94
	10	93,67	24,26	37,06	80,45	117,51	108,22
	25	83,21	19,78	25,61	68,01	93,62	82,52
	50	84,28	17,20	18,91	53,54	72,45	68,23
20-Dihidrocortisona	1	99,63	20,58	38,46	77,29	115,75	136,72
	5	102,05	18,72	37,38	76,81	114,19	119,88
	10	129,33	12,97	22,44	74,21	96,65	71,89
	25	138,74	12,35	18,61	75,96	94,57	73,71
	50	143,29	6,66	15,51	74,31	89,82	84,79
Tetrahidrocortisol	1	90,23	35,70	39,35	88,47	127,82	113,47
	5	95,97	31,72	30,10	64,23	94,33	90,78
	10	103,69	27,61	27,94	59,57	87,51	87,88
	25	104,04	25,11	24,42	52,88	77,30	78,88
	50	116,79	17,33	21,16	59,11	80,27	80,80

	1	103,17	45,30	50,81	104,79	155,60	150,09
	5	108,83	26,85	37,09	83,01	120,10	116,11
Tetrahidrocortisona	10	106,80	25,01	31,64	70,08	101,72	99,63
	25	103,61	24,83	34,06	71,73	105,79	104,19
	50	110,41	15,60	21,90	54,21	76,11	76,61

[1] Cálculo de la incertidumbre de medición expandida usando suma lineal con un factor de cobertura (k) de 2 (intervalo de confidencialidad del 95%) respectivamente de 3 (intervalo de confidencialidad del 99%)
[2] Cálculo de la incertidumbre de medición expandida usando suma cuadrática (método de Nordtest) con un factor de cobertura (k) de 2 (intervalo de confidencialidad del 95%)
[3] Respuesta insuficiente para el ión cualificador

Dado que en la investigación futura las curvas de calibración adaptadas a la matriz no son viables en la práctica, se determinaron posibles efectos de matriz comparando datos de curvas de calibración en diluyente con unas adaptadas con respecto a matriz en el intervalo de desde 5 μg kg^{-1} hasta 50 μg kg^{-1} para todos los compuestos en cada estructura calcificada. La Figura 5 no indica ningún efecto significativo para cortisol en escamas de peces (teniendo en cuenta la variación biológica de la muestra) pero como las curvas de calibración en diluyente y matriz están divididas normalmente, es posible la cuantificación usando curvas de calibración en diluyente.

Figura 5. Curva de calibración en diluyente y en matriz para cortisol en escamas de peces

Posteriormente, la linealidad de la respuesta para todos los compuestos en cada estructura calcificada se sometió a prueba usando curvas de calibración cuádruples en diluyente que consistían en cinco puntos de calibración, que oscilaban desde 5 μg kg^{-1} hasta 100 μg kg^{-1}, analizados en condiciones de reproducibilidad dentro del laboratorio. Cuando se evalúa la linealidad en este intervalo para todos los compuestos no se encontró ningún valor de coeficiente de determinación (R^2) menor de 0,99. Además, el modelo calculado indicó para todos los compuestos una distribución normal. Los resultados para la linealidad, CCα, y CCβ para todos los compuestos en una escama de pez se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: Coeficiente de determinación (R^2) de curvas de calibración y valores del límite de decisión (CCα, μg kg^{-1}) y la capacidad de detección (CCβ, μg kg^{-1}) para todos los compuestos en escamas de peces

Compuesto	R^2	CCα (µg kg^{-1})	CCβ (µg kg^{-1})
Cortisol	0,999	2,74	4,64
	Precursores de cortisol		
17α-Hidroxiprogesterona	0,998	2,37	3,90
11-Desoxicortisol	0,997	1,79	2,88
	Metabolitos de cortisol		
Cortisona	0,996	3,74	6,36
20-Dihidrocortisona	0,998	2,43	4,07
Tetrahidrocortisol	0,997	4,84	8,25
Tetrahidrocortisona	0,992	0,99	1,68

La sensibilidad del método se determinó haciendo una serie de dilución en muestras de matriz en blanco dando como resultado un método con buena sensibilidad para todos los compuestos en escamas de peces cuando se tiene en cuenta el rango de trabajo predicho. La selectividad del método se demostró analizando un blanco y muestras con contenidos conocidos. En las muestras con contenidos conocidos, todos los compuestos aparecieron en los tiempos de retención predichos con sus dos transiciones iónicas. Las relaciones de iones se compararon con la inyección de patrón y se encontró que eran aceptables según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE. Además no se observó ningún pico interferente.

La robustez del método se sometió a prueba durante el desarrollo del método para todas las etapas críticas como la extracción y la purificación de SPE variando el valor óptimo.

Se desarrolló un método de UPLC-MS/MS para cortisol, sus precursores (17α-hidroxiprogesterona y 11-desoxicortisol), cortisona y metabolitos (tetrahidrocortisol y tetrahidrocortisona) en escamas de peces en un entorno acreditado según la norma EN ISO/IEC 17025:2005 y se validó según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE y se demostró que era adecuado para sus propósitos pretendidos. Además, el método se sometió a prueba y se validó para otras tres estructuras calcificadas que son espina, radio de aleta blando y otolito.

Ejemplo 2: Cuantificación de niveles de glucocorticoides en escamas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) estresada frente a no estresada

Método y materiales (véase el ejemplo 1)

Configuración experimental

El ensayo consistía en 2 réplicas de 3 condiciones: control (estrés bajo, estrés medio y estrés alto). El estrés era una combinación de diversos tipos de factores de estrés (hacinamiento, persecución y exposición al aire) administrados aleatoriamente durante un periodo de 3 semanas. En diversos momentos impredecibles al día se administraron los factores de estrés tal como se indica:

• estrés bajo: confinamiento (el 25% de volumen), 30 min cada 2º día

• estrés medio: confinamiento (el 25% de volumen), 30 min, persecución 5 min cada 2º día

• estrés alto: confinamiento (el 10% de volumen), 30 min, persecución 5 min cada 2º día, exposición al aire 1 min una vez por semana

Se midió el cortisol en plasma por duplicado usando un RIA en una placa de 96 pocillos según Gorissen *et al.*[69]. El anticuerpo primario muestra una reactividad cruzada del 100% con cortisol, del 0,9% con 11-desoxicortisol, del 0,6% con corticosterona y < 0,01% con 11-desoxicorticosterona, progesterona, 17-hidroxiprogesterona, testosterona y estradiol. Todos los pocillos excepto los “no específicos” recibieron 100 μl de anticuerpo de cortisol (Cortisol Antibody[xm210] monoclonal y IgG purificada (Abcam); 1:2000 en NaHCO3 50 mM, NaH2CO3 50 mM, NaN3 a 0,02%, pH = 9,6) y se incubaron durante la noche a 4ºC. Al día siguiente, se lavaron las placas tres veces con 200 μl/pocillo de tampón de lavado (Tris 100 mM, NaCl al 0,9%, NaN3 al 0,02%). Posteriormente, los sitios no específicos se bloquearon mediante la adición de 100 μl de tampón de bloqueo (Tris 100 mM, NaCl al 0,9%, NaN3 al 0,02%, suero bovino normal al 0,25%) a cada pocillo. Las placas se cubrieron y se incubaron durante una h a 37ºC. Posteriormente, se añadieron 10 μl de patrón (4 pg - 2048 pg de cortisol/10 μl de tampón de ensayo que contenía Tris 100 mM, NaCl al 0,9%, ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico al 0,1%, NaN3 al 0,02%) o 10 μl de plasma sin diluir o medio de perifusión a pocillos designados. Los no específicos y B0 recibieron 10 μl de tampón de ensayo. Tras la adición de patrones y muestras, se añadieron 90 μl (333 Bq) de 3_H-hidrocortisona (PerkinElmer, EE. UU., 1:10.000 en tampón de ensayo) de disolución a todos los pocillos. Se incubaron las placas durante cuatro h a temperatura ambiente, o se almacenaron durante la noche a 4ºC. Las placas se lavaron entonces tres veces con tampón de lavado. Tras la etapa de lavado final, todos los pocillos recibieron 200 μl de “Optiphase hisafe-3 scintillation liquid” (PerkinElmer, EE. UU.) y se cubrieron. Se cuantificó la emisión beta mediante un recuento de 3 min por pocillo usando un Microbeta Plus (Wallac/PerkinElmer, EE. UU.). Las variaciones entre ensayos y dentro del ensayo eran del 12,5 y el 3,5%, respectivamente.

Resultados

CORTISOL EN PLASMA			
	Concentración de cortisol media (ng/ml) en plasma	Desviación estándar (ng/ml)	Coeficiente de variación (%)
Estrés bajo			
Réplica 1	274,81	151,81	55,24
Réplica 2	100,86	101,70	100,84
Todas las réplicas (20 muestras)	183,26	152,90	83,43
Estrés medio			
Réplica 1	319,00	106,04	33,24
Réplica 2	190,58	136,65	71,70
Todas las réplicas (20 muestras)	254,79	136,06	53,40
Estrés alto			
Réplica 1	112,64	95,22	84,53
Réplica 2	187,92	73,90	39,32
Todas las réplicas (20 muestras)	150,28	91,50	60,89
CORTISOL EN ESCAMA			

	Concentración de cortisol media (µg kg^{-1}) en escama	Desviación estándar (µg kg^{-1})	Coeficiente de variación (%)
Estrés bajo			
Réplica 1	1,90	1,00	53,58
Réplica 2	1,50	1,70	109,19
Todas las réplicas (20 muestras)	1,70	1,35	79,58
Estrés medio			
Réplica 1	2,40	2,00	83,29
Réplica 2	2,10	1,50	69,13
Todas las réplicas	2,27	1,72	75,86
Estrés alto			
Réplica 1	3,20	2,30	69,57
Réplica 2	3,60	4,00	109,08
Todas las réplicas (20 muestras)	3,44	3,15	91,50

Ejemplo 3: Cuantificación de niveles de glucocorticoides en escamas de carpa (*Cyprinus carpio* L.)

Método y materiales (véase también el ejemplo 1 y más)

Configuración experimental

El ensayo con carpa consiste en 2 réplicas de 4 condiciones, cada una con 6 peces: control (no estresados), dexametasona (inhibición de la ruta del estrés), cortisol (activación de la ruta del estrés) y estrés inducido mediante diversos factores de estrés dados de una manera aleatoria durante 6 semanas.

Métodos

Los procedimientos experimentales fueron según la legislación holandesa y aprobados por el comité de ética local. Se criaron carpas comunes (*Cyprinus carpio* L.) en la Radboud University de Nijmegen para garantizar el historial. Peces adultos en crecimiento (en el día 21: 340 ± 92 g y 24,6 ± 2,4 cm; en el día 42: 377 ± 108 g y 25,4 ± 2,5 cm), mantenidos bajo 12:12 h de luz:oscuridad, alimentados con 2 comidas al día (09:30 am y 15:30 pm) al 0,9% de peso corporal se mantuvieron a 20,0 ± 0,4ºC durante 6 semanas. Se configuraron cuatro grupos, con 2 réplicas de tanque por grupo, de 6 peces por tanque de 140 l cada uno. Los peces del grupo CTR se dejaron inalterados. Los grupos DEX y CORT recibieron alimento con contenido conocido a 500 mg kg^{-1}. El grupo ESTRÉS se estresó una vez al día; el tipo, la duración y la sincronización de los factores de estrés se aplicaron aleatoriamente e incluyeron: captura (15 - 60 min), exposición al aire (1 - 3 min), caída de temperatura (hasta 5ºC), persecución (hasta 10 min) y confinamiento (en un cubo con un nivel de agua bajo). Durante todo el experimento, no se observaron indicaciones de salud y comportamiento afectados. Tras 42 días se anestesiaron los peces en 2-fenoxi-etanol (0,1% v/v) y se sacrificaron, se tomó sangre de los vasos caudales y se recogieron escamas (escamas ontogenéticas y las regeneradas a los 21 días). Se analizó el plasma para determinar cortisol[69], glucosa[70], lactato[70], calcio total[71] y osmolalidad[70]. Se tomaron muestras de escamas de una fila estandarizada dorsalmente con respecto a la línea lateral. Se evaluó la MNE de genes diana usando *eef1a1 rps5* y *beta-actina* como genes de referencia[72]. Todos los parámetros se modelaron usando un modelo mixto lineal en SAS 9,4 (SAS Institute Inc., Cary, NC) con tratamiento, día de muestreo y su interacción (cuando era apropiado) como efectos fijos. Se introdujo una intersección aleatoria para el tanque en el modelo para corregir los agrupamientos de peces en los tanques. Se realizó la prueba de Dunnett para comparar los tratamientos con los controles.

