



Università
Ca' Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Chimica e Tecnologie sostenibili

Tesi di Laurea

Cortisolo e altri indicatori di stress:
studio del loro comportamento in
Aphanius fasciatus e saliva umana

Relatore

Prof. Andrea Gambaro

Primo Correlatore

Dr. Matteo Feltracco

Laureanda

Agata Alterio

Matricola 874125

Anno Accademico

2022 / 2023



Università
Ca'Foscari
Venezia

Indice

Scopo della tesi	1
1. Introduzione	2
1.1. Stress nei pesci	2
1.1.1. Cortisolo, cortisone, DHEAS	4
1.1.2. Scaglie dei pesci come matrici di stress cronico	7
1.2. Saliva umana: produzione e composizione	9
1.2.1. Saliva come vettore di molecole “segnale”	11
1.2.2. Indicatori di stress	13
2. Metodo strumentale	17
2.1. Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)	17
2.2. Spettrometro di massa	19
2.2.1. Sorgente	21
2.2.2. Analizzatore	22
2.2.3. Detector	23
3. Campionamento	24
3.1. Specie <i>Aphanius fasciatus</i>	24
3.1.1. Campionamento dei pesci <i>Aphanius Fasciatus</i>	25
3.2. Campionamento della saliva	27
4. Validazione del metodo analitico – aspetti teorici	29
4.1. Spettrometria di massa	29
4.2. Cromatografia	30
4.3. Preanalitica	30
4.4. Validazione del metodo analitico	30
4.5. Quantificazione	32

5. Messa a punto dei metodi	34
5.1. Standard di riferimento e materiali	34
5.2. Sviluppo del metodo strumentale	35
5.2.1. Metodo spettrometria di massa	35
5.2.2. Metodo cromatografico	37
5.2.3. Ottimizzazione della sorgente ESI	38
5.3. Risposta strumentale	40
5.4. Procedura preanalitica	43
5.4.1. Preanalitica dei campioni di <i>A. fasciatus</i>	43
5.4.2. Preanalitica dei campioni di saliva	44
5.5. Validazione della procedura analitica	45
5.5.1. Validazione dei campioni di <i>A. fasciatus</i>	45
5.5.1.1. Epidermide	47
5.5.1.2. Scaglie	49
5.5.2. Validazione dei campioni di saliva	50
6. Analisi e discussione dati	53
6.1. Indicatori di stress nei campioni di <i>A. fasciatus</i>	53
6.2. Indicatori di stress nella saliva	56
Conclusioni	64
Bibliografia	67
Appendice	85
A1	85
A2	86
A3	86

Scopo della tesi

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è la messa a punto di una nuova metodologia analitica per la determinazione di composti organici idrosolubili, considerati importanti indicatori di stress, in matrici biologiche, mediante tecniche ifenate HPLC-MS/MS. La metodologia analitica è stata successivamente applicata allo studio dello stato fisiologico di pesci e dell'uomo, in particolari situazioni ambientali.

In particolare è stata validata una procedura preanalitica per estrarre gli ormoni cortisolo, cortisone e deidropiandrosterone solfato accumulati nell'epidermide e nelle scaglie dei pesci *Aphanius fasciatus*, in modo da valutare separatamente il contributo rispettivamente dello stress acuto e dello stress cronico. Questo ci ha permesso di valutare come le condizioni ambientali influenzano lo stato fisiologico del pesce mediante la determinazione di questi *marker* in campioni di pesci presenti da un anno in un acquario e pesci appena pescati.

Per quanto riguarda l'uomo è stato sviluppato il metodo strumentale e la procedura preanalitica per la determinazione di cortisolo, cortisone, epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) e dopamina nella saliva umana.

La successiva analisi di campioni di liquido biologico dei volontari AVIS della sede di Marcon (VE), prelevati in tre diverse fasi della donazione di sangue (all'arrivo, prima e dopo la donazione), ha permesso di individuare le fasi critiche della donazione e la diversità tra genere e assiduità nel dono.

1. Introduzione

Gli esseri viventi, e in particolare gli uomini e gli animali, affrontano durante la loro vita diverse situazioni più o meno avverse che non permettono loro di mantenere lo stato fisiologico "normale" e portano a uno stato fisiologico di alterazione e di sofferenza indicato come "stress". Quest'ultimo si distingue in stress acuto e cronico: il primo viene percepito subito dopo un evento traumatico e persiste per un lasso di tempo di una decina di minuti [1]. Il secondo, invece, è causato da un fenomeno intenso che può perdurare ore o giorni e comporta costi energetici insostenibili a lungo termine causando una diminuzione delle prestazioni dell'individuo [2]. In risposta all'evento stressante gli organismi tendono a secernere ormoni glucocorticoidi come il cortisolo e neuro ormoni come la dopamina, per autodifesa e regolazione dei sistemi biologici [1], [3]. Queste biomolecole vengono usate come indicatori di stress per permettere di analizzare quantitativamente questa particolare condizione fisiologica [4], [5].

1.1. Stress nei pesci

Lo stress nei pesci, a seconda della tipologia delle azioni scatenanti, si divide in biotico e abiotico. Il primo è dovuto alle azioni o alla presenza di organismi viventi esterni ai pesci indagati, il secondo, invece, è dovuto alle condizioni di vita e soprattutto alle condizioni ambientali a cui i pesci oggetto di studio sono sottoposti durante la loro esistenza. In particolare i fattori imputati alla diretta insorgenza di stress possono essere raggruppati in ambientali, biologici e fisici [3]. I primi fanno riferimento all'acqua in cui vivono, quindi ai parametri chimico-fisici di pH, temperatura e salinità [2], [6], ma anche alla presenza di contaminanti come insetticidi, erbicidi e fertilizzanti dispersi negli ambienti acquatici a seguito di attività industriali e agricole [7], [8]. La presenza dell'uomo influenza lo stato dei pesci anche con l'inquinamento acustico subacqueo del traffico navale e dei festival musicali [9]. Il fattore biologico, invece, è indotto da batteri o agenti patogeni presenti nell'ambiente in cui vivono. Infine, il fattore fisico è dato dal sovraffollamento delle vasche (per esempio per i pesci di

acquacoltura sia a scopi alimentari ma anche di esposizione), dall'attacco di predatori e dalla cattura da parte degli umani [3].

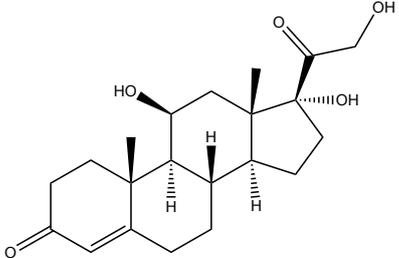
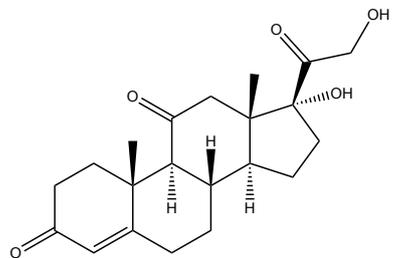
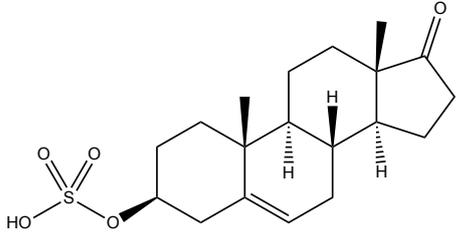
Per far fronte allo stato fisiologico di stress l'organismo dei pesci risponde con una serie di reazioni biochimiche [2], [3], [10]. La risposta primaria attiva il sistema neuroendocrino ed endocrino producendo gli ormoni corticosteroidi (cortisolo e i suoi derivati) e le catecolamine (adrenalina, noreadrenalina e dopamina), che tendono ad accumularsi nel sangue [3], [4]. Queste biomolecole sono utilizzate come indicatori di stress a seguito della comprovata correlazione tra la loro secrezione e lo stato di stress della specie [4], [5]. La risposta secondaria è mediata dagli indicatori di stress che portano all'attivazione di vie metaboliche alterando alcune componenti chimiche del sangue del pesce: ne è un esempio la produzione di glucosio dal glicogeno, necessaria per far fronte all'elevata necessità di energia data dallo stato di stress [11]. La terza risposta, invece, è caratteristica della specie e si riferisce alla sua capacità di adattarsi al nuovo ambiente che ha generato lo stress portando a dei cambiamenti a livello di crescita, riproduzione, immunodepressione e osmoregolazione [3], [5], [12].

