

C. Bienestar Animal I,II

CONTAMINACIÓN POR ESTEROIDES DE ORIGEN HUMANO EN INVESTIGACIONES DE LABORATORIO: EL CASO DEL PULPO COMÚN

Rotllant J^{1*}, Costas C¹, Méndez-Martínez L¹, Guerrero-Peña L¹, Barreiro-Docío E¹, Otero, S¹, Costas-Imbernón D¹, Tur R², García P², Touriñan P², Maskrey B³, Scott A³, Saura, M¹.

¹Laboratorio de Biotecnología Acuática (ACUABIOTEC Lab.) Instituto Investigaciones Marinas -CSIC. Vigo, España

²Pescanova Biomarine Center. O Grove. Pontevedra. España

³Centre for Environment Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), UK.

Resumen

Recientemente, varios estudios (Chancellor et al., 2021, 2023; Zhang et al., 2021) han propuesto la medición de corticosteroides, en particular el cortisol, como un indicador fiable del nivel de estrés en cefalópodos, incluyendo el pulpo común (*Octopus vulgaris*). Sin embargo, existen tres evidencias significativas que ponen juicio esta afirmación. La primera es de naturaleza evolutiva, la segunda se basa en consideraciones fisiológicas, y la tercera deriva de pruebas experimentales. En este trabajo, demostramos la ausencia de estas moléculas en el pulpo común, y presentamos evidencia experimental del ruido aleatorio causado por la contaminación por parte de los propios investigadores en estudios que se centran en la identificación de este tipo de moléculas lipídicas específicas para medir el estrés en ciertas especies de organismos acuáticos.

Introducción

La inclusión reciente de los cefalópodos en las directivas de bienestar animal de la UE y el creciente interés en el cultivo del pulpo común (*Octopus vulgaris*) han impulsado la búsqueda de biomarcadores de estrés para esta especie. Un aspecto fundamental para establecer una base científica sólida que avance en el conocimiento del bienestar del pulpo se centra en la caracterización de diferentes marcadores de estrés, especialmente los relacionados con los glucocorticoides. Aunque los glucocorticoides son conocidos como los principales mediadores del estrés en vertebrados, su función en invertebrados como el pulpo común aún no está clara. Este estudio busca evidenciar que la presencia de esteroides similares a los encontrados en vertebrados en tejidos de invertebrados no implica necesariamente que sean endógenos o actúen como hormonas. Hay tres evidencias principales que cuestionan el uso de esteroides humanos como indicadores válidos para medir el estrés en estas especies. En primer lugar, la distancia evolutiva entre humanos y pulpos es considerable; especies más cercanamente relacionadas con los humanos, como ratas, lampreas, anfibios y tiburones, no utilizan cortisol como principal esteroide de estrés, lo que sugiere una variabilidad en los sistemas hormonales del estrés. En segundo lugar, no hay evidencia de que los moluscos tengan la capacidad de metabolizar esteroides o posean receptores de glucocorticoides. Sin embargo, tienen la capacidad de absorber esteroides del medio ambiente, lo que podría influir en las mediciones. Por último, los propios investigadores pueden ser una fuente de contaminación en los experimentos, como se muestra en este trabajo al evidenciar la contaminación del agua con esteroides humanos en diseños experimentales. Estos hallazgos resaltan la importancia de un diseño experimental riguroso y un protocolo adecuado para evitar sesgos en la medición del estrés en el pulpo común y otras especies invertebradas.

Material y métodos

Para determinar la presencia o ausencia de los tres principales glucocorticoides que rigen el equilibrio energético (cortisol, cortisona y corticosterona) en muestras de agua y hemolinfa de pulpo común, se utilizó una combinación de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Se tomaron muestras de agua y hemolinfa de 10 pulpos adultos cultivados que habían sido previamente anestesiados. La extracción de corticosteroides de las muestras se llevó a cabo utilizando cartuchos de extracción de fase sólida C18 SPE. La detección se realizó con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Xevo TQ-S (Waters, Reino Unido). La separación cromatográfica se logró utilizando una columna Acquity HSS T3 Premier (2,1 x 100 mm; 1,8 µm; Waters, Reino Unido), siendo la fase móvil agua y la fase móvil metanol, ambas con un contenido de ácido fórmico del 0,1%. La manipulación de *O. vulgaris* se realizó de acuerdo con la directiva de bienestar de la UE (Directiva 2010/63/UE). Expediente de autorización de proyectos de experimentación animal: ES360570202001/19/EDUC FORM.07/JRM01.