Resultados

1) Control del fundamento y la ejecución de la configuración experimental

Durante un ensayo de 6 semanas, comparamos carpas inalteradas (CTR) y estresadas diariamente (ESTRÉS). Peces alimentados con dexametasona (DEX) o cortisol (CORT) sirvieron como controles negativo y positivo para la incorporación de cortisol en la escama, respectivamente. En todos los tratamientos la ración de alimento proporcionada se consumió en 5 minutos, todos los peces permanecieron clínicamente sanos tal como se indica mediante el factor de condición[73] y no se observó mortalidad. Se mantuvo una calidad adecuada del agua mediante monitorización diaria (pH, temperatura, oxígeno disuelto) o semanal (nitrito, nitrato, amonio). Puede excluirse una

contribución de glucocorticoides portados en el agua, como resultado de la fuga desde el alimento, a los efectos observados. Los análisis de cortisol, sus precursores y metabolitos mediante cromatografía de líquidos de resolución ultraalta-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) desarrollada internamente y validada (véase cortisol en escama) reveló que las concentraciones de cortisol elevadas en agua volvían al nivel de referencia en el plazo de 2,5 h tras la alimentación.

Los resultados para cinco parámetros sanguíneos usados comúnmente como indicadores de estrés confirman que los peces DEX pueden considerarse controles negativos, y los peces CORT controles positivos, respectivamente (Figura 6). El cortisol en plasma se había elevado en el grupo CORT (CORT frente a CTR: P<0,0001), confirmando la absorción de cortisol del alimento a la sangre; en los peces ESTRÉS los niveles de cortisol no diferían de los controles negativos lo que indica la falta de idoneidad de los últimos para la evaluación del estrés crónico. El parámetro de estrés secundario glucosa en plasma, que refleja las acciones de glucocorticoides predichas (gluconeogenésis), había aumentado en DEX (DEX frente a CTR: P<0,0001), mientras que CORT (CORT frente a CTR: P=0,2004) y ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0531) no diferían significativamente, en línea con la acción más potente de DEX. El lactato en plasma había aumentado en DEX (DEX frente a CTR: P<0,0001) y CORT (CORT frente a CTR: P=0,0004), pero no significativamente en ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,4224) en línea con los efectos posteriores de DEX y CORT. El calcio total en plasma y la osmolalidad no se vieron afectados, lo que indica que los tratamientos no superaban la resiliencia de los peces y no evocaban sufrimiento. Concluimos que (i) los tratamientos CTR, DEX y CORT provocaban las acciones de glucocorticoides pretendidas; (ii) en el plasma de peces ESTRÉS no se observaron signos de activación del eje HPI; (iii) los parámetros de plasma son factores de predicción malos para el estrés crónico ya que no reflejan más que una instantánea de la respuesta al estrés en un momento dado.

De lo anterior se deduce que los valores de cortisol en plasma en peces estresados crónicamente no proporcionan una lectura adecuada para el estrés experimentado. Sin embargo, la Figura 7 muestra que el eje de estrés endocrino se activa con total seguridad. La expresión de genes hipotalámicos, de la parte distal de la hipófisis y clave interrenales *crf* (ESTRÉS frente a CTR: *P*=0,0002), *pomc* (ESTRÉS frente a CTR: *P*<0,0001) y *star* (ESTRÉS frente a CTR: *P*=0,0140), respectivamente, de hecho se regulan significativamente por incremento. La realimentación de glucocorticoides negativa se indica mediante una expresión de *pomc* disminuida significativamente (DEX frente a CTR: P=0,0236).

Una segunda línea de evidencia para el estrés crónico, no visible al nivel de cortisol en plasma, es la regulación por incremento del gen que codifica para la subunidad α1 de la Na^+/K^+-ATPasa branquial[74] (Figura 8). En peces DEX (DEX frente a CTR: *P*=0,0001), CORT (CORT frente a CTR: *P*<0,0001) y ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: *P*=0,0215), se encontraron niveles de expresión potenciados significativamente, indicativo de la acción de corticoides.

En resumen, los resultados indican que los peces del grupo ESTRÉS estaban estresados crónicamente. Entonces proponemos la cuantificación de cortisol en la escama elasmoidea.

2) <u>Cortisol en escamas ontogenéticas de peces como biomarcador de estrés crónico</u>

Se analizaron de cinco (día 21) a seis (día 42) escamas para cortisol con un método de UPLC-MS/MS validado (según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE) en un entorno regulado según la normal NBN EN ISO/IEC 17025. Todos los peces CTR y DEX mostraron valores de cortisol en escama por debajo de la capacidad de detección (CCβ); 10 de 12 peces CORT en el día 21 mostraron valores por encima de CCβ y todos estaban por encima de CCβ en el día 42; 7 de 11 peces ESTRÉS en el día 21 mostraron valores por encima de CCβ y todos estaban por encima de CCβ en el día 42 (Figura 9). Tras comparar los tratamientos, en el día 21 se encontró una acumulación significativa para peces CORT (CORT frente a CTR: P<0,0001); en el día 42 se encontró una acumulación significativa para peces ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: *P*=0,0001). Cuando se compara dentro de los tratamientos desde 21 hasta 42 días, se encontró un aumento significativo en cortisol en escama en peces ESTRÉS (*P*=0,0031) y CORT (*P*=0,0026), respectivamente. Estos hallazgos están en línea con la incorporación y acumulación predichas de cortisol en escamas a lo largo del tiempo y validan el contenido de cortisol en escama como biomarcador para el estrés crónico. En línea con el efecto predicho de bloqueo de la producción de cortisol endógeno mediante DEX, no encontramos incorporación de cortisol en escamas de peces tratados con DEX. Por otro lado, la alimentación de cortisol y estresar físicamente a los peces potenció los niveles de cortisol en escama.

En resumen, los resultados para cortisol en escamas ontogenéticas confirman que el cortisol en escamas refleja el nivel de estrés experimentado por los peces a lo largo del tiempo. Proponemos la cuantificación de cortisol en la escama de regeneración como herramienta adicional para la cuantificación del estrés crónico y su correlación con el nivel de expresión génica de la proteína de matriz más abundante colágeno 1α.

c) <u>Junto con las escamas ontogenéticas, el cortisol también se acumula en escamas de regeneración</u>

Se determinaron concentraciones de cortisol en 5 escamas regeneradas por pez 21 días tras la retirada de la escama ontogenética (Figura 10). Se encontró que la MNE de *col1a1* estaba inhibida en escamas ontogenéticas y

se correlaciona con un alto nivel de cortisol en plasma, en línea con los efectos inhibitorios ampliamente conocidos de los glucocorticoides sobre la formación ósea. En escamas de regeneración, los escleroblastos (células similares a osteoblastos que forman escamas[75] parecen insensibles a la realimentación de glucocorticoides tal como se muestra mediante la expresión de *col1a1* similar en todos los tratamientos. Morfológicamente, se encontró que las escamas regeneradas de CTR, ESTRÉS y CORT eran similares, mientras que el área, el perímetro y el número de crestas de escamas de peces DEX mostraron valores significativamente menores, indicativo de una regeneración alterada y retardada. El alto nivel en plasma de cortisol en peces CORT en el momento del muestreo de escamas de regeneración y ontogenéticas en el día 42 se correlaciona con un alto contenido de cortisol en escama, y esto confirma que el cortisol libre se incorpora en las escamas. Además, el contenido de cortisol en escamas de regeneración en peces ESTRÉS pareció no ser todavía significativamente mayor que el de CTR, pero menor que CORT, lo que indica que el secuestro máximo de cortisol en la matriz no se había alcanzado. Aquí debe señalarse la cantidad extremadamente baja de matriz analizada (promedio de 4 mg de escama). Se observó un aumento significativo en cortisol en escama en peces CORT (CORT frente a CTR: P<0,0001). Este hallazgo está en línea con la incorporación y acumulación de cortisol en escamas a lo largo del tiempo con mayores niveles de cortisol en plasma disponibles, reconfirmando de este modo nuestros hallazgos en escamas ontogenéticas. Los resultados para escamas de regeneración corroboran los resultados para escamas ontogenéticas y por tanto el hecho de que el cortisol en escamas refleja el nivel de estrés experimentado por los peces en el tiempo.

Ejemplo 4: Cuantificación de los niveles de glucocorticoides en escamas de tilapia (*Oreochromis mossambicus*)

Método y materiales (véase el ejemplo 1 y más)

Configuración experimental

El ensayo con tilapia consiste en 2 réplicas de 4 condiciones, cada una con 6 peces: control (no estresados), dexametasona (inhibición de la ruta del estrés), cortisol (activación de la ruta del estrés) y estrés inducido por diversos factores de estrés dados de una manera aleatoria durante 6 semanas.

Métodos

Los procedimientos experimentales fueron según la legislación holandesa y aprobados por el comité de ética animal de la Radboud University (número de permiso: RU-DEC2013-192). Se criaron tilapias (*Oreochromis mossambicus*) en la Radboud University de Nijmegen para garantizar el historial. Peces adultos en crecimiento (en el día 21: 321 ± 37 g y 26,0 ± 0,9 cm; en el día 42: 328 ± 38 g y 26,5 ± 0,9 cm), mantenidos bajo 12:12 h de luz:oscuridad, alimentados con 2 comidas al día (09:30 am y 15:30 pm) al 0,9% del peso corporal se mantuvieron a 20,0 ± 0,4ºC durante 6 semanas. Se configuraron dos grupos, con 2 réplicas de tanque por grupo, de 6 peces por tanque de 140 l cada uno. Los peces del grupo CTR se dejaron inalterados. El grupo ESTRÉS se estresó una vez al día; el tipo, la duración y la sincronización de los factores de estrés se aplicaron aleatoriamente e incluían: captura (15 - 60 min), exposición al aire (1 - 3 min), caída de temperatura (hasta 5ºC), persecución (hasta 10 min) y confinamiento (en un cubo con un nivel de agua bajo). Durante todo el experimento, no se observaron indicaciones de salud y comportamiento afectados. Tras 42 días se anestesiaron los peces en 2-fenoxi-etanol (0,1% v/v) y se sacrificaron, se tomó sangre de los vasos caudales y se recogieron escamas (escamas ontogenéticas y las regeneradas a los 21 días). Se analizó el plasma para determinar el cortisol, la glucosa[70], el calcio total[71] y la osmolalidad[70]. Se tomaron muestras de escamas de una fila estandarizada dorsalmente con respecto a la línea lateral y se analizaron usando cromatografía de líquidos de resolución ultraalta-espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS)

Resultados

Control del fundamento y la ejecución de la configuración experimental

Durante un ensayo de 6 semanas, comparamos tilapias inalteradas (CTR) y estresadas diariamente (ESTRÉS). En todos los tratamientos la ración de alimento proporcionada se consumió en el plazo de 5 minutos, todos los peces permanecieron clínicamente sanos tal como se indica mediante el factor de condición[73] y no se observó mortalidad. Se mantuvo una calidad adecuada del agua mediante monitorización diaria (pH, temperatura, oxígeno disuelto) o semanal (nitrito, nitrato, amonio). Puede excluirse una contribución de los glucocorticoides portados por el agua, como resultado de la fuga desde el alimento, a los efectos observados. El análisis del cortisol, sus precursores y metabolitos mediante UPLC-MS/MS desarrollado y validado internamente reveló que las concentraciones de cortisol elevadas en agua volvían al nivel de referencia en el plazo de 2,5 h tras la alimentación.

Se analizaron cuatro parámetros sanguíneos usados comúnmente como indicadores de estrés (Figura 11). El cortisol en plasma se había elevado en el grupo ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0014), lo que indica la idoneidad del último para la evaluación del estrés agudo. El parámetro de estrés secundario glucosa en plasma, que refleja las acciones de glucocorticoides predichas (gluconeogénesis), había aumentado en ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0006) y difería significativamente. El calcio total en plasma y la osmolalidad no se vieron afectados, lo que indica que los tratamientos no superaban la resiliencia de los peces y no provocaban sufrimiento. Concluimos

que (i) el tratamiento ESTRÉS provocaba las acciones de glucocorticoides pretendidas ya que en plasma de peces ESTRÉS se observaron signos de activación del eje HPI; y (ii) los parámetros en plasma son malos factores de predicción para el estrés crónico ya que no reflejan más que una instantánea de la respuesta al estrés en un momento dado.