Quando l'esposizione allo stress è temporanea e transitoria, caratteristica dello stress di tipo acuto, la specie reagisce attivando una serie di reazioni biochimiche (risposta primaria e secondaria) per far fronte all'evento perturbante; la conseguente richiesta energetica è definita come sovraccarico allosterico di tipo I e contribuisce positivamente a contrastare l'emergenza, permettendo l'adattamento e il superamento dell'azione scatenante [1], [13]. Lo stress di tipo cronico invece è quello dato da un'esposizione più lunga, di ore o addirittura giorni, che può essere dannosa per la specie. In questo caso si parla di sovraccarico allosterico di tipo II che comporta un'influenza principalmente negativa, che compromette definitivamente l'organismo con conseguente immunodeficienza, soppressione riproduttiva e scarsa sopravvivenza (risposta terziaria), passando a una risposta disadattiva. Questi cambiamenti fisiologici sono legati all'elevato dispendio di energia necessario per superare l'evento stressante [14], [15].

1.1.1. Cortisolo, cortisone, DHEAS

In risposta a un evento scatenante una situazione avversa o a una condizione alterata, i pesci secernono degli ormoni come il cortisolo, il cortisone e il deidropiandrosterone solfato (DHEAS), utili per diagnosticare lo stato fisiologico della specie attraverso la loro determinazione in diverse matrici come il sangue, il muco, le scaglie, le uova e le feci [5], [16]. La struttura chimica e il peso molecolare di queste biomolecole sono riportati in Tabella 1.

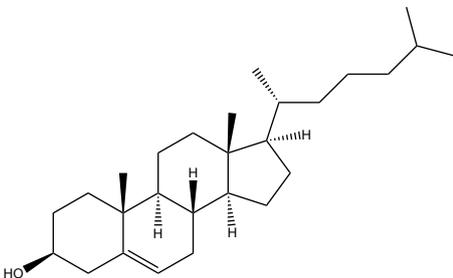
Tabella 1: struttura chimica, abbreviazione, formula bruta e peso molecolare degli ormoni glucocorticoidi: cortisolo, cortisone e DHEAS.

Struttura	Abbreviazione	Formula bruta	Peso molecolare
 CORTISOLO	COL	$C_{12}H_{30}O_5$	362
 CORTISONE	CON	$C_{21}H_{28}O_5$	360
 DEIDROPIANDROSTERONE SOLFATO	DHEAS	$C_{19}H_{28}O_5S$	368

La sintesi del cortisolo, l'ormone corticosteroido maggiormente prodotto dai pesci [4], [17], avviene sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale

(HPI) nelle cellule interrenali che sono disposte linearmente e a strati sulle pareti delle vene cardinali posteriori e i loro rami, nella regione testa-reni. Il sistema ipotalamo-ipofisi permette di collegare il sistema nervoso con quello endocrino e regolare la produzione di ormoni nei pesci, come anche negli uomini [1]. Come tutti gli ormoni corticosteroidi il cortisolo si sintetizza partendo dal colesterolo (in Tabella 2 è riportata la sua struttura chimica, formula chimica e peso molecolare) mediante delle reazioni a catena, catalizzate da degli enzimi, che mirano a modificare la catena laterale del composto biochimico di partenza.

Tabella 2: struttura chimica, formula bruta e peso molecolare del colesterolo.

Struttura	Formula bruta	Peso molecolare
 <p>COLESTEROLO</p>	$C_{27}H_{46}O$	387

Gli enzimi coinvolti sono il citocromo desmolasi P450scc, il citocromo 17 α -idrossilasi (P450c17), la 3 β -idrossi steroide idrogenasi (3 β -HSD), il citocromo 21-idrossilasi (P450c21) e infine il citocromo 11-idrossilasi (P450c11). Il fattore biochimico che promuove la sintesi del cortisolo è l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), rilasciato dall'ipofisi a seguito della stimolazione da parte del neuropeptide ipotalamico CRH, un neurotrasmettitore coinvolto nella risposta di un evento perturbante per il pesce. Questo sistema biochimico dei pesci funziona similmente a quello dei mammiferi [1], [4]. Il cortisolo prodotto viene rilasciato nel sangue e assorbito dalle cellule dei diversi tessuti, attraverso la membrana cellulare, per diffusione passiva (trasporto delle molecole senza consumo di ATP). I suoi effetti sono regolati da due recettori intracellulari, quello mineralcorticoide (MR) e quello glucocorticoide (GR), che nei pesci agiscono entrambi come recettori per il cortisolo, ma regolano anche altri processi cellulari [4], [11], [18], [19]. Il complesso ormone-recettore intracellulare permette di modulare l'espressione genetica impattando sul metabolismo di carboidrati,

proteine e lipidi. Un esempio è l'incremento dell'attività della gluconeogenesi che comporta un aumento di produzione di glucosio e rifornisce il sistema di glicogeno consumato per far fronte all'evento "stressante". Questa stimolazione è affiancata anche da un notevole aumento dell'attività degli enzimi partecipanti alla gluconeogenesi [4], [20]. Un altro esempio dell'effetto regolatore del cortisolo è legato alla osmoregolazione nei pesci di acqua dolce e salata, i quali sotto stress aumentano lo squilibrio osmotico. In questa condizione la produzione di cortisolo permette di mantenere costante la concentrazione osmotica interna, permettendo alla specie di adattarsi ai cambiamenti di salinità dell'ambiente. I pesci d'acqua dolce tendono ad assorbire sali dall'ambiente mentre quelli di acqua salata li secernono attraverso le branchie [21], [22].

Per integrare le informazioni ottenute dal cortisolo (steroidi adrenocorticali maggiormente presenti negli organismi) e per interpretare meglio i risultati riguardo lo stato di stress dei pesci, sono stati scelti altri due indicatori: il cortisone e il DHEAS. Il cortisone è il metabolita inattivo del cortisolo, ottenuto per azione dell'isoenzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2, presente in diversi tessuti periferici dei teleostei, per azione dei recettori GR e MR. Il suo ruolo fisiologico, non ancora ben chiaro e descritto, è però legato alla riproduzione maschile dei pesci dal momento che è coinvolto nella biosintesi del 11-chetotestosterone, responsabile della formazione e differenziazione del testicolo, del cambiamento di sesso degli ermafroditi e della produzione di spermatozoi [23], [24]. L'aumento di produzione di cortisone può avvenire in risposta all'evento perturbante per far fronte al cortisolo prodotto, come forma di autoprotezione della specie [25], [16]. Diversi studi hanno però dimostrato la correlazione tra stress e cortisone nel plasma, considerandolo dunque un utile indicatore di stress per l'analisi dello stato di salute dei pesci [4], [5], [16]. Altri studi, per valutare lo stato fisiologico della specie in modo più accurato, sommano il contributo di cortisolo con quello di cortisone [26] oppure valutano il rapporto dei due analiti [25]. Il terzo indicatore di stress preso in esame nel presente lavoro di tesi è il DHEAS, uno steroidi presente nel sangue che svolge funzioni opposte al cortisolo come attività antiossidanti e immunoprotettive. La sua attività non è ancora molto chiara nei pesci, ma si pensa che coinvolga l'enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 e quello di tipo 1, responsabili

della riconversione del cortisone in cortisolo, e viceversa. Il meccanismo d'azione tende a incrementare e diminuire la trascrizione rispettivamente del primo e del secondo enzima [16], [27], [28]. È stato comunque riscontrato che un aumento del rapporto cortisolo e DHEAS è associabile alla condizione di stress [29], quindi utilizzare il DHEAS come indicatore insieme al cortisolo e il cortisone porta a uno studio quantitativo multi ormonale, in grado di scoprire maggiori informazioni e un quadro più completo sullo stato dei pesci [16].

1.1.2. Scaglie dei pesci come matrici di stress cronico

I pesci teleostei, definiti anche pesci ossei, sono caratterizzati da uno scheletro osseo e appartengono alla classe più numerosa dei pesci. Possiedono le scaglie elasmoidi, denominate così perché composte da uno strato di elasmodina flessibile, una forma mineralizzata del collagene [30]. Le scaglie sono situate nella regione superiore al derma vicino all'epidermide e sono disposte in file longitudinali e verticali ben ordinate [31]. Sono inoltre sottili e conformi, consentendo al pesce un libero movimento, velocità di nuoto e favoriscono la funzione di protezione [32], [33]. Le scaglie si formano nel derma, ma a differenza di altri elementi dello scheletro dermico non hanno un inizio cartilagineo e sono composte da tre diversi tessuti, uguali per tutte le specie di teleostei [30], [31], [34], [35]:

- strato sottile interno mineralizzato, composto da fibrille di collagene intrecciate con apatite, denominato collagene di tipo I
- strato basale, che permette l'aumento di spessore della scaglia, il quale non è completamente mineralizzato ed è composto da elasmodina e alcuni strati di fibrille di collagene
- strato esterno limitante, detto anche strato osseo, ipermineralizzato privo di fibrille di collagene

La parte mineralizzata della scaglia è composta dall'idrossiapatite carbonata, un fosfato di calcio in parte sostituito dal carbonato di calcio [31]. Questo minerale si forma attraverso un processo termodinamico partendo sia dal fosfato amorfo sia dalla brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2(\text{H}_2\text{O})$) anche se quest'ultimo precursore spesso non viene riscontrato [31].