Resultados y discusión

Este estudio presenta tres evidencias cruciales en la investigación sobre el bienestar en cefalópodos, centrándose específicamente en el estudio del bienestar animal en el pulpo común y su extrapolación a otros organismos acuáticos. En primer lugar, se destaca que los propios investigadores pueden ser una fuente

significativa de contaminación en los estudios de bienestar animal que emplean niveles de esteroides para evaluar el estrés en determinadas especies.

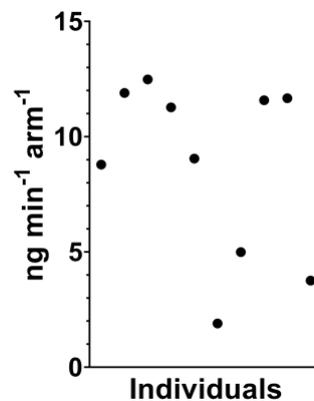


Figura 1. Cantidad de cortisol liberado en el agua tras la inmersión del brazo hasta el codo de un investigador en agua destilada durante 1 minuto. n=10

La Figura 1 muestra la cantidad de cortisol liberado en el agua tras la inmersión del brazo hasta el codo de diez personas en agua destilada durante 1 minuto. Se detectaron niveles de cortisol desde los 2 ng hasta las decenas de nanogramos lo que sugiere una contaminación significativa y plantea interrogantes sobre la posible contaminación humana en estudios de determinación de cortisol. La segunda evidencia presentada en este estudio es la ausencia de los tres principales glucocorticoides responsables del equilibrio energético y la respuesta al estrés en vertebrados (cortisol, cortisona y corticosterona) en las muestras de hemolinfa de los pulpos analizados. Finalmente, los resultados del análisis genómico de homología indican que los genes que codifican para las enzimas esenciales que sintetizan estos esteroides, así como sus receptores, no están presentes en el genoma de esta especie (Destanović et al., 2023). Por lo tanto, considerando todas estas evidencias, este estudio cuestiona la idea de que la detección de glucocorticoides de origen vertebrado en los tejidos de moluscos necesariamente implique que sean hormonas endógenas. Se pone en duda las afirmaciones de algunos estudios que sugieren que las concentraciones de glucocorticoides están funcionalmente relacionadas con la respuesta al estrés y pueden ser utilizadas como biomarcadores en moluscos.

Palabras Clave:

Pulpo, Moluscos, cortisol, cortisona, corticosterona, esteroides, estrés

Bibliografía

- Chancellor, S., Grasse, B., Sakmar, T., Scheel, D., Brown, J. S., Santymire, R. M. 2023. Exploring the Effect of Age on the Reproductive and Stress Physiology of Octopus bimaculoides Using Dermal Hormones. *Animals* 2023, 13, 3115.
- Chancellor, S.; Abbo, L.; Grasse, B.; Sakmar, T.; Brown, J.S.; Scheel, D.; Santymire, R.M. 2021. Determining the effectiveness of using dermal swabs to evaluate the stress physiology of laboratory cephalopods: A preliminary investigation. *General and Comparative Endocrinology* 314, 113903.
- Destanović, D., Schultz, D. T., Styfhals, R. Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Gut, M., Gut, I., Fiorito, G., Simakov, O., Alioto, T. S., Ponte, G. & Seuntjens, E. 2023. A chromosome-level reference genome for the common octopus, *Octopus vulgaris* (Cuvier, 1797). *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 13 jkad220, Larsen and Anderson., 2010
- Zhang, Z., Bai, Q., Xu, X. and Zhang, X. 2021. Effects of the dominance hierarchy on social interactions, cortisol level, HPG-axis activities and reproductive success in the golden cuttlefish *Sepia esculenta*. *Aquaculture* 533: 736059.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto/contrato CECAELIA: Optimización y bienestar del pulpo común bajo condiciones de cultivo. (Referencia: IDI-20210907) del Centro de Desarrollo Industrial (CDTI-E.P. E) perteneciente al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España.

Correo del Autor

rotllant@iim.csic.es