Cortisol en escamas ontogenéticas de peces como biomarcador para el estrés crónico

Se analizaron de cinco (día 21) a seis (día 42) escamas para el cortisol con un método de UPLC-MS/MS validado (según los requisitos de la Decisión de la Comisión n.º 2002/657/CE (CE, 2002) en un entorno regulado según la norma NBN EN ISO/IEC 17025 (EN ISO/IEC, 2005).

En el día 21 todos los peces CTR y ESTRÉS mostraron valores de cortisol en escama por debajo del límite de decisión (CCα), mientras que en el día 42 los niveles de peces ESTRÉS estaban en su mayor parte por encima de CCα (Figura 12).

Tras comparar los tratamientos, en el día 21 se encontró una acumulación casi significativa para los peces ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0590); en el día 42 se encontró una acumulación casi significativa para los peces ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0515). Cuando se compara dentro de los tratamientos desde 21 hasta 42 días, se encontró un aumento no significativo en el cortisol en escama en CTR (P=0,3962), mientras que se encontró un aumento significativo en el cortisol en escama en peces ESTRÉS (P=0,0020). Estos hallazgos están en línea con la incorporación y acumulación predichas de cortisol en escamas a lo largo del tiempo y validan adicionalmente el contenido de cortisol en escama como biomarcador para el estrés crónico. En línea con el efecto predicho en el grupo control, no encontramos incorporación significativa de cortisol en escamas de peces CTR (CTR21 frente a CTR42: P=0,0770. Por otro lado, estresar físicamente a los peces potenció los niveles de cortisol en escama (ESTRÉS21 frente a ESTRÉS42: P<0,0001).

En resumen, los resultados para cortisol en escamas ontogenéticas confirmaron nuestros hallazgos iniciales en carpas, que el cortisol en escamas refleja el nivel de estrés experimentado por los peces a lo largo del tiempo. Proponemos la cuantificación de cortisol en la escama de regeneración como herramienta adicional para la cuantificación del estrés crónico.

Junto a las escamas ontogenéticas, el cortisol también se acumula en escamas de regeneración

Se determinaron concentraciones de cortisol en 5 escamas regeneradas por pez 21 días tras la retirada de la escama ontogenética (Figura 13).

Se observó un aumento significativo en la regeneración de cortisol en escama en peces ESTRÉS (ESTRÉS frente a CTR: P=0,0105). El alto nivel en plasma de cortisol en peces ESTRÉS en el momento del muestreo de escamas de regeneración y ontogenéticas en el día 42 se correlaciona con un alto contenido de cortisol en escama, y esto confirma nuestra hipótesis de que el cortisol libre se incorpora en escamas. Este hallazgo está en línea con la incorporación y acumulación predichas de cortisol en escamas a lo largo del tiempo con mayores niveles de cortisol en plasma disponibles, reconfirmando de esta manera nuestros hallazgos en escamas ontogenéticas. Los resultados para las escamas de regeneración corroboran los resultados para escamas ontogenéticas así como nuestros hallazgos previos en carpas y por tanto confirman que el cortisol en escamas refleja el nivel de estrés experimentado por los peces en el tiempo.

El ensayo de cortisol en plasma así como en matrices alternativas tales como heces, secreción mucosa y agua no es adecuado para la evaluación del estrés crónico. Mostramos que el contenido de cortisol en escama es altamente adecuado para la cuantificación de estrés crónico en peces, esta noción convirtió el cortisol en escama en un biomarcador innovador y que va más allá del estado de la técnica con un alto potencial de impacto en la ciencia y las industrias relacionadas con los peces (por ejemplo estudios de fisiología, toxicología, inmunología, comportamiento, etc.). Los hallazgos presentados para carpas y para tilapias son aplicables para todos los peces con escamas elasmoideas (por ejemplo carpas). En un sentido más amplio, las escamas placoideas (por ejemplo tiburón) y ganoideas (por ejemplo esturión) son adecuadas así como expanden el uso de este biomarcador a otras especies de actinopterigios e incluso de condrictios. Finalmente, esta nueva herramienta para la monitorización del estrés crónico tiene un enorme potencial de valorización para adoptarse en un amplio rango de entornos gubernamentales, académicos e industriales tales como la toma de decisiones en la acuicultura respetuosa con los animales (por ejemplo la optimización a base de animales de sistemas de acuicultura con recirculación y la mejora de la calidad de los productos), monitorizando las reservas de peces silvestres (por ejemplo dinámica de población basada en la ecología), el bienestar de los peces en acuarios públicos y en ensayos con animales. El desarrollo de un ensayo viable económicamente, logísticamente y ampliamente aplicable para un análisis *in situ* para el cortisol en escamas de peces está garantizado.

Ejemplo 5: Cuantificación de los niveles de glucocorticoides en escamas de salmón

Método y materiales (véase el ejemplo 1)

Configuración experimental

Se analizaron de manera ciega doce muestras de salmón Chinook (pre-estrés y estresado (1 h de confinamiento)) para determinar los glucocorticoides en escamas en el marco de una colaboración prolongada con los EE. UU. en relación con el estrés crónico en salmón.

Resultados

Número de vial	Muestra n.º	Etiqueta pit n.º	Peso (g)	Sexo	20-Dihidrocortisona (ng/g)	Cortisona (ng/g)	Cortisol (ng/g)
1	84	557	3875	M	8,924	20,861	98,174
2	85	sin etiqueta	4033	M	7,966	17,943	90,571
3	86	5293	2959	F	6,127	6,962	79,419
4	87	3224	6315	F	35,222	61,273	92,681
5	88	2510	3025	M	5,245	17,122	50,102
6	89	6820	5497	F	28,107	17,395	17,419
7	90	6484	3649	F	22,551	35,553	39,817
8	91	2109	4113	F	37,607	34,286	39,463
9	92	3485	4496	M		16,917	1,335
10	93	9611	4330	F	0,030	6,110	3,819
11	95	6334	4332	F	22,156	41,773	31,732
12	94	3464	5409	F	1,080	25,291	26,499

Ejemplo 6: Cuantificación de los niveles de glucocorticoides en escamas de pargo y lubina

Método y materiales (véase el ejemplo 1)

Configuración experimental

La influencia del acondicionamiento de peces (día uno frente a día 3) se sometió a prueba con lubina (*Dicentrarchus labrax*) y pargo (*Pagrus pagrus*).

Resultados

Lubina

Variable			Por tratamiento				Global	Global
			sin flash		con flash		TODOS	TODOS
Tipo	Día	Matriz/Parámetro	Estimación	Error estándar	Estimación	Error estándar	Diferencia	P
META DATOS	1	Sexo						
	1	Longitud	25,67	0,65	25,78	0,65	0,11670	0,8999
	1	Peso	178,62	16,85	186,25	16,85	7,63670	0,7516
	1	BCS	1,04	0,04	1,04	0,04	-0,00715	0,8951
	3	Sexo						
	3	Longitud	26,33	0,61	26,25	0,61	-0,075	0,9319
	3	Peso	191,78	13,86	193,44	13,86	1,65830	0,9333
	3	BCS	1,03	0,02	1,05	0,02	0,01574	0,6597
PLASMA	1	PL Cortisol	211,11	66,06	88,46	66,06	-122,66	0,2103
	3	PL Cortisol	151,55	49,19	223,84	47,10	72,28570	0,3006

ESCAMA OG	1	OG Cantidad de escama	0,04	0,00	0,04	0,00	-0,00368	0,2789
	1	OG Peso por escama	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,00013	0,5434
	3	OG Cantidad de escama	0,04	0,00	0,05	0,00	0,00620	0,1439
	3	OG Peso por escama	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00002	0,8984
	1	OG Cortisol por escama	0,06	0,01	0,06	0,01	-0,00348	0,8451
	1	OG Cortisona por escama	0,03	0,01	0,04	0,01	0,00171	0,8114
	1	OG U de Reichstein por escama	0,04	0,00	0,04	0,00	-0,00409	0,3737
	3	OG Cortisol por escama	0,04	0,00	0,02	0,00	-0,01601	0,0050
	3	OG Cortisona por escama	0,03	0,00	0,02	0,00	-0,00678	0,2305
	3	OG U de Reichstein por escama	0,03	0,00	0,02	0,00	-0,00638	0,2573

Pargo

Variable			Por tratamiento				Global	Global
			sin flash		con flash		TODOS	TODOS
Tipo	**Día**	**Matriz/Parámetro**	**Estimación**	**Error estándar**	**Estimación**	**Error estándar**	**Diferencia**	**P**
META DATOS	1	Sexo						
	1	Longitud	23,04	0,25	23,21	0,25	0,16670	0,6455
	1	Peso	208,65	8,08	210,16	8,08	1,50750	0,8962
	1	BCS	1,70	0,04	1,68	0,04	-0,02420	0,6640
	3	Sexo						
	3	Longitud	22,75	0,45	23,75	0,45	1,00000	0,1301
	3	Peso	210,71	11,36	227,45	11,36	16,73580	0,3089
	3	BCS	1,82	0,09	1,68	0,09	-0,1346	0,3052
PLASMA	1	PL Cortisol	148,07	34,38	34,43	34,38	-113,6300	0,0289
	3	PL Cortisol	114,05	30,44	100,44	30,44	-13,6037	0,7550
ESCAMA OG	1	OG Cantidad de escama	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00253	0,4644
	1	OG Peso por escama	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00006	0,5232
	3	OG Cantidad de escama	0,03	0,00	0,03	0,00	0,00093	0,7586
	3	OG Peso por escama	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,00015	0,1199
	1	OG Cortisol por escama	0,03	0,01	0,03	0,01	-0,00178	0,8070
	1	OG Cortisona por escama	0,04	0,01	0,05	0,01	0,01826	0,2297
	1	OG U de Reichstein por escama	0,05	0,01	0,04	0,01	0,01630	0,0441
	3	OG Cortisol por escama	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00710	0,2944

	3	OG Cortisona por escama	0,08	0,02	0,04	0,02	0,04097	0,1581
	3	OG U de Reichstein por escama	0,04	0,00	0,03	0,00	-0,00913	0,0967

Referencias

A. Referencias en la técnica anterior

1. Baker, M R, Gobush K S, Vynne C H (2013) Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. J Nat Conserv 21, 309-318.
2. Boonstra R (2013) The ecology of stress: a marriage of disciplines. Funct Ecol 27, 7-10.
3. O'Connor C M, Norris D R, Crossin G T, Cooke S J (2014) Biological carryover effects: linking common concepts and mechanisms in ecology and evolution. Ecosphere, 5, art 28.
4. Richardson K (2013) Anthropogenically-induced changes in the environment: effect of fisheries. ftp://ftp.fao.org/fi/document/reykjavik/pdf/16Richardson.pdf.
5. Consensus. Towards sustainable aquaculture in Europe. (2013) http://www.learneurope.eu/files/5813/7456/5881/Towards sustainable aquaculture in Europe.pdf.
6. Bush S R, Belton B, Hall D, Vandergeest P, Murray F J, *et al.* (2013) Certify Sustainable Aquaculture? Science 341: 1067-1068.
7. Diggles B K, Cooke S J, Rose J D, Sawynok W (2011) Ecology and welfare of aquatic animals in wild capture fisheries. Rev Fish Biol Fisheries 21: 739-765.
8. EFSA (2008). Scientific report of EFSA on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed common carp (Question No EFSA-Q-2006-148). Annex I to the EFSA Journal 843: 1-81.
9. Bergqvist J, Gunnarsson S (2013) Finfish Aquaculture: Animal Welfare, the Environment, and Ethical Implications. J Agric Environ Ethics 26: 75-99.
10. Anderson P A, Berzins I K, Fogarty F, Hamlin H J, Guillette Jr L J (2011) Sound, stress, and seahorses: the consequences of a noisy environment to animal health. Aquaculture 311: 129-138.
11. Anderson P A (2013) Acoustic characterization of seahorse tank environments in public aquaria: A citizen science project. Aquacult Engineering 54: 72-77.
12. The Research Council of Norway (2009) Fish in research - environmental requirements and welfare indicators for fish. A review of research needs.
13. Wendelaar Bonga S E (1997) The stress response in fish. Physiol Rev 77: 591-626.
14. Barton B A (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol 42: 517-525.
15. Blas J, Bortolotti G R, Tella J L, Baos R, Marchant T A (2007) Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. Proc Natl Acad Sci USA 104: 8880-8884.
16. Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev 21: 55-89.
17. Cockrem J F (2013) Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. Gen Comp Endocrinol 181: 45-58.
18. McEwen B S, Wingfield J C (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. Horm Behav 43: 2-15.
19. Korte S M, Koolhaas J M, Wingfield J C, McEwen B S (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. Neurosci Biobehav Rev 29: 3-38.
20. Øverli Ø, Sørensen C, Pulman K G T, Pottinger T G, Korzan W, *et al.* (2007) Evolutionary background for stress coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. Neurosci Biobehav Rev 31: 396-412.
21. Tellis M S, Alsop D, Wood C M (2012) Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol 155: 281-289.
22. Toorchi M, Bani A, Alizadehsabet H (2012) Effects of salinity on osmoregulation and plasma cortisol levels of juvenile Caspian trout, Salmo trutta caspius Kessler, 1877. J Appl Ichthyol 28: 130-134.
23. Oliveira C C V, Blanco R A B, Chereguini V O, Martín I, Sánchez-Vazquez F J (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (Solea senegalensis Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. Fish Physiol Biochem 39: 479-487.
24. Romano M C, Rodas A Z, Valdez R A, Hernández S E, Galindo F, *et al.* (2010) Stress in wildlife species: noninvasive monitoring of glucocorticoids. Neuroimmunomodulation 17: 209-212.
25. Cook N J (2012) Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. Can J Anim Sci 92: 227-259.
26. Small B C (2003) Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish Ictalurus punctatus. Aquaculture 218: 177-185.
27. Palic D, Herolt D M, Andreasen C B, Menzel B W, Roth J A (2006) Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (Pimephales promelas Rafinesque, 1820). Aquaculture 254: 675-685.