I diversi strati delle scaglie sono ricoperti anche da un monostrato di cellule chiamate scleroblasti, le quali si suddividono in osteoblasti e osteoclasti che mediano la formazione e il riassorbimento del tessuto osseo delle squame [30]; inoltre, presentano anche cellule pigmentate come i melanociti e cellule di origine epidermica [36]–[38].

Le cellule periferiche che rivestono le scaglie permettono a quest'ultime di avere ruoli fisiologici come la raccolta di calcio [39], dato l'alto contenuto di questo sottoforma di minerale (idrossiapatite carbonata), con conseguente ruolo nella regolazione dell'omeostasi [40]. Un altro esempio è anche la sensibilità nella mineralizzazione delle scaglie e la rapidità di rigenerazione una volta che vengono rimosse [41], [42].

Per quantificare i livelli degli ormoni glucocorticoidi e analizzare le condizioni fisiologiche degli organismi vertebrati e mammiferi si usa spesso come matrice il sangue [4], [43], [44], nonostante sia considerata una tecnica invasiva, che porta a valori soggetti a bias perché influenzati dallo stress dato dal prelievo stesso [5], [45], [46]. Ci sono però alternative meno invasive, necessarie per rispettare il benessere dell'animale: in particolare, nel caso dei pesci l'analisi degli ormoni nelle acque e nelle feci [47]. Tuttavia, queste mostrano alcune problematiche: ad esempio, la procedura richiede sistemi controllati, come l'isolamento dell'animale per non avere interferenze con gli ormoni rilasciati dalle altre specie presenti nella stessa vasca, oltre a conseguenti stati di stress dati dal trasferimento da una vasca di contenimento all'altra [5]. La procedura inoltre necessita di una rapida raccolta per evitare la degradazione del cortisolo [45]. Il prelievo di sangue, oltre ad essere una tecnica invadente per i pesci e soggetta a distorsione, fornisce solo un'istantanea (stress acuto) del livello ormonale nell'atto del campionamento e non rileva invece lo stress cronico [48]. Lo stress cronico, a differenza di quello acuto, ha maggior interesse di studio perché permette di avere informazioni sulla tensione accumulata durante l'intera vita dei teleostei. Analizzare il benessere della specie ittica diventa quindi interessante anche per comprendere e prevedere la risposta cronica della fauna marina alla variazione delle condizioni dell'ecosistema in cui vive, data dal cambiamento ambientale e da fattori antropici.

Le scaglie sono una matrice molto utile per la rilevazione dello stress cronico perché permettono l'accumulo degli steroidi glucocorticoidi di interesse a lungo

termine, per diffusione passiva attraverso i tessuti vicini e la circolazione [17], [45]. Inoltre il loro campionamento è meno invasivo rispetto alla tecnica del prelievo di sangue [17], [37], [49]. Riuscire a separare dalle scaglie lo strato superficiale di epidermide e muco rende possibile la discriminazione tra stress cronico e acuto ottenendo maggiori informazioni sullo stress dei pesci: dovuto sia all'impatto di eventi improvvisi, come la cattura o l'incontro di un predatore, sia da fenomeni ricorrenti che influenzano l'ambiente esterno [2], [45].

1.2. Saliva umana: produzione e composizione

La saliva è un liquido biologico costituito dal 99% di acqua e da composti inorganici e organici tra cui particolare importanza rivestono le proteine e i grassi [50]. I composti inorganici più presenti sono ioni: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^- , HCO_3^- , HPO_3^{2+} . La componente ionica cambia durante la produzione di saliva. La saliva appena prodotta (liquido primario) risulta avere la stessa concentrazione ionica del plasma (isotonica). Con il passaggio attraverso i dotti salivari verso la cavità orale, mediante consumo di ATP (trasporto ionico attivo), si ha un trasferimento degli ioni Na^+ e Cl^- che danno al fluido un carattere ipotonico (liquido secondario) rispetto al plasma, riducendone la concentrazione di ioni [51], [52]. La composizione ionica è variabile ed è strettamente legata alla stimolazione data dalla masticazione di alimenti. Ad esempio, cibi acidi portano a un aumento di concentrazione di sodio, cloruro e bicarbonato, mentre diminuisce quella di potassio e fosfato [53]. Nella saliva sono anche presenti composti organici sia proteici che non. Infatti può contenere l'acido urico, forte antiossidante e il più abbondante nell'uomo [54], [55], la bilirubina (indicatore dello stato di salute del fegato) [56] e la creatina (indicatore dello stato dei reni) [57]. Inoltre contiene glucosio, aminoacidi [58], acidi grassi [59], la cui concentrazione è legata all'alimentazione e lipidi come il colesterolo e il lattato [60]. Le molecole proteiche riscontrate nel liquido biologico possono derivare dalle ghiandole salivari come l'amilasi (facilita la masticazione e la digestione) e le proteine ricche di prolina PRP (30-40%), altre invece derivano dal plasma come l'albumina, la transferrina e la IgG. Ogni componente presente nella saliva ha il proprio compito nella salvaguardia della salute della cavità orale, prevenendo patologie e malesseri. Un esempio sono le molecole ricche di prolina che si assorbono sulla superficie dello

smalto dentale e insieme all'azione delle staterine (fosfolipide), proteggendo i denti da batteri e inibiscono la precipitazione di calcio [61].

La saliva ha un ruolo importante anche come vettore per diverse molecole in grado di indicare lo stato fisiologico dell'organismo come ad esempi gli ormoni. Sono stati riscontrati in essa alcuni ormoni, presenti anche nel plasma, che possono essere trasferiti nel liquido biologico per diffusione passiva dai vasi sanguigni oppure possono essere prodotti direttamente dalle ghiandole presenti nella cavità orale [60]. Queste biomolecole sono di natura lipofilica e giungono nella saliva attraverso lo strato lipofilo dei capillari e delle cellule epiteliali delle ghiandole, per diffusione passiva e lungo gradiente di concentrazione [62], [63].

Un uomo adulto sano produce sotto il controllo del sistema nervoso circa 500-1500 mL di saliva al giorno con una velocità di 0.5 mL min^{-1} e varia in base al momento della giornata e alle condizioni psicologiche, ormonali e fisiche come ad esempio la masticazione, l'igiene orale, lo sforzo fisico e l'età [50]. Questo liquido biologico è prodotto da 4 tipi di ghiandole salivari presenti nella cavità orale: sotto-mandibolari, sub-linguali, parotidi e minori. Le ghiandole salivari sono composte da cellule epiteliali chiamate acini, per la loro struttura agglomerata, che si suddividono in sierose, le quali secernano un liquido acquoso privo di mucina, una glicoproteina che funge da lubrificante, e mucose che al contrario liberano molta mucina. Negli acini viene prodotta la saliva primaria isotonica [50], [51]. In figura 1 si riporta un'immagine delle tre ghiandole salivari maggiori.

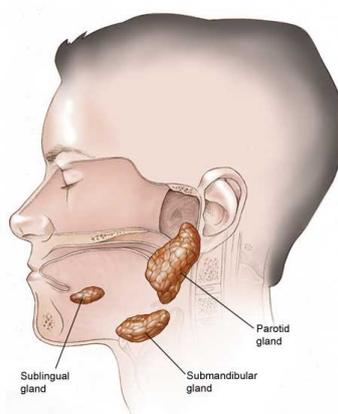


Figura 1: immagine delle tre ghiandole salivari: sotto-mandibolare, sub-linguale e parotidi.

Ciascuna ghiandola riflette la composizione e le caratteristiche della saliva da essa prodotta; le ghiandole parotidi, ad esempio, secernano un liquido sieroso in quanto non producono mucina, mentre quelle sotto-mandibolari e sub-linguali secernano un liquido misto siero-mucoso. Le ghiandole salivari minori invece si dividono in ghiandole di Von Ebner e ghiandole di Blandin-Nuhm e sono situate nel palato e nelle lingua. La composizione della saliva ha origine anche per vie non ghiandolari come dalle mucose orofaringee e contiene inoltre un fluido extracellulare crevicolare proveniente dagli epitelii dell'interstizio gengivale, siero originato dalla mucosa o da siti di infiammazione [50], [64], [65].

Il sistema nervoso autonomo regola l'azione degli organi e delle ghiandole non governate dalla nostra volontà e si suddivide in simpatico e parasimpatico: il primo agisce in situazione di emergenza preparando il corpo all'azione, mentre il secondo in situazioni di quiete, nelle attività di recupero. Questo sistema nervoso gioca un ruolo importante nella produzione della saliva e nell'arricchimento dei suoi componenti. La stimolazione simpatica è responsabile della produzione della saliva sierosa con alto contenuto di proteine e ioni potassio, dall'altra parte la stimolazione parasimpatica secreta saliva con concentrazioni basse di composti organici e inorganici [51], [60], [65], [66].