28. Simontacchi C, Poltronieri C, Carraro C, Bertotto D, Xiccato G, *et al.* (2008) Alternative stress indicators in sea bass Dicentrarchus labrax, L. J Fish Biol 72: 747-752.
29. Bertotto D, Poltronieri C, Negrato E, Majolini D, Radaelli G, *et al*; (2010) Alternative matrices for cortisol measurement in fish. Aquacult Res 41: 1261-1267.
30. Lupica S J, Turner J W Jr (2009) Validation of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of fecal cortisol in fish. Aquacult Res 40: 437-441.
31. Ellis T, James J D, Stewart C, Scott A P (2004) A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. J Fish Biol 65: 1233-1252.
32. Takahara T, Yamanaka H, Suzuki A A, Honjo M N, Minamoto T, *et al.* (2011) Stress response to daily temperature fluctuations in common carp, *Cyprinus carpio* L. Hydrobiologia 675: 65-73.
33. Close D A, Yuna S-S, McCormick S D, Wildbill A J, Weiming L (2010) 11-Deoxycortisol is a corticosteroid hormone in the lamprey. Proc Natl Acad Sci USA 107: 13942-13947.
34. Cadrin S X, Kerr L A, Mariani S (2013) Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science. Academic Press.
35. Tserpes G, Tsimenides N (1995) Determination of age and growth of swordfish, Xiphias gladius L., 1758, in the eastern Mediterranean using anal-fin spines. Fish Bull 93: 594-602.
36. Kawajiri M, Yamahira K (2011) Genetic and thermal effects on the latitudinal variation in the timing of fin development of a fish Oryzias latipes. Environ Biol Fishes 92: 285-293.
37. Payan P, De Pontual H, Edeyer A, Borelli G, Boeuf G, *et al.* (2004) Effects of stress on plasma homeostasis, endolymph chemistry, and check formation during otolith growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Can J Fish Aquat Sci 61: 1247-1255.
38. Bortolotti G R, Marchant T A, Blas J, Cabezas S (2009a) Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. J Exp Biol 212, 1477-1482.
39. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Goulle J P, Ludes B. 2000. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. Forensic Sci. Int. 107: 381-388.
40. Schönbörner A A, Boivin G, Baud C A (1979) The mineralization processes in teleost fish scales. Cell Tissue Res 202: 203-212.
41. Metz J R, De Vrieze E, Lock E J, Schulten I E, Flik G (2012) Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research. J Appl Ichthyol 28: 382-387.
42. Persson P, Shrimpton J M, McCormick S D, Bjornsson B T (2000) The presence of high-affinity, low-capacity estradiol-17b binding in rainbow trout scale indicates a possible endocrine route for the regulation of scale resorption. Gen Comp Endocrinol 120, 35-43.
43. Pinto P I S, Estevao M D, Redruello B, Socorro S M, Canario A V, Power D M (2009) Immunohistochemical detection of estrogen receptors in fish scales. Gen Comp Endocrinol 160, 19-29.

B. Referencias en la descripción de la invención

(44) Bury N. R., Sturm A. Gen. Comp. Endocrinol. 2007, 153, 47-56.
(45) http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5932.html
(46) Cirillo N., Prime S. S. J. Cell. Biochem. 2011 112, 1499-1505.
(47) Raul J-S., Vincent Cirimele V., Bertrand Ludes B., Pascal Kintz P. Clin. Biochem. 2004, 37, 1105-1111.
(48) Gow R., Thomson S., Rieder M., Van Uum S., Koren G. Forensic Sci. Int. 2010, 196, 32-37.
(49) Sugawara E. K., Verreschi L. Quim. Nova 2010, 33, 447-450.
(50) Yajie Xiao Y., Chan S. W., Hu M., Chu T. T. W., Fok B. S. P., Poon E. W. M., Tomlinson B Chromatographia 2012, 75, 169-173
(51) Gao W, Xie Q, Jin J., Qiao T., Wang H., Chen L., Deng H., Lu Z Clin. Biochem. 2010, 43, 677-682.
(52) Shibata N., Hayakawa T., Takada K., Hoshino N., Minouchi T., Yamaji A. J. Chromatogr B 1998, 706,191-199.
(53) Shibasakia H., Nakayamaa H., Furutaa T., Kasuyaa Y., Tsuchiyab M., Soejimab A., Yamadab, Nagasawab T. J. Chromatogr. B 2008, 870, 164-169.
(54) Ahmadkhaniha R., Shafiee A., Rastkari N., Khoshayand M. R., Kobarfard F. J. Chromatogr B 2010, 878, 845-852.
(55) O'Connor E. A., Pottinger T. G., Sneddon L. U. Fish Physiol. Biochem. 2011, 37, 461-469.
(56) Benjamín Costas B., Conceiçao L. E. C., , Aragao C., Martos J. A., Ruiz-Jarabo I. Mancera J. M., Afonso A. Aquaculture 2011, 316, 68-76.
(57) Tellis M. S., Alsop D., Wood C. M., Comp. Bioch. Fysiol. 2012, 155, 281-289.
(58) Toorchi M., Bani A., Alizadehsabet H. J. Appl. Ichthyol. 2012, 28, 130-134
(59) Sun K., Ramgir N., Bhansali S. Sens. Actuators, B 2008, 133, 533-537.
(60) Mitchell J. S., Lowe T. E., Ingram J. R. Analyst 2009, 134, 380-386

C. Referencias en el ejemplo 1

(61) Commission Decision No. 2002/657/CE, Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Commun. 2002.
(62) EN ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. CEN/CENELEC, 2005.
(63) ISO/DIS 5725:1994, Accuracy of Measurement Methods and Results., 1994.

(64) Barnett V.; Lewis T. Outliers in Statistical Data; 3rd ed., 1994.
(65) Ellis, T.; Sanders, M. B.; Scott, A. P. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 2013, 100, 255-269.
(66) McWhinney B.C., Ward G., Hickman P.E. Clin. Chem. 1996, 42 (6), 979-981.
(67) Flor, S. Lucangioli S., Contin M., Tripodi V. Electrophoresis 2010, 31, 3305-3313.
(68) Heistermann M., Palme R., Ganswindt A. Am. J. Primatol. 2006, 68, 257-273.

D) Referencias en el ejemplo 2

(69) Gorissen M., Bernier N. J., Manuel R., de Gelder S., Metz J. R., Huising M. O., Flik G. Gen. Comp. Endocrinol. 2012, 178, 75-81.

E) Referencias en el ejemplo 3

(69). Gorissen M, Bernier N J, Manuel R, de Gelder S, Metz J R, *et al.* (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Gen Comp Endocrinol 178: 75-81.
(70). Schram E, Roques J A C, Abbink W, Spanings T, de Vries P, *et al.* (2010) The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 306: 108-115.
(71). Cohen S A, Sideman L (1979) Modification of the o-cresolphtalein complexone method for determining calcium. Clin Chem 25: 1519-1520.
(72). De Vrieze, E. *et al.* Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating zebrafish scales. Osteoporosis Int., 25, 567-578 (2014).
(73). Nash R D M, Valencia A H, Geffen A J (2006) The origin of Fulton's condition factor - setting the record straight. Fisheries 31: 236-238.
74. Dang Z C, Balm P H M, Flik G, Wendelaar Bonga S E, Lock R A C (2000) Cortisol increases Na+/K+-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia Oreochromis mossambicus. J Exp Biol 203: 2349-2355.
(75). Metz J R, De Vrieze E, Lock E J, Schulten I E, Flik G (2012) Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research. J Appl Ichthyol 28: 382-387.

F) Referencias en el ejemplo 4

(69). Gorissen M, Bernier N J, Manuel R, de Gelder S, Metz J R, *et al.* (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Gen Comp Endocrinol 178: 75-81.
(70). Schram E, Roques J A C, Abbink W, Spanings T, de Vries P, *et al.* (2010) The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 306: 108-115.
(71). Cohen S A, Sideman L (1979) Modification of the o-cresolphtalein complexone method for determining calcium. Clin Chem 25: 1519-1520.
(73). Nash R D M, Valencia A H, Geffen A J (2006) The origin of Fulton's condition factor - setting the record straight. Fisheries 31: 236-238.

REIVINDICACIONES

1.- Un método *in vitro* para cuantificar el nivel de estrés crónico en un pez que comprende:

- obtener al menos una escama de dicho pez,

- extraer glucocorticoides de dicha escama,

- purificar los glucocorticoides extraídos de dicha escama,

- cuantificar dichos glucocorticoides purificados, y

- correlacionar dichos glucocorticoides cuantificados con un nivel de estrés crónico.

2.- Un método según la reivindicación 1, los glucocorticoides son cortisol, corticosterona, 17α-hidroxiprogesterona, 11-desoxicortisol, 11-desoxicorticosterona, cortisona, 20-dihidrocortisona, tetrahidrocortisol y/o tetrahidrocortisona.

3.- Un método según las reivindicaciones 1-2, en el que dicho pez pertenece a la infraclase de *Teleostei*.

4.- Un método según las reivindicaciones 1-3, en el que dicho obtener al menos una escama de dicho pez es obtener entre 40 y 80 escamas de dicho pez.

5.- Un método según las reivindicaciones 1-4, en el que dicho extraer glucocorticoides se lleva a cabo añadiendo metanol como disolvente de extracción.

6.- Un método según la reivindicación 5, en el que dicha extracción con metanol va seguida de una extracción en fase sólida.

7.- Un método según las reivindicaciones 1-6, en el que dicho cuantificar los glucocorticoides extraídos se lleva a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem, cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada con detección ultravioleta, de red de diodos o de fluorescencia, cromatografía de gases, un radioinmunoensayo, un inmunoensayo enzimático o una técnica basada en sensor.

8.- Un método según la reivindicación 7, en el que dicha cromatografía de líquidos acoplada con espectrometría de masas en tándem es espectrometría de masas en tándem de líquidos de resolución ultraalta.

9.- Un método según la reivindicación 7, en el que dicho inmunoensayo es un radioinmunoensayo o un inmunoensayo enzimático.

10.- Uso de escamas de peces tomadas como muestra de un pez para cuantificar el nivel de estrés crónico de dicho pez cuantificando los glucocorticoides en dicha escama de pez.

11.- Uso según la reivindicación 10, en el que dicha cuantificación se lleva a cabo mediante un método según las reivindicaciones 1-9.

12.- Uso de una espina, un radio de aleta o un otolito tomado como muestra de un pez para cuantificar el nivel de estrés crónico de dicho pez cuantificando los glucocorticoides en dicha espina, radio de aleta u otolito.

13.- Un método *in vitro* para cuantificar el nivel de estrés crónico en un pez que comprende:

- obtener al menos una espina, radio de aleta u otolito de dicho pez,

- extraer glucocorticoides de dicha espina, radio de aleta u otolito,

- purificar los glucocorticoides extraídos de dicha espina, radio de aleta u otolito,

- cuantificar dichos glucocorticoides purificados, y

- correlacionar dichos glucocorticoides cuantificados con un nivel de estrés crónico.

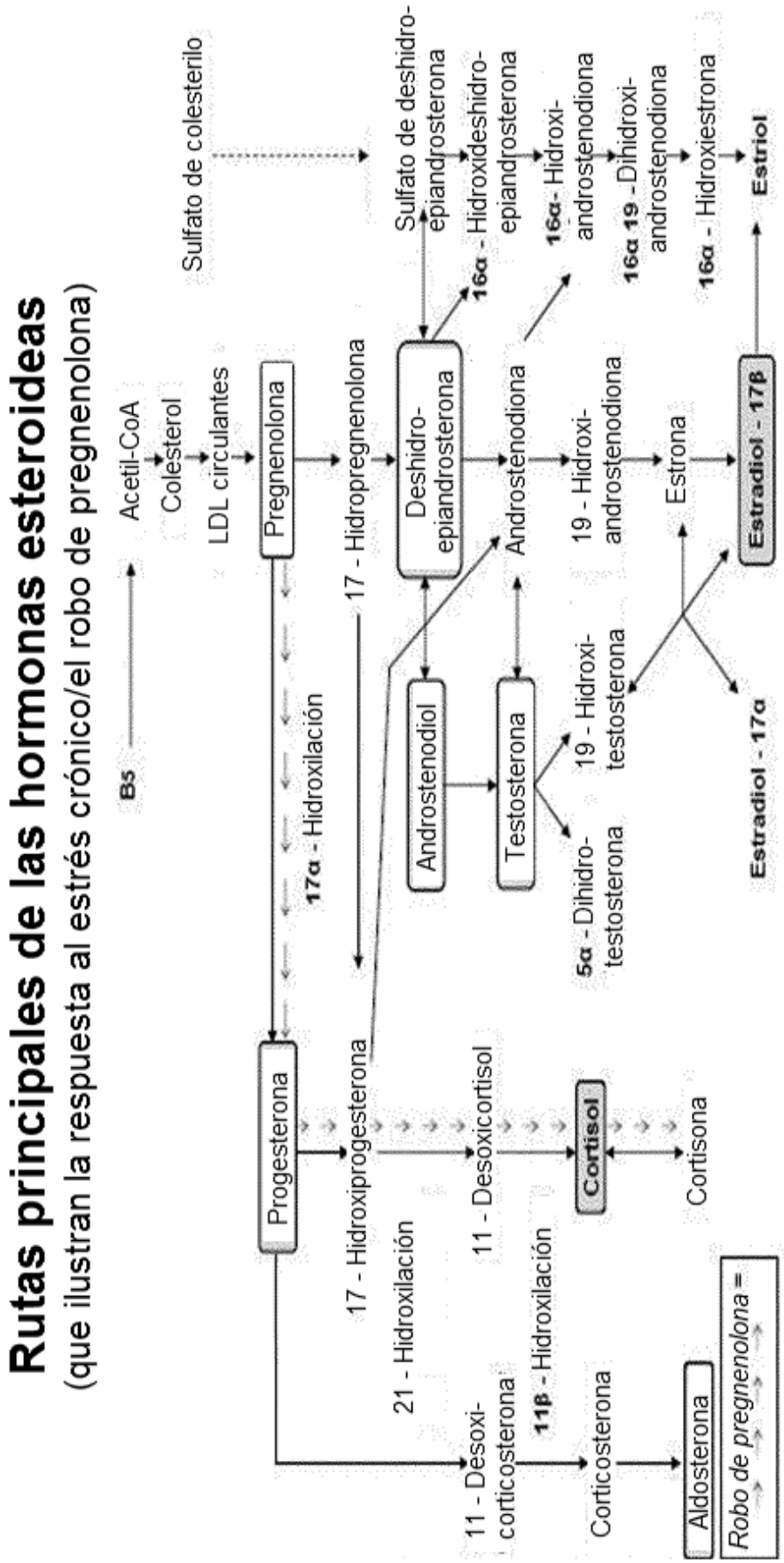

Rutas principales de las hormonas esteroideas
(que ilustran la respuesta al estrés crónico/el robo de pregnenolona)
B5
Acetil-CoA
Colesterol
LDL circulantes
Sulfato de colesterilo
Pregnenolona
17 - Hidropregnenolona
Sulfato de deshidro-epiandrosterona
Deshidro-epiandrosterona
16α - Hidroxideshidro-epiandrosterona
Androstenodiona
16α- Hidroxi-androstenodiona
19 - Hidroxi-androstenodiona
16α 19 -Dihidroxi-androstenodiona
Estrona
16α - Hidroxiestrona
Estriol
Estradiol - 17β
Estradiol - 17α
Androstenodiol
Testosterona
19 - Hidroxi-testosterona
5α - Dihidro-testosterona
17α - Hidroxilación
Progesterona
17 - Hidroxiprogesterona
21 - Hidroxilación
11 - Desoxicortisol
Cortisol
Cortisona
11 - Desoxi-corticosterona
11β - Hidroxilación
Corticosterona
Aldosterona
Robo de pregnenolona =

Figura 1

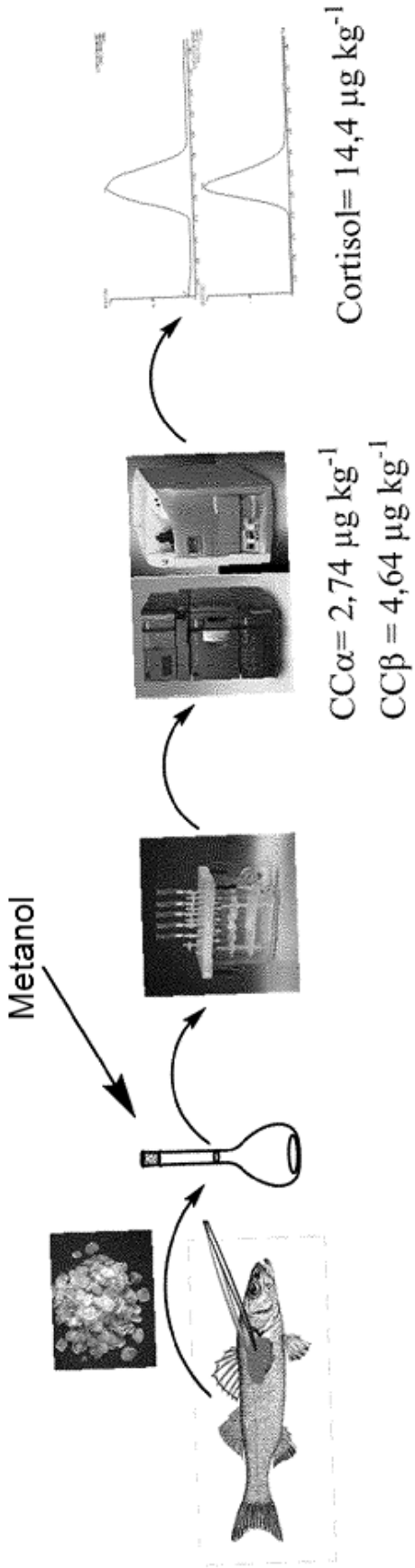


Figura 2

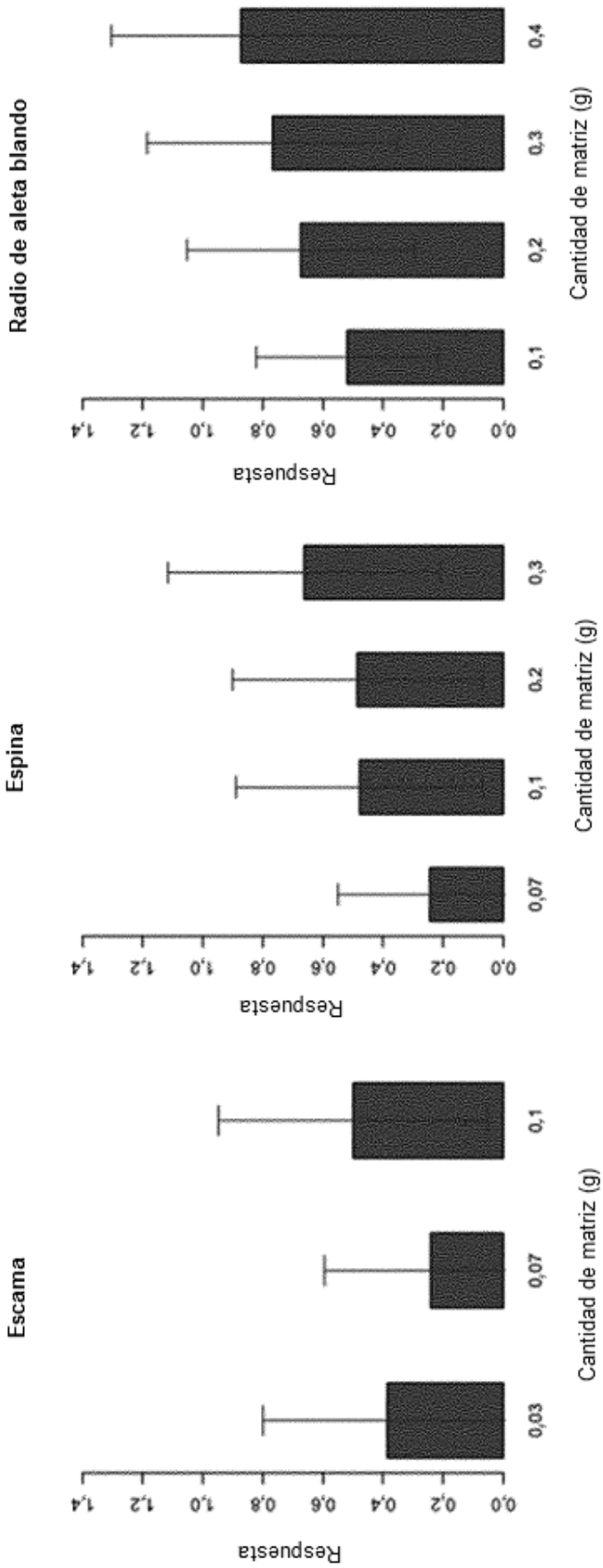

Escama
Respuesta
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1,2
1,4
0,03
0,07
0,1
Cantidad de matriz (g)
Espina
Respuesta
0,07
0,1
0,2
0,3
Cantidad de matriz (g)
Radio de aleta blando
Respuesta
0,1
0,2
0,3
0,4
Cantidad de matriz (g)

Figura 3

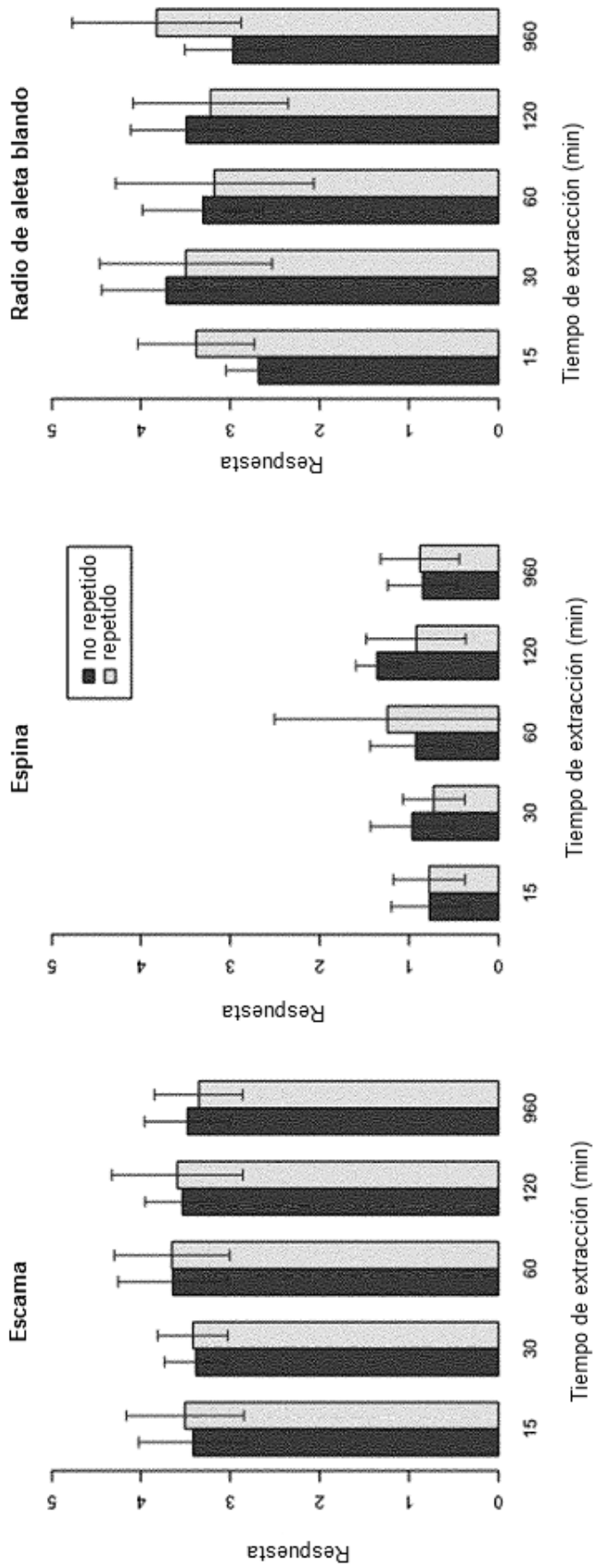

Escama
Espina
Radio de aleta blando
Respuesta
Tiempo de extracción (min)
no repetido
repetido
0
1
2
3
4
5
15
30
60
120
960