1.2.1. Saliva come vettore di molecole "segnale"

La saliva è un fluido biologico composto principalmente da acqua, come descritto nel capitolo 1.2., che ricopre diversi ruoli fisiologici come: proteggere la salute della cavità orale da microorganismi patogeni [67], facilitare la digestione degli alimenti grazie alla presenza di specifici enzimi (ad esempio l'amilasi), mediare la percezione del gusto tramite le papille gustative e mantenere la mineralizzazione dello smalto dentale [60], [68]. In passato la saliva è utilizzata anche come strumento per lo studio di ormoni in alternativa al prelievo di sangue. Alcuni studi hanno dimostrato una forte relazione tra concentrazioni ormonali nella saliva e nel siero, rendendola quindi una tecnica affidabile [69], [70]. Il campionamento di saliva in molti casi è preferito in quanto è un metodo non invasivo, facile da somministrare e veloce da eseguire. Data la sua composizione, questo liquido biologico ha forte interesse anche nel campo della diagnostica fungendo da strumento per la diagnosi precoce di malattie come la

sieropositività al virus HIV e, più in generale per il monitoraggio dello stato di salute dell'uomo [64], [68].

Come precedentemente descritto per i pesci, anche gli umani sono soggetti a stimoli esterni o interni che evocano una risposta biologica nota come stress, strettamente connessa al sistema nervoso centrale. Per superare questa situazione il corpo reagisce con una risposta adattativa detta "risposta allo stress", attivando dei processi dinamici per ripristinare l'omeostasi, preservare la vita e adattarsi. In base al momento e alla gravità dello stimolo, lo stress esercita diverse azioni sull'organismo che possono anche creare disturbi, modificando la qualità della vita. Lo stress può essere buono, ovvero aiuta a rendere ottimali alcune prestazioni, come ad esempio il miglioramento della memoria o, viceversa, cattivo, che invece causa la degenerazione di prestazioni compromettendo la memoria [71]. Lo studio pionieristico dell'endocrinologo Selye [72] delinea la risposta dello stress in tre fasi e si basa sull'azione di alcuni ormoni e sui loro effetti sul sistema nervoso simpatico e parasimpatico. Questa risposta allo stress parte con una prima fase di allarme, seguita dalla reazione di resistenza e termina con la fase di esaurimento, [72], [73]. Per controllare il sistema nervoso simpatico e parasimpatico, nel primo stadio, l'organismo rilascia degli ormoni della classe dei glucocorticoidi come il cortisolo e il cortisone che regolano il metabolismo e inibiscono il sistema immunitario. Il cortisolo regola ad esempio la conversione delle proteine in glucosio, garantendo un utilizzo efficiente delle risorse dell'organismo durante i momenti di tensione [72], [74], [75]. Vengono anche rilasciati gli ormoni della classe delle catecolammine come la dopamina e, da essa derivati, l'epinefrina, comunemente denominata adrenalina, e la norepinefrina, detta anche noreadrenalina. Lo scopo è quello di aumentare la prestazione del soggetto per far fronte alla difficoltà data dalla situazione di stress. Delle conseguenze fisiche di questa attivazione possono essere un rafforzamento della circolazione sanguigna con aumento del battito cardiaco e della pressione arteriosa, contrazione dei muscoli scheletrici, respirazione più profonda e rapida, data da un aumento dell'apporto di ossigeno [72], [74], [75]. Nella fase di resistenza il corpo si prepara ad affrontare la situazione di stress persistente tramite rilascio di ormoni glucocorticoidi che aumentano le riserve energetiche dell'organismo (glicogeno) e mantengono quelle dei lipidi e amminoacidi al fine di preservare il glucosio per il funzionamento del sistema nervoso. Il rilascio di

questi ormoni è innescato da delle reazioni a catena: secrezione, regolata dall'ipotalamo, dell'ormone CRH (ormone di rilascio della corticotropina), il quale stimola l'ipofisi a secernere l'ormone ACTH (corticotropina) che attiva la ghiandola surrenale alla produzione dei glucocorticoidi (come descritto nel capitolo 2.2.3). Infine nella fase di esaurimento alla risposta di stress si svolgono una serie di processi inversi rispetto a quelli della fase d'allarme: cessa la produzione delle catecolammine e dei glucocorticoidi, diminuisce la riserva energetica e si ripristinano le condizioni iniziali. Tuttavia, se lo stato di stress nella fase di resistenza è perdurato a lungo, l'individuo subisce un crollo fisico e psichico che porta ad affaticamento e malessere [74], [75].

1.2.2. Indicatori di stress

Il monitoraggio della salute umana con dei sistemi rapidi e non invasivi, utilizzando delle molecole segnale presenti nella saliva è di notevole interesse scientifico. Nel presente lavoro i *marker* biologici analizzati nella matrice biologica sono il cortisolo, cortisone, dopamina, epinefrina e norepinefrina.

Queste biomolecole sono molecole segnale (ormoni) prodotte dal sistema endocrino, che vengono trasportate in tutto il corpo tramite sistema circolatorio, producendo effetti su organi o tessuti bersaglio. Sono liberati dalle ghiandole surrenali, situate sopra i reni, formate da due porzioni che secernano ormoni differenti: quella esterna, corticale surrenale, che libera gli ormoni glucocorticoidi e quella centrale, midollare surrenale, che libera gli ormoni catecolammine [76].

Il cortisolo e il suo metabolita inattivo, il cortisone, fanno parte della classe degli ormoni glucocorticoidi, denominati così per il loro effetto sul metabolismo di carboidrati, la cui struttura chimica è riportata in Tabella 1, Sezione 1.1.1. Gli ormoni glucocorticoidi vengono anche definiti steroidei perché sono sintetizzati partendo dal cortisone, come precedentemente descritto per i pesci, Sezione 1.1.1. La sintesi del cortisolo avviene nella parte esterna delle due ghiandole surrenali (situate sopra i reni) chiamata corticale surrenale ed è stimolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrenale (HPA), che funge da collegamento tra sistema nervoso centrale e sistema endocrino. L'ipotalamo e l'ipofisi sono rispettivamente una zona dell'encefalo e una ghiandola localizzata alla base del cranio (Figura 2) [76]–[78].

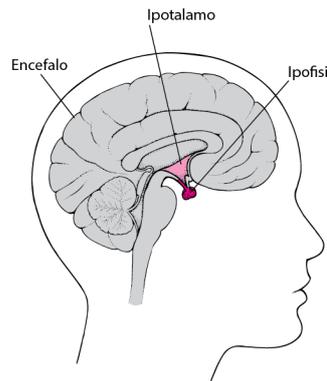


Figura 2: rappresentazione dell'ipotalamo e dell'ipofisi.

In risposta a fenomeni fisiologici e allo stress, la sintesi del cortisolo parte dal rilascio dell'ormone della corticotropina (CRH) dall'ipotalamo, il quale agisce sull'ipofisi liberando l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), che successivamente agisce sulla corteccia surrenale per stimolare la sintesi dei glucocorticoidi. L'ACTH aumenta l'attività della ghiandola surrenale stimolando la produzione di proteine necessarie per aumentare i livelli di colesterolo intracellulare, da cui parte la sintesi multienzimatica per la produzione di cortisolo. L'asse HPA è anche modulato, e di conseguenza la sintesi di cortisolo, dal ritmo circadiano, raggiungendo un picco di concentrazioni sieriche al mattino e più basso durante la notte [76], [77], [79]. I glucocorticoidi, per la loro natura lipofila attraversano le membrane cellulari e, una volta all'interno delle cellule dei vari tessuti, si legano ai loro recettori CR, i quali mediano le attività fisiologiche. Ne è un esempio la produzione di glucosio nel sangue a causa della presenza di cortisolo in circolazione, regolando così il processo di gluconeogenesi, per far fronte all'esigenza dell'organismo di energia a causa di una tensione esterna. L'80-90% del cortisolo in circolazione è legato alla globulina legante dei corticosteroidi (CBG, proteina di trasporto), solo il 5% è libero e bioattivo nel plasma e nel sangue. I livelli di cortisolo salivare sono correlati con quelli del cortisolo libero nel sangue, per questo la saliva è usata come metodo non invasivo per determinare questa molecola segnale [77], [79].

La disponibilità dei glucocorticoidi in circolazione è regolata da degli enzimi 11β -idrossisteroide deidrogenasi (11β -HSD) (Figura 3). L' 11β -HSD2 si trova nei tessuti bersaglio dei glucocorticoidi (ad esempio nelle ghiandole salivari) e funge da deidrogenasi convertendo il cortisolo nel suo metabolita inattivo cortisone.

Questa attività enzimatica permette di contrastare l'eccesso di cortisolo ed evitare disfunzioni dell'organismo. L'enzima 11 β -HSD1, viceversa, sfrutta le elevate concentrazioni di cortisone inattivo per convertirle in cortisolo attivo [78], [80].