Figura 4

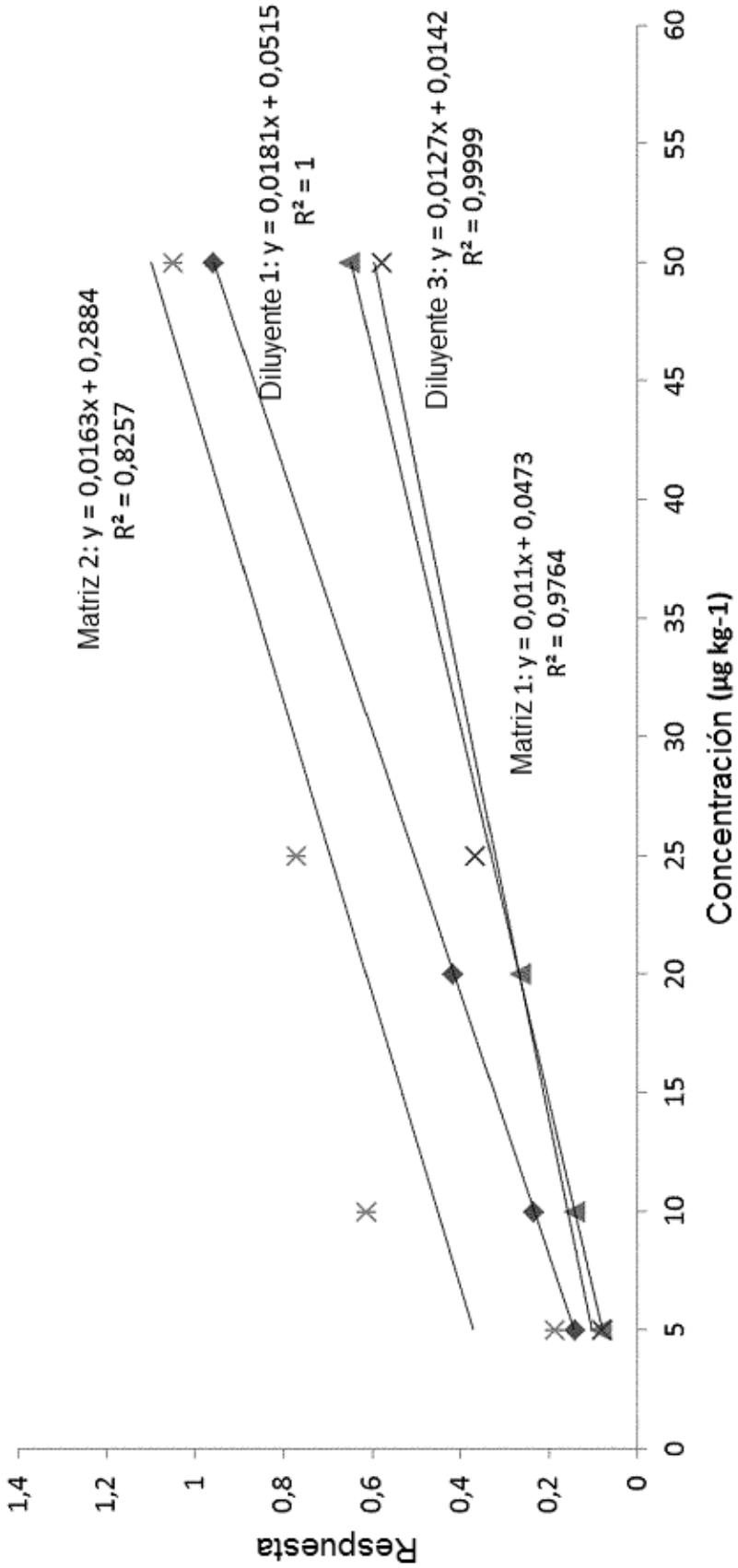

Matriz 2: y = 0,0163x + 0,2884
R² = 0,8257
Diluyente 1: y = 0,0181x + 0,0515
R² = 1
Diluyente 3: y = 0,0127x + 0,0142
R² = 0,9999
Matriz 1: y = 0,011x + 0,0473
R² = 0,9764
Respuesta
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
Concentración (µg kg-1)

Figura 5

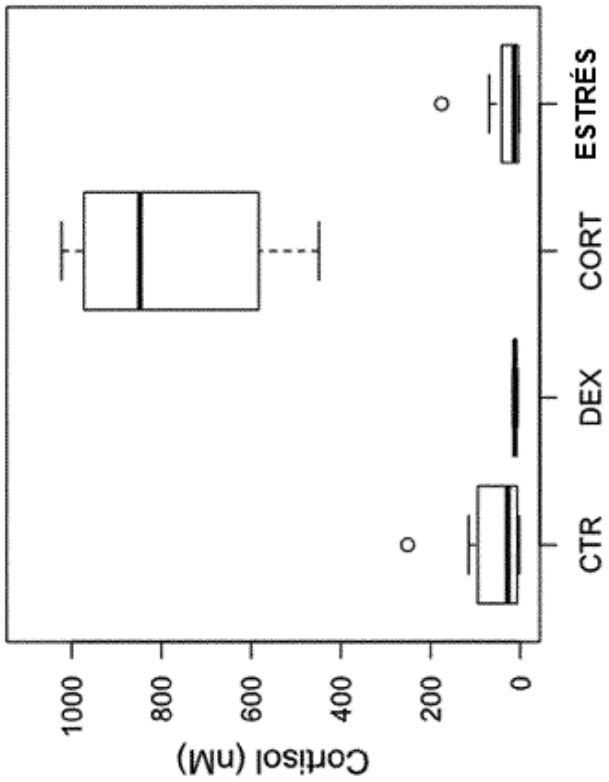


Figura 6 a

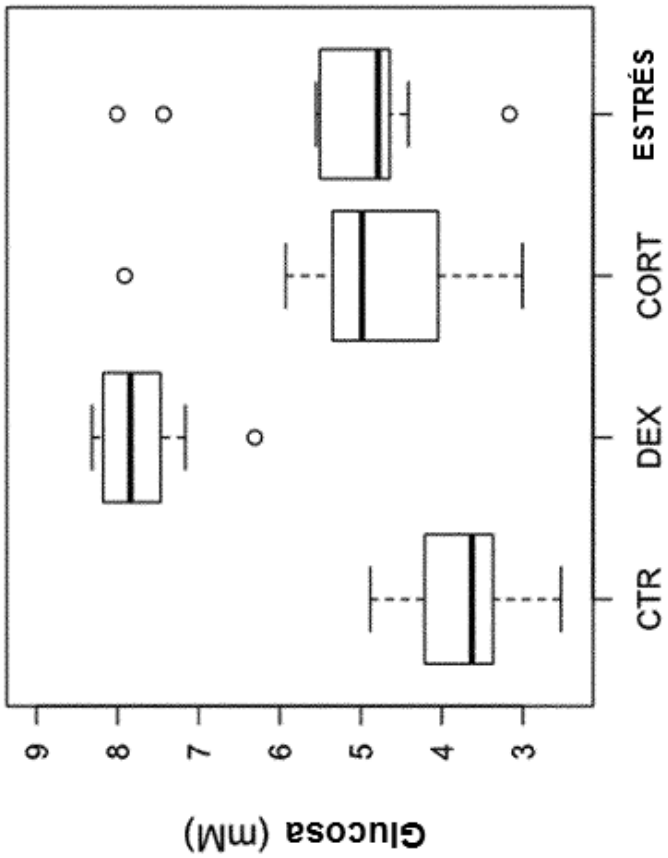


Figura 6 b

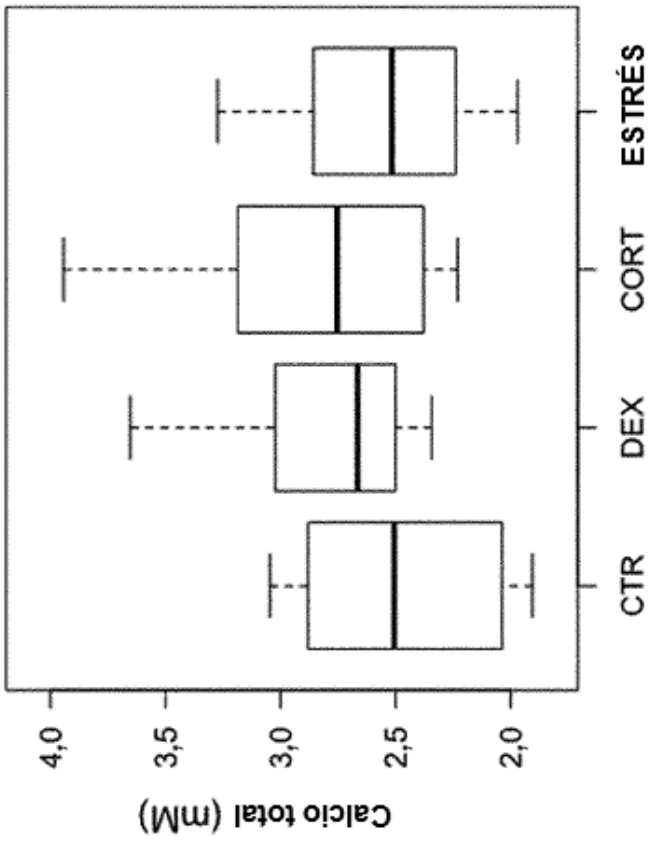


Figura 6 d

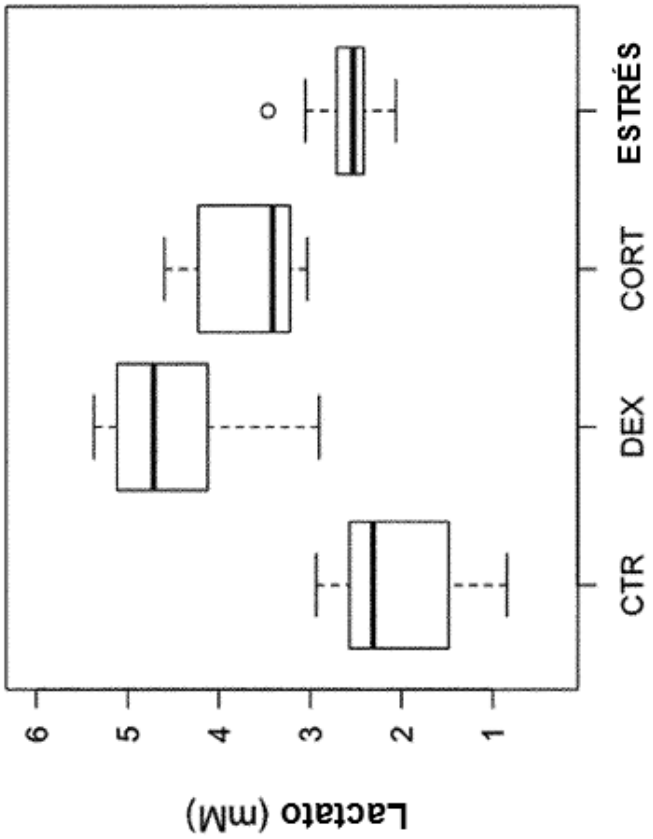


Figura 6 c

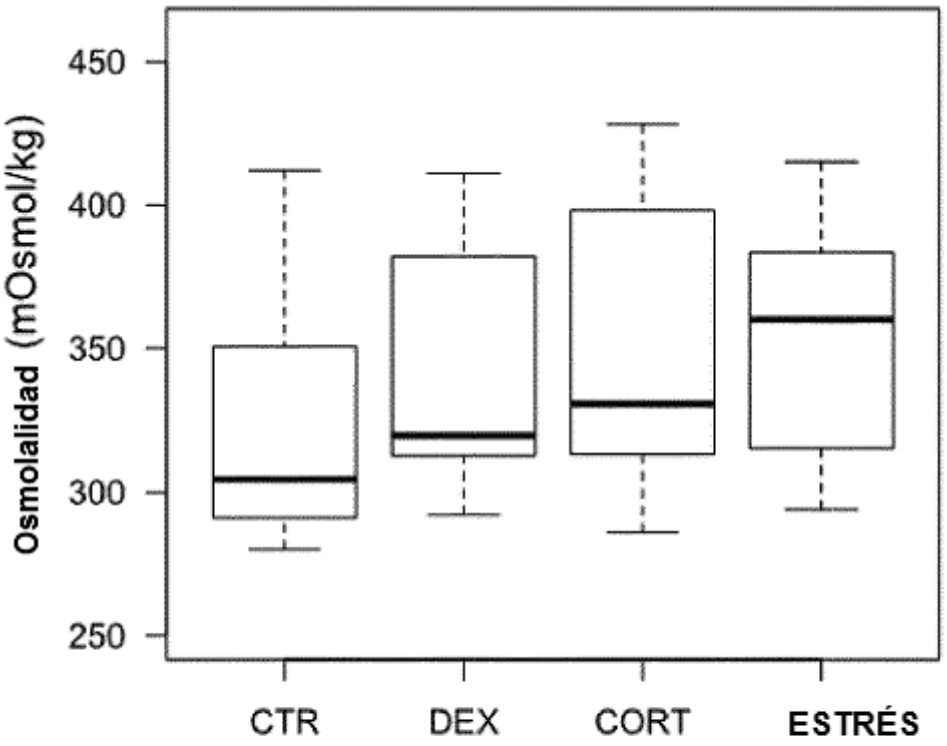

Osmolalidad (mOsmol/kg)
450
400
350
300
250
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS

Figura 6 e

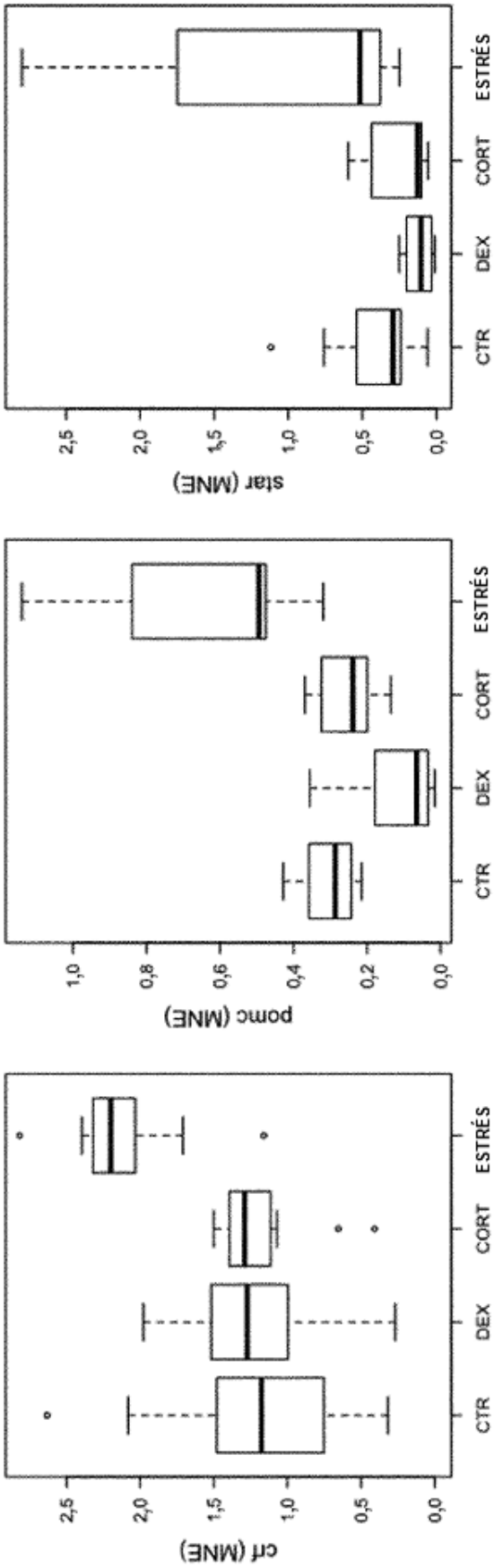

crf (MNE)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS
pomc (MNE)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS
star (MNE)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS

Figura 7

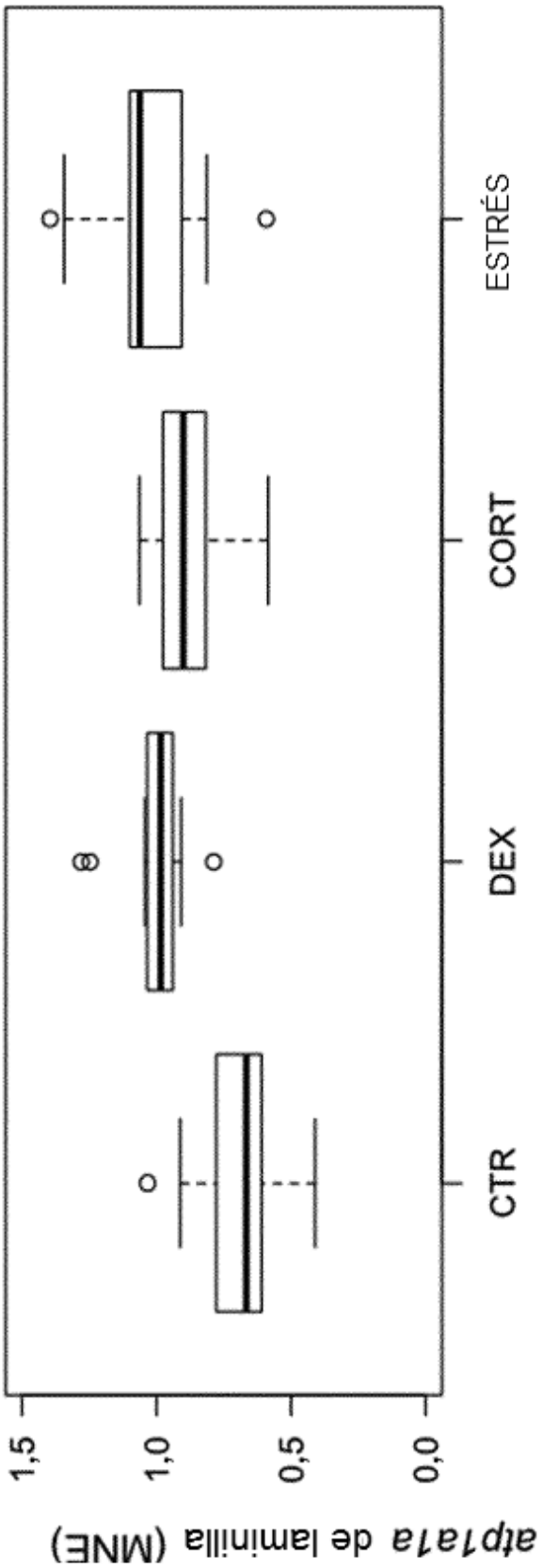


Figura 8

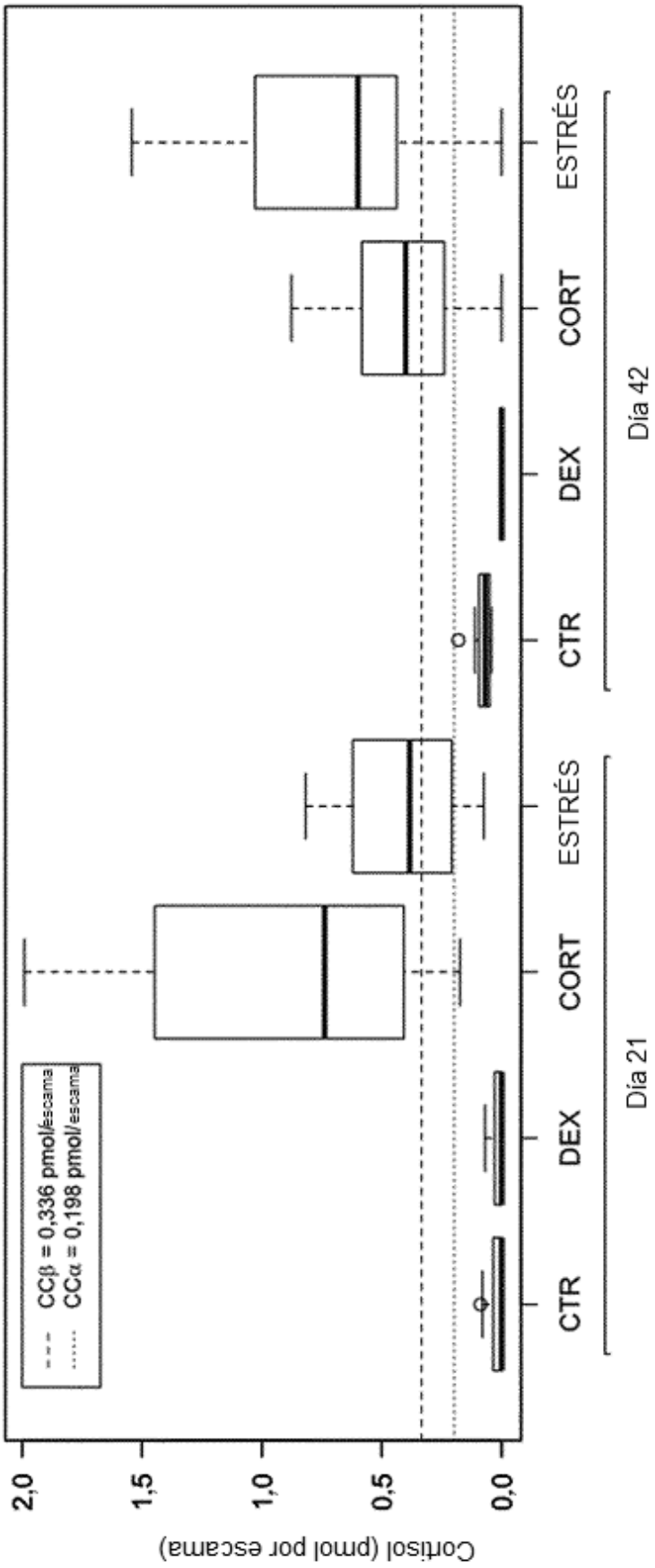

Cortisol (pmol por escama)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
CCβ = 0,336 pmol/escama
CCα = 0,198 pmol/escama
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS
CTR
DEX
CORT
ESTRÉS
Día 21
Día 42