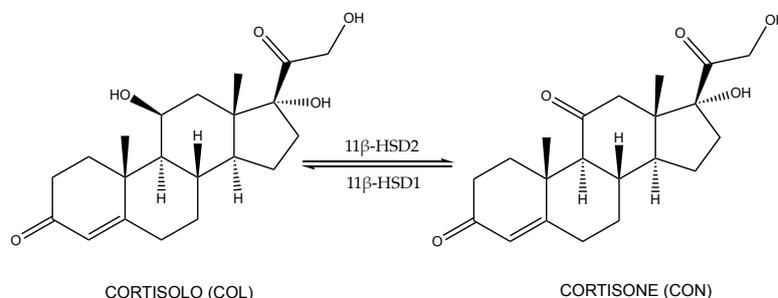
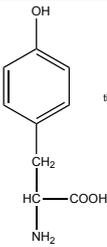
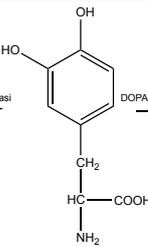
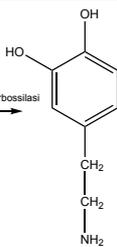
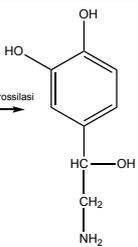
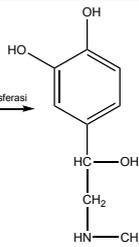


Figura 3: reazioni chimiche mediate dagli enzimi 11 β -idrossisteroide deidrogenasi (11 β -HSD).

Quando l'individuo è in uno stato di tensione reagisce attivando anche il sistema nervoso simpatico, una parte del sistema nervoso periferico (composta dai neuroni), attivando il sistema simpatico-adreno-midollare che stimola il corpo a reagire allo stato di emergenza liberando le catecolammine. A questa classe appartengono la dopamina, l'adrenalina e la noreadrenalina che sono ormoni di tipo amminoacidico (Tabella 3). A seguito dell'attivazione delle vie nervose del sistema simpatico, per uno stimolo stressogeno, le catecolammine sono liberate dalla parte midollare surrenale delle ghiandole surrenali e la loro sintesi deriva da una serie di reazioni enzimatiche a catena. Si parte dalla tirosina che viene prima idrossilata mediante la tirosina idrossilasi (ottenendo la biomolecola L-DOPA) e poi decarbossilata per ottenere la dopamina. Quest'ultima è il precursore dell'epinefrina e della norepinefrina oltre ad essere principalmente un neurotrasmettitore del sistema nervoso centrale (composto da encefalo e midollo spinale), con importanti ruoli nella regolazione fisiologia [81], [82]. Per opera della dopamina idrossilasi si ottiene la norepinefrina che viene poi metilata a epinefrina (adrenalina) per azione della metil-transferasi (Tabella 3). Le catecolammine agiscono tramite legami con dei recettori e partecipano alla risposta allo stress aumentando per esempio la concentrazione di glucosio per far fronte all'energia che l'organismo richiede, stimolano la respirazione, aumentano la pressione sanguigna e accelerano il battito cardiaco [81]. Epinefrina e norepinefrina agiscono sia come ormoni, rilasciati nella circolazione, sia come neurotrasmettitori e inducono una risposta fisiologica a una situazione di

emergenza. Le catecolammine sono state riscontrare nel sangue, dove vengono liberate, ma anche nella saliva, arrivando sia tramite il flusso sanguigno presente nelle gengive che tramite i nervi simpatici presenti nelle ghiandole salivari [83].

Tabella 3: catena di reazione delle catecolammine e loro abbreviazione, formula bruta e peso molecolare.

Catecolammine					
Catena di reazione					
	Tirosina	L-DOPA	Dopamina	Norepinefrina	Epinefrina
Abbreviazione	DOPA	NORE	EPI		
Formula bruta	$C_8H_{11}NO_2$	$C_8H_{11}NO_3$	$C_9H_{13}NO_3$		
Peso molecolare	153	169	183		

2. Metodo strumentale

Per la determinazione degli indicatori di stress in entrambe le matrici è stata utilizzata una tecnica analitica iperfusa accoppiando la cromatografia liquida ad alte prestazioni (*high performance liquid chromatography*, Ultimate 3000 HPLC) con la spettrometria di massa tandem con analizzatore a triplo quadrupolo (TSQ Altis™ Plus Triple Quadrupole Mass Spectrometer) e sorgente H-ESI (*heated electrospray ionization*).

La tecnica cromatografica ha l'obiettivo di separare gli analiti in esame, presenti in una miscela complessa (matrice), che tramite spettrometro di massa vengono frammentati e rivelati in base ai rapporti massa su carica (m/z) degli ioni generati.

2.1. Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è una tecnica analitica che ha l'obiettivo di separare composti chimici in miscele complesse e con la quale si possono eseguire analisi qualitative e quantitative. Il segnale analitico che si ottiene, in base al tipo di detector scelto, è un cromatogramma, caratterizzato da dei picchi in cui si ha il segnale in funzione del tempo di ritenzione, ovvero il tempo necessario a un analita a fuoriuscire dalla colonna. Durante l'eluizione si stabiliscono rapidi e continui equilibri di distribuzione degli analiti tra fase stazionaria (fase fissa) e mobile in base alla loro affinità con esse. L'analita che ha maggiore affinità con la fase mobile interagisce meno con la fase stazionaria ed eluisce a tempi di ritenzione più brevi, mentre gli analiti più trattenuti escono a tempi più lunghi. L'analisi quantitativa è legata al segnale analitico che è funzione della concentrazione. In questo lavoro è stato usato come metodo di quantificazione quello dello standard interno, che consiste nell'introdurre nella matrice di interesse un composto diverso dell'analita, ma che ha simili proprietà chimico-fisiche. In questo caso, il rapporto tra il segnale analitico dello standard e la sua concentrazione uguaglia il rapporto tra segnale analitico dell'analita e concentrazione dell'analita.

I due parametri principali per la valutazione dell'efficienza della colonna (misura della capacità del sistema cromatografico ad ottenere picchi stretti) sono il numero di piatti teorici N e l'altezza del piatto H , in relazione con la seguente equazione:

$$N = \frac{L}{H}$$

Dove L è la lunghezza della colonna. L'efficienza di una colonna aumenta con il numero di piatti teorici (N) e diminuisce con l'altezza dei piatti teorici (H). I piatti teorici sono delle porzioni di colonna su cui si formano gli equilibri di ripartizione degli analiti tra fase mobile e stazionaria, correlati direttamente al tempo di ritenzione. L'efficienza inoltre è regolata dall'equazione di van Deemter riportata di seguito:

$$H = \frac{B}{u} + C_s u + C_m u$$

Dove u è la velocità della fase mobile, B è il coefficiente di diffusione lineare, C_s e C_m sono i coefficienti di trasferimento di massa della fase stazionaria e mobile rispettivamente. Il coefficiente di trasferimento di massa della fase mobile (C_m) per le colonne impaccate è proporzionale al quadrato del diametro delle particelle del materiale di impaccamento. Questo comporta che più piccole sono le dimensioni delle particelle, minore è l'altezza del piatto teorico H e quindi si ha una maggiore efficienza della colonna.

Ad oggi le tecniche HPLC prevedono delle colonne con particelle impaccate di dimensioni intorno a 3-10 μm con pressioni con range da 70 a 400 bar che portano ad un aumento di efficienza della colonna e mantengono velocità di flusso da 0.5 a 5 mL min^{-1} .

Il sistema cromatografico usato Ultimate 3000 HPLC (*Thermo Scientific*), riportato in Figura 4, prevede un serbatoio per i solventi di fase mobile, sia organici che acquosi, con un sistema di degassamento. La fase mobile può essere composta da un solo solvente o una miscela di composizione costante che porta a una eluizione isocratica o a gradiente. Lo strumento prevede poi un

alloggiamento delle pompe, alloggiamento termostato per la colonna cromatografica e uno per l'autocampionatore. Tra l'iniettore e la colonna può essere inserita una pre-colonna, più corta con fase stazionaria simile alla colonna stessa che va a rimuovere impurezze contenute nel solvente e materiale particolato.



Figura 4: sistema cromatografico Ultimate 3000 HPLC (*Thermo Scientific*).

In base al meccanismo di separazione e al tipo di fase stazionaria si hanno diversi tipi di cromatografia liquida ad alta prestazione, la più usata è quella di ripartizione a fase legata in cui la fase stazionaria si lega chimicamente al supporto, composto da particelle impaccate di organosilossani. La cromatografia di ripartizione può essere di due tipi a seconda della natura degli analiti: a fase diretta, se l'analita è polare come la fase stazionaria mentre la fase mobile è apolare, e, viceversa quella a fase inversa in cui l'analita è apolare come la fase stazionaria e la fase mobile è polare [84], [85].

2.2. Spettrometro di massa

La spettrometria di massa è una tecnica analitica strumentale che permette di separare i frammenti precedentemente ionizzati dei componenti di una miscela in base al rapporto m/z . Il segnale analitico dipende dalla modalità con cui si

utilizza lo spettrometro. Per questo lavoro di tesi lo spettrometro è stato usato in modalità *Selected Reaction Monitoring (SRM)*, descritta nella Sezione 2.2.2.

Uno spettrometro di massa è composto da tre parti (Figura 5):

- sorgente, che ha la funzione di volatilizzare, frammentare e ionizzare gli analiti
- analizzatore, che ha la funzione di selezionare e distinguere i vari frammenti in funzione del loro rapporto m/z
- detector, che misura l'intensità del segnale

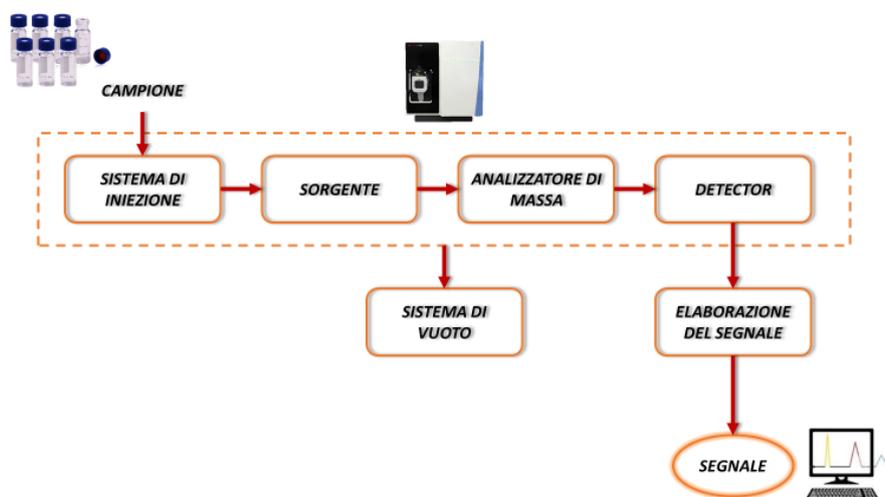


Figura 5: schema a blocchi di uno spettrometro di massa.

Le tre principali componenti dello spettrometro sono collegate tra di loro attraverso dei sistemi di trasferimento di ioni [84], [85]. In Figura 6 si riporta l'immagine dello spettrometro di massa a triplo quadrupolo TSQ Altis Plus (*Thermo Scientific*), utilizzato per lo studio.



Figura 6: spettrometro di massa a triplo quadrupolo TSQ Altis Plus (*Thermo Scientific*).

2.2.1. Sorgente

La sorgente ha il compito di desolvatare e ionizzare gli analiti in arrivo dal sistema cromatografico e funge anche da collegamento tra l'HPLC e lo spettrometro di massa. In questo lavoro è stata usata la sorgente H-ESI (*heated-electrospray ionization*) che permette di analizzare analiti facilmente ionizzabili (Figura 7A). La soluzione liquida proveniente dalla cromatografia viene trasportata attraverso un ago capillare verso una camera di ionizzazione in cui si applica un potenziale di carica uguale a quello degli analiti. Il potenziale respinge gli analiti verso il centro della camera, facendoli fuoriuscire sotto forma di cono, detto *cono di Taylor*. Questa goccia allungata che si crea viene nebulizzata da un gas tangente inerte riscaldato (solitamente azoto), producendo uno spray che diminuisce velocemente le dimensioni delle goccioline a causa della presenza del gas inerte e dell'effetto della temperatura. La desolvatazione porta a un incremento di densità di carica nelle gocce causando l'esplosione di Coulomb (raggiungimento del limite di Raylight), che permette di ottenere i singoli ioni. Questo processo è riportato in Figura 7B. Gli ioni prodotti vengono indirizzati verso l'analizzatore tramite un cono, con un foro centrale, a cui è applicato un potenziale opposto agli ioni, seguito da un tubo capillare (*ion transfer tube*) [84], [85].

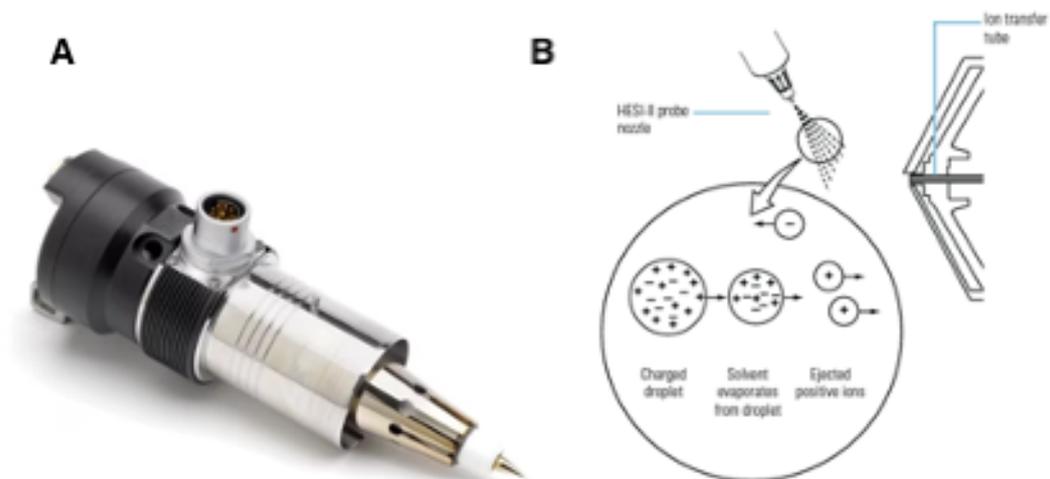


Figura 7: a sinistra, in Figura 5A, è raffigurata una sorgente H-ESI. A destra, in Figura 5B, è raffigurato il processo di ionizzazione, con polarità positiva.

2.2.2. Analizzatore

L'analizzatore utilizzato è un triplo quadrupolo TSQ Altis™ Plus Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Figura 8). Il primo e il terzo quadrupolo (Q1 e Q3) sono analizzatori quadrupolari che permettono di selezionare particolari ioni in base ai potenziali che si applicano nelle 4 barre che li costituiscono. Invece, il quadrupolo centrale (Q2), funziona come cella di collisione e permette di andare a frammentare lo ione precursore selezionato dal Q1 usando Argon. La cella di collisione non è lineare, ma ha un certo raggio di curvatura andando a favorire la riduzione di neutri e quindi abbattere il rumore di fondo. Tra l'ion transfer tube e il Q1 è posizionato un quadrupolo Q0 che ha la funzione di focalizzare gli ioni generati dalla sorgente verso il Q1. Per permettere il passaggio dei frammenti, tra i quadrupoli, sono presenti delle lenti focalizzatrici, su cui si applicano dei potenziali opposti alla carica degli ioni.

Nel presente lavoro l'analizzatore è stato usato in modalità SRM in cui il Q1 lavora in modalità *Single Ion Monitoring* (SIM) andando a selezionare lo ione precursore con un certo rapporto m/z , il Q2 agisce come cella di collisione andando a frammentare lo ione e ottenendo diversi frammenti figli, e il Q3 è in modalità SIM e seleziona uno o più singoli frammenti. Questa modalità è la più usata per analisi quantitative data l'elevata selettività [84].

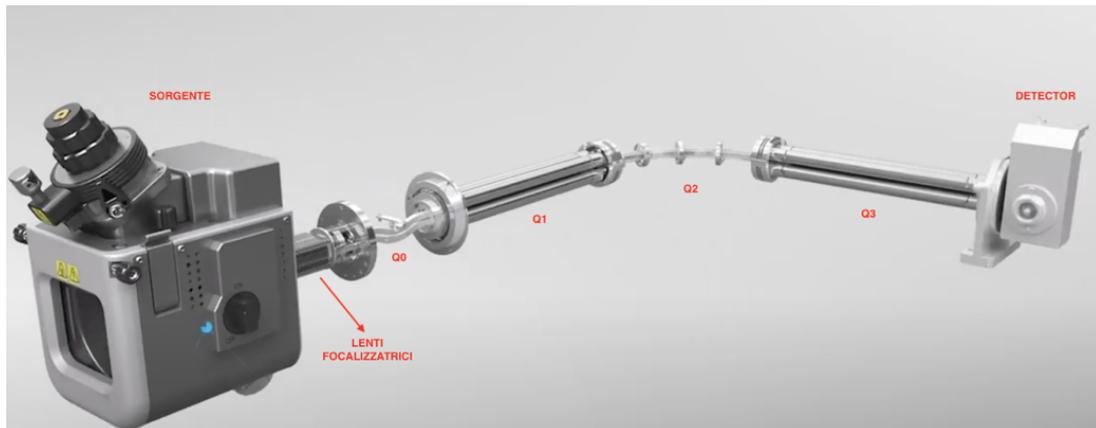


Figura 8: rappresentazione delle componenti del triplo quadrupolo *TSQ Altis™ Plus Triple Quadrupole Mass Spectrometer*.