Figura 9

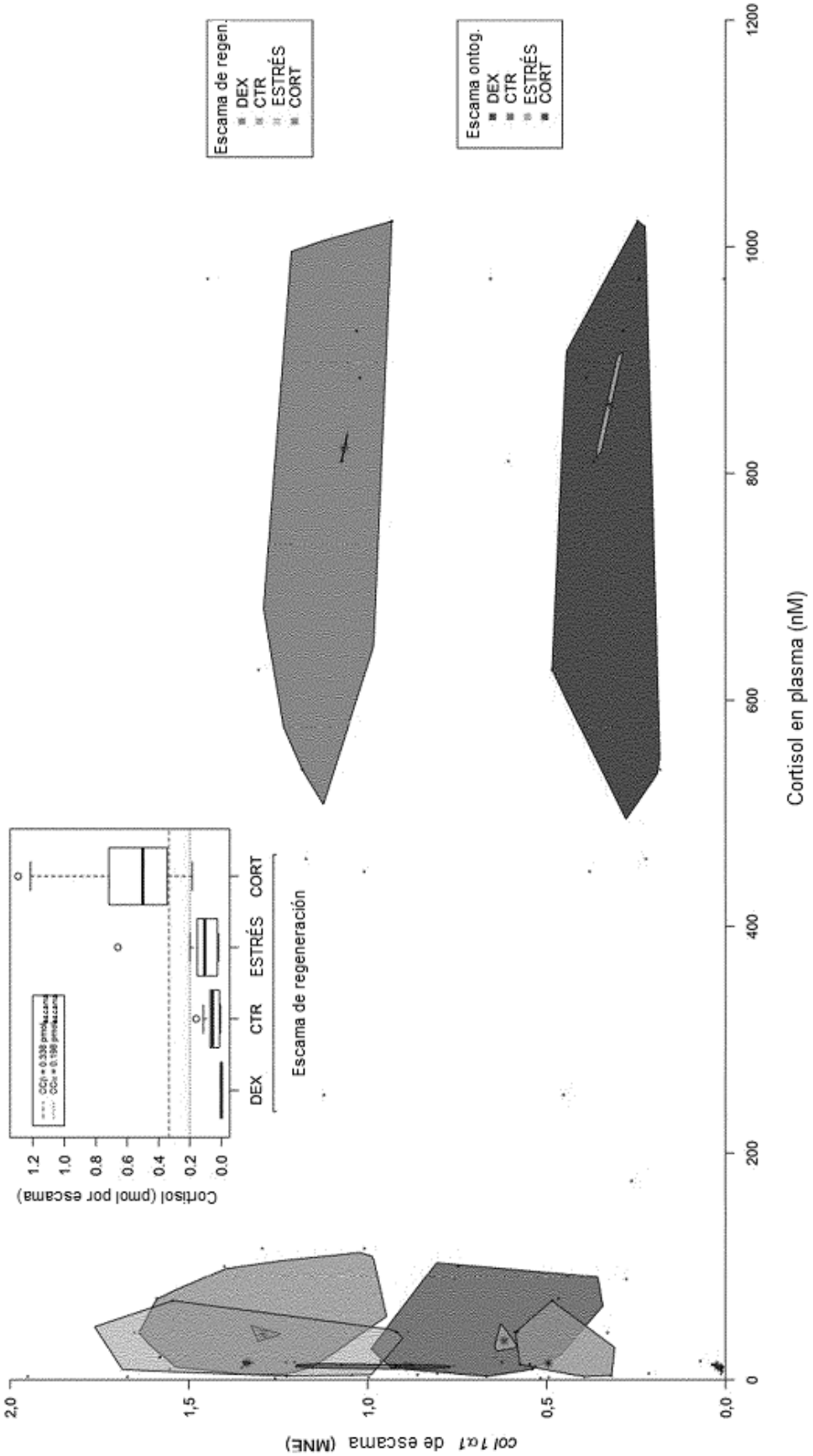

Escama de regen.
DEX
CTR
ESTRÉS
CORT
Escama ontog.
DEX
CTR
ESTRÉS
CORT
Cortisol (pmol por escama)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
DEX
CTR
ESTRÉS
CORT
Escama de regeneración
col 1α1 de escama (MNE)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
200
400
600
800
1000
1200
Cortisol en plasma (nM)

Figura 10

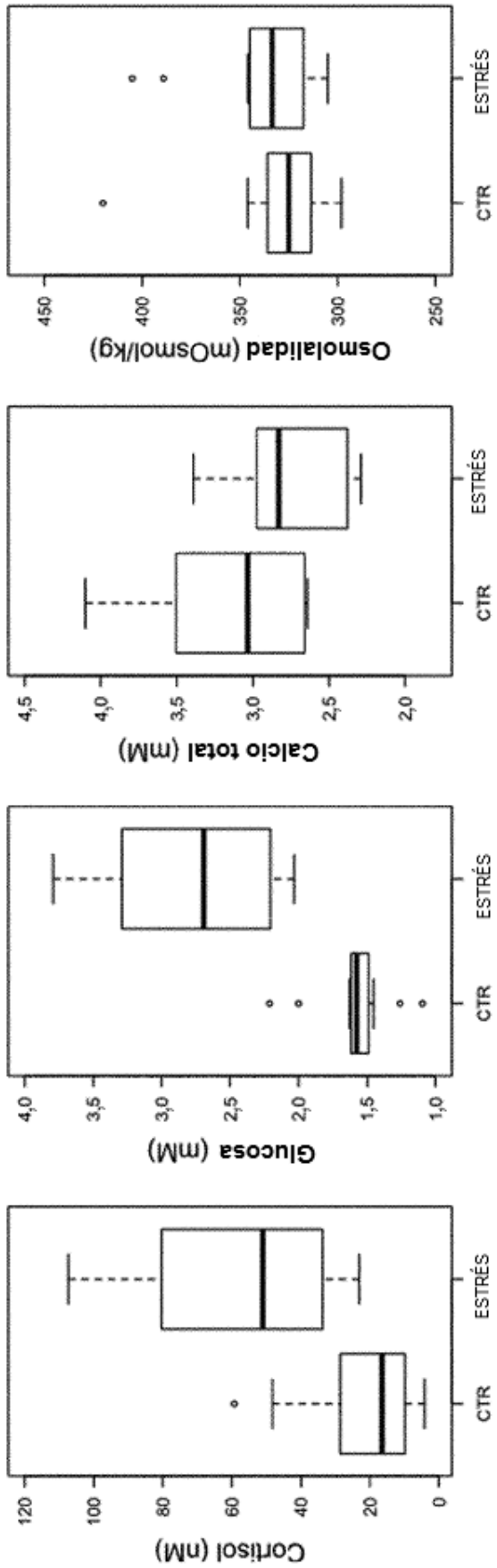

Cortisol (nM)
120
100
80
60
40
20
0
CTR
ESTRÉS
Glucosa (mM)
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
CTR
ESTRÉS
Calcio total (mM)
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
CTR
ESTRÉS
Osmolalidad (mOsmol/kg)
450
400
350
300
250
CTR
ESTRÉS

Figura 11

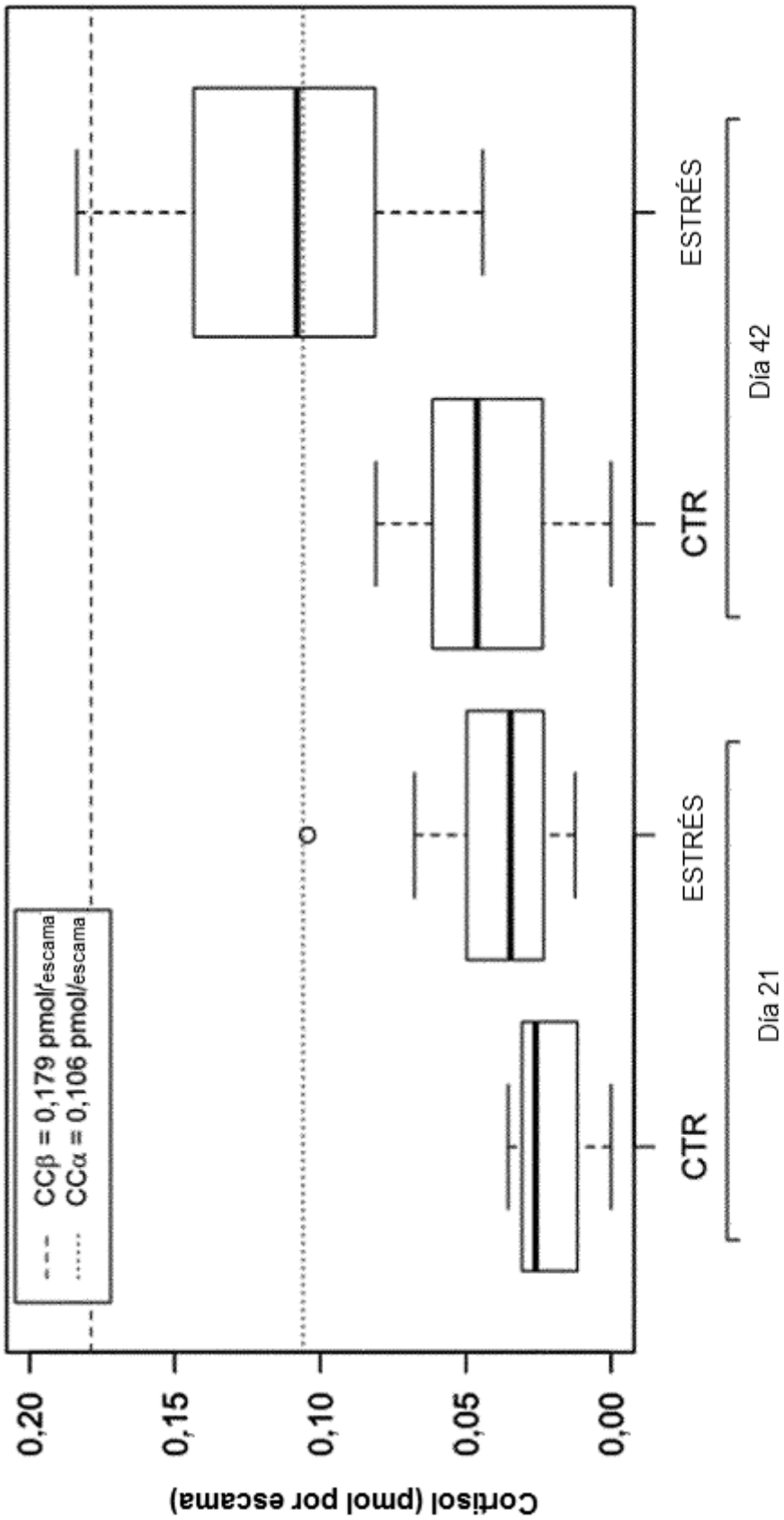

Cortisol (pmol por escama)
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
CCβ = 0,179 pmol/escama
CCα = 0,106 pmol/escama
CTR
ESTRÉS
CTR
ESTRÉS
Día 21
Día 42

Figura 12

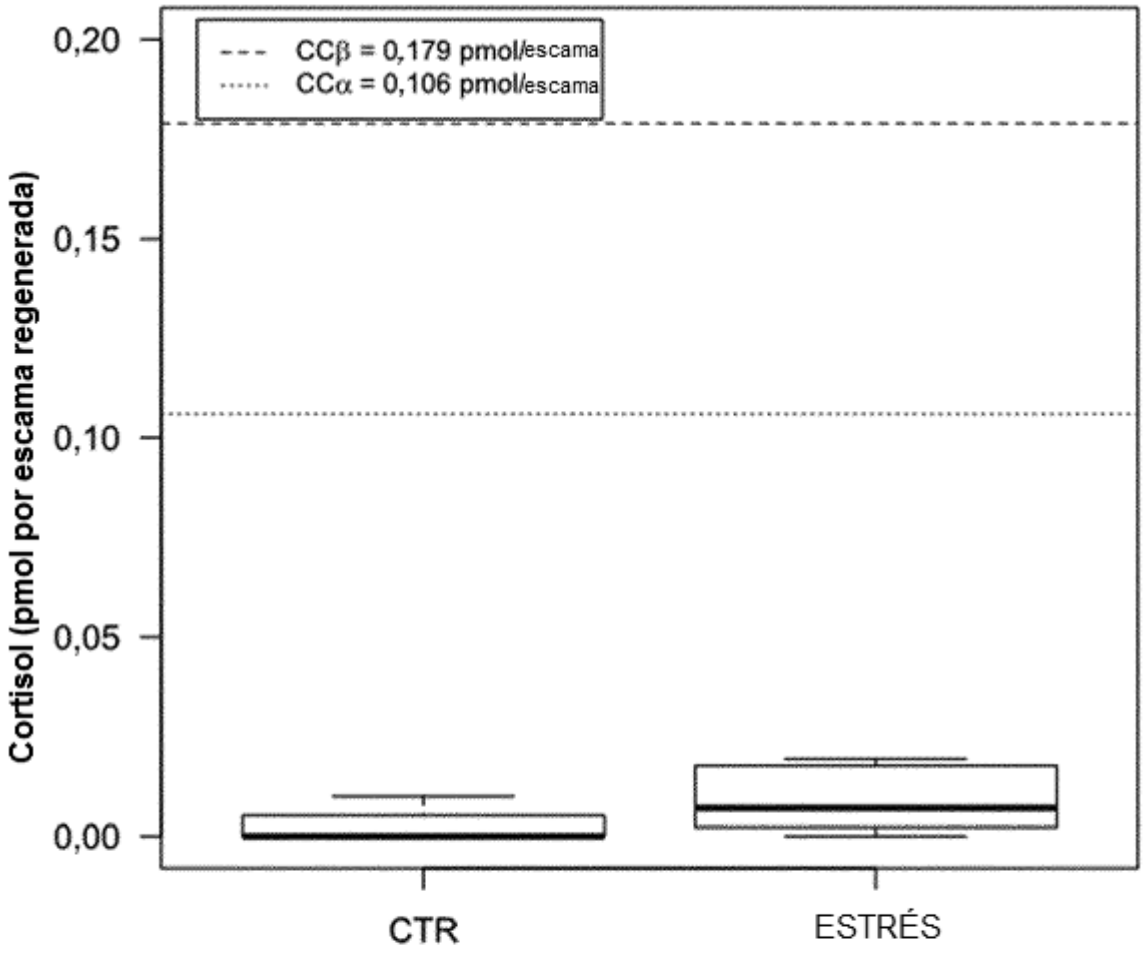

CCβ = 0,179 pmol/escama
CCα = 0,106 pmol/escama
Cortisol (pmol por escama regenerada)
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
CTR
ESTRÉS

Figura 13