2.2.3. Detector

I frammenti selezionati dal Q3 vengono convogliati tramite lenti focalizzatrici verso il detector, composto da un moltiplicatore di elettroni a dinodo continuo. Questo sistema ha una forma cilindrica e quando gli ioni collidono con essa liberano elettroni che vengono moltiplicati nei successivi urti con le pareti generando un gradiente di potenziale. Il segnale elettrico viene poi convertito in segnale digitale che fornisce il numero di ioni in relazione alla loro massa.

3. Campionamento

3.1. Specie *Aphanius fasciatus*

Per il presente lavoro di tesi sono state campionate le scaglie del pesce teleosteo *Aphanius fasciatus*. Questo tipo di pesce appartiene alla specie eurialina e vive in acque non profonde e con scarsa corrente come acque di laguna, salmastre, stagni collegati con il mare o canali ricchi di vegetazione. Si trova principalmente nel mar Mediterraneo e in Italia nella regione dell'alto Adriatico, nell'alto e medio Tirreno e in Sicilia, Sardegna e Puglia [86]. Si trova, nello specifico, anche nelle barene della laguna di Venezia, delle distese sabbiose ricoperte da vegetazione, che emergono dall'acqua periodicamente, seguendo il rimo delle maree. Questo tipo di pesce ha dimensioni di meno di 6 cm e una durata di vita di circa 7 anni. I due sessi si distinguono per dimensioni e colore, con femmine più grandi e meno colorate dei maschi [87] (Figura 9).



Figura 9: immagine di un maschio e una femmina dell'*Aphanius fasciatus*.

L'*A. fasciatus* è una specie molto versatile che resiste e si adatta ad ambienti ad elevata escursione termica (4-40°C), con notevoli variazioni di salinità (10-80 psu) e bassa concentrazione di ossigeno [88]. Nonostante la sua resistenza a condizioni chimico-fisiche severe dell'ecosistema in cui vive è comunque una specie vulnerabile [89]. Per tale motivo è stato introdotto, assieme ad altre 60 specie, nell'allegato II della Direttiva Habitat 92/43/CEE, relativo alla conservazione degli habitat naturali e della loro flora e fauna, con lo scopo di salvaguardare la biodiversità, negli stati membri dell'Unione Europea. Nonostante la forte resistenza, la conservazione di tale specie è considerata inadeguata, anche se non a rischio estinzione [90], [91]. Questa specie di pesce tende ad avere un flusso di migrazione molto basso che avviene solo a seguito di stress ambientali drastici

[92]; ogni minima perturbazione, quindi, può causare un mutamento genetico oltre ad uno stato di stress della specie. Per questo motivo, l'*A. fasciatus* risulta essere di interesse per la ricerca scientifica sul monitoraggio ambientale [86], [93].

3.1.1. Campionamento dei pesci *Aphanius Fasciatus*

I pesci *Aphanius Fasciatus* sono stati campionati presso il sito di Forte Marghera, zona adiacente alla laguna di Venezia (Figura 10). La laguna di Venezia è stata introdotta, come sito lagunare, insieme ad altri ambienti, nell'allegato I della Direttiva 92/43/CEE, per la salvaguardia e conservazione di questi habitat e desta attenzione il suo stato assieme a quello della flora e la fauna che ospita. La laguna è considerata di "interesse prioritario" per l'alto rischio di scomparsa di tale ecosistema [90]. Questo ambiente è minacciato dallo sviluppo dell'edilizia che riduce l'habitat naturale di animali e piante con nuove infrastrutture, ma anche dall'inquinamento delle acque dei fiumi che confluiscono in laguna, ricche sia di inquinanti che di nutrienti che alterano gli equilibri dell'ecosistema, deteriorando la qualità dell'acqua [94].

Il sito di campionamento a Forte Marghera, composto da diversi canali, collega la laguna di Venezia con il canale artificiale Canal Salso, scavato nel XIV secolo per permettere gli scambi commerciali dal porto di S. Giuliano al centro di Mestre.

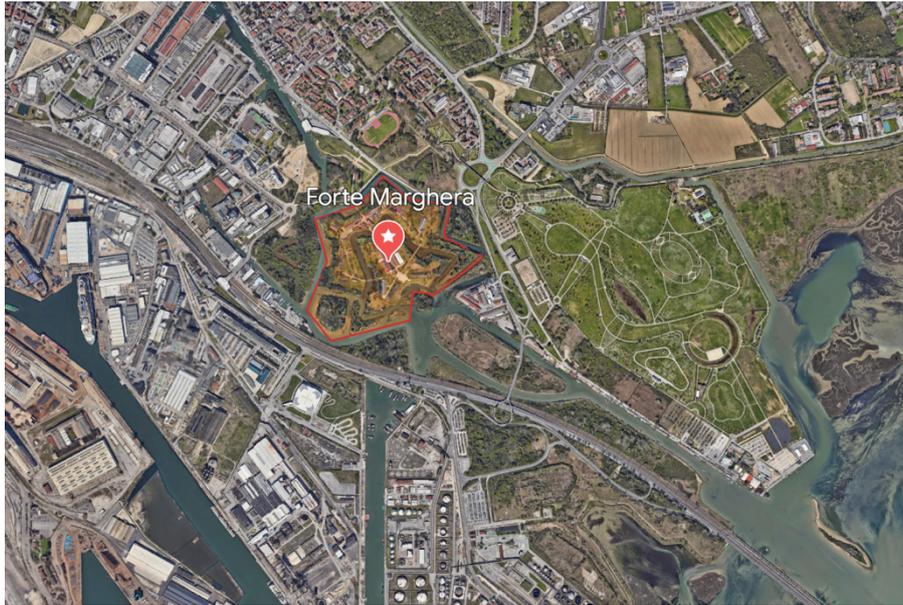


Figura 10: sito di campionamento a Forte Marghera.

I pesci *Aphanius fasciatus* sono stati catturati utilizzando una rete rettangolare (25x25x45 cm con maglia di 5 mm) con telaio metallico, mediante la tecnica di pesca a strascico. La rete usata è del tipo *fyke*, della quale si riporta una foto in Figura 11, composta da due cilindri verso l'interno con un ingresso circolare di diametro 65 mm in entrambi i lati.

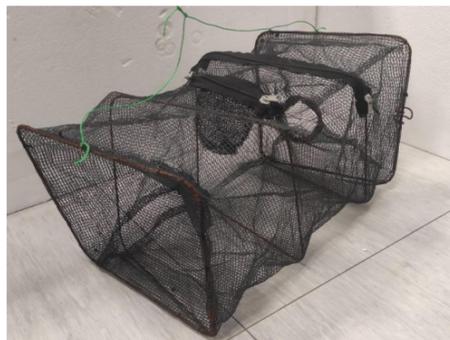


Figura 11: immagine della rete *fyke*, utilizzata per catturare i pesce *A. fasciatus*.

Per attrarre i pesci è stata introdotta nella trappola una borsa di rete con del mangime composto da alghe, cereali, soia, spirulina e verdure (*Algae wafer mini, Prodac*). La pesca è stata prolungata per tre ore, nelle ore centrali del giorno (10:00-13:00). Alcuni pesci raccolti sono stati inseriti in degli acquari per un anno, nel laboratorio di zoologia del Dipartimento di Scienze Ambientale dell'università di Ca' Foscari. Nel presente lavoro di tesi sono stati presi in esame questi pesci e

quelli appena catturati, per confrontare le diverse condizioni di vita mediante gli indicatori di stress selezionati. Per questo studio meno dello 0.5% dei pesci è stato neutralizzato.

3.2. Campionamento della saliva

L'applicabilità degli indicatori di stress è stata testata anche in campioni di saliva dei donatori di sangue AVIS che volontariamente hanno aderito a questo progetto, appartenenti a diverse sedi della provincia di Venezia e Treviso, da giugno ad agosto. Nella provincia di Venezia sono state coinvolte in ordine le sedi di Marcon, San Stino di Livenza e Meolo, mentre nella provincia di Treviso quelle nei comuni di Mogliano, Villorba e Roncade.

La saliva è stata raccolta tramite l'utilizzo di salviette (Sarstedt, Nümbrecht, Germania)(Figura 12). Queste sono composte da un contenitore sterilizzato per centrifuga con all'interno un secondo contenitore sospeso in cui è collocato un particolare tampone cilindrico sintetico.

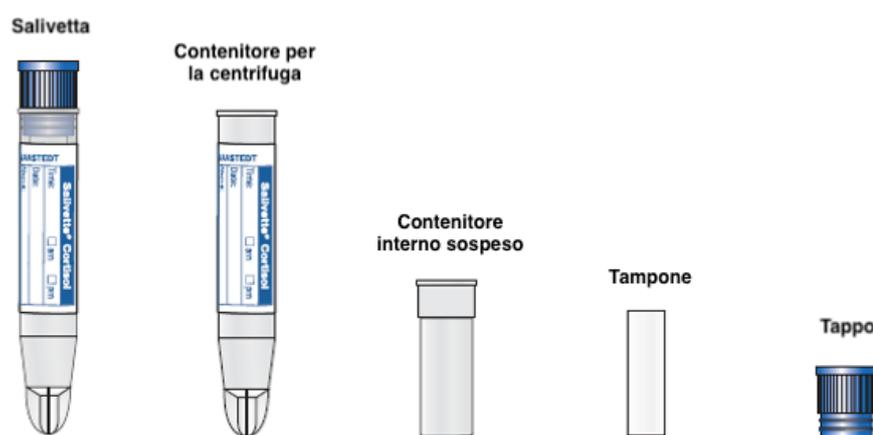


Figura 12: immagine della composizione delle salviette (Sarstedt, Nümbrecht, Germania).

La procedura prevede che il tappo venga aperto dal donatore e che il tampone venga inserito nella cavità orale senza usare le mani. Per un tempo di due minuti viene trattenuto in bocca e al termine viene riposto nel contenitore etichettato e inserito in una borsa frigo. Ogni salvietta preleva circa 1 mL di saliva. Alla fine di ciascuna giornata di campionamento, i campioni sono stati trasportati a freddo

al Campus Scientifico dell'Università Ca' Foscari di Venezia e conservati in un congelatore a -80°C. Studi pregressi hanno identificato una degradazione del 9% ogni mese del cortisolo se tenuto a temperatura ambiente, mentre a 5°C è stabile solo per circa tre mesi [70]. Dopo lo scongelamento, la salivette è stata inserita in una centrifuga per due minuti a 1000 rpm, in modo da estrarre la saliva all'interno del contenitore più grande. Il tampone e il suo supporto sono stati poi rimossi. Ciascun donatore ha eseguito tre test salivari in tre momenti diversi della donazione:

1. All'arrivo del donatore presso la sede AVIS, durante la compilazione del questionario di idoneità
2. Prima della donazione di sangue, dopo aver fatto il colloquio con il medico di turno, il quale conferma l'idoneità per la donazione a seguito di alcuni screening (pressione sanguigna, misurazione del livello di emoglobina e della frequenza cardiaca) e della valutazione del questionario precedentemente compilato
3. Al termine della donazione, prima del momento di ristoro in cui i volontari offrono la colazione

Sono stati scelti questi tre momenti differenti per verificare la variazione di tensione fisica durante tutto l'arco della donazione tenendo in considerazione che il livello degli indicatori di stress analizzati variano all'interno della matrice saliva solo 15 minuti dopo dell'evento destabilizzante [94], [95]. Il primo prelievo salivare rappresenta lo stato di stress del momento di quiete prima dell'arrivo nelle sedi, il secondo campione descrive la tensione data dagli attimi prima del colloquio con il medico e il terzo fornisce informazioni attribuibili all'atto della donazione.

Ad ogni donatore è stato attribuito un numero progressivo in base all'arrivo. Sono state inoltre recuperate le seguenti informazioni: età, sesso e da quanto il donatore ha iniziato a donare (più di otto anni, meno di otto anni e prima donazione).

4. Validazione del metodo analitico – aspetti teorici

Per svolgere uno studio analitico, una volta definito l'obiettivo dell'analisi e le caratteristiche chimico-fisiche degli analiti da analizzare, si stabilisce la procedura analitica, ovvero l'insieme del metodo strumentale e della preanalitica. Il primo consiste nella scelta e ottimizzazione della tecnica analitica, la seconda invece è l'insieme delle operazioni necessarie per preparare il campione all'analisi. Una volta scelta la metodologia si definiscono i parametri migliori della tecnica analitica e la preparazione più idonea del campione.

Per verificare e confermare che la prestazione del metodo sia adeguata allo studio desiderato, è necessario validarlo, andando a calcolare alcuni parametri specifici.

4.1. Spettrometria di massa

In questa fase si verifica che le molecole di interesse vengano individuate dallo spettrometro di massa, una volta fuoriuscite dal cromatografo. Si fa ciò mediante iniezione a infusione diretta con un flusso $10 \mu\text{L min}^{-1}$, di una soluzione acquosa contenente tutti gli standard degli analiti e gli analiti marcati isotopicamente, a una concentrazione di $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Tale soluzione viene iniettata direttamente nella sorgente H-ESI.

Inizialmente, per ciascun analita della miscela, si verifica la modalità di ionizzazione, positiva o negativa; dopodiché si lavora in modalità *full scan* in Q1 per individuare lo ione precursore che si forma per protonazione o deprotonazione. Individuato lo ione precursore si lavora in modalità SIM in Q1, per selezionare gli ioni molecolari e verificare la stabilità del segnale. Selezionata la massa esatta dello ione precursore, esso viene frammentato in Q2, con il Q3 impostato in modalità *full scan*. In questo modo si individuano i frammenti più intensi, ottimizzando i parametri di radiofrequenza delle lenti focalizzatrici e la *collision energy*, con l'obiettivo di aumentare l'intensità del segnale in ogni singolo frammento.

4.2. Cromatografia

Lo sviluppo del metodo cromatografico prevede la scelta del tipo di colonna cromatografica, della fase mobile e la velocità di flusso tali che permettano di avere una buona separazione dei picchi degli analiti. L'ottimizzazione si effettua attraverso una serie di test cromatografici utilizzando una miscela acquosa dei composti target.

Una volta ottimizzati i parametri di massa e cromatografici, si procede con l'ottimizzazione dei parametri di sorgente (potenziale di ionizzazione, temperatura di desolvatazione e di *ion transfer tube*, flusso di gas ausiliari) del filtro di massa.

4.3. Preanalitica

La preanalitica consiste in una serie di operazioni che trasformano il campione in una matrice idonea all'analisi strumentale. La fase principale della preanalitica è l'estrazione del campione, che consiste nel passaggio degli analiti dalla matrice di partenza a una più idonea all'analisi; si dividono in estrazione liquida/liquida o liquida/solida in modalità continua o discontinua. Nello specifico del presente studio si svolge un'estrazione liquido/solida discontinua in acqua ultra pura, mediante bagno a ultrasuoni, per estrarre gli analiti dalle scaglie dei pesci. Nel caso la matrice sia già idonea per l'analisi, si può procedere per iniezione diretta, purificazione o diluizione, come nel caso dei campioni di saliva.

4.4. Validazione del metodo analitico

Lo scopo della validazione di un metodo analitico è quello di confermare e dimostrare l'adeguatezza della procedura sviluppata per le analisi di interesse. I parametri per la validazione di un metodo sono: la selettività, l'intervallo di linearità, la sensibilità, il limite di rilevabilità e di quantificazione strumentale (rispettivamente LOD e LOQ), il limite di rilevabilità e quantificazione procedurale (rispettivamente MDL e MQL), la precisione della misura, l'accuratezza e la robustezza. In questo studio sono stati valutati:

- L'intervallo di linearità: la capacità del metodo di fornire segnali direttamente proporzionali alla concentrazione degli analiti, con un andamento quindi di tipo lineare. La linearità è confermata dal calcolo del coefficiente di correlazione R^2 della retta di calibrazione, costruita analizzando con soluzioni standard (contenenti il solvente, gli standard marcati e standard nativi) a concentrazioni note e crescenti. Sono accettati valori di R^2 non inferiori a 0,99.
- Limite di rilevabilità strumentale LOD (*limit of detection*) e il limite di quantificazione LOQ (*limit of quantification*): rispettivamente la concentrazione più bassa di analita che lo strumento può rilevare e quantificare all'interno del campione. In questo lavoro di tesi il LOD è stato calcolato come la concentrazione alla quale il rapporto segnale/rumore è 3, mentre per il LOQ tale rapporto è 10.
- Limite di rilevabilità procedurale MDL (*method detection limit*) e limite di quantificazione procedurale MQL (*method quantification limit*): rispettivamente equivalgono alla concentrazione più bassa di analita rilevabile sperimentalmente e la concentrazione più bassa di analita quantificabile sperimentalmente. Il MDL è 3 volte la deviazione standard del segnale del bianco procedurale, mentre il MQL è 10 volte tale deviazione standard.
- Precisione della misura: esprime quanto si avvicinano tra di loro i valori di prove indipendenti e si definisce attraverso la ripetibilità e la riproducibilità. La prima è la concordanza tra misure indipendenti eseguite con la medesima procedura. Questa può essere espressa in termini di coefficiente di variazione percentuale (CV%) tra la deviazione standard (σ) e la media dei valori indipendenti (\bar{x}). Deve essere inferiore del 10%.

$$CV\% = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100$$

La seconda invece è la concordanza tra misure eseguite con le stesse condizioni e modalità, ma da operatori diversi.

- Accuratezza: indica la concordanza tra il valore medio della concentrazione di analiti e il valore di riferimento noto. Si misura con il calcolo dell'errore relativo percentuale, tra il valore ottenuto x e il valore vero μ .

$$\text{Err}\% = \frac{x - \mu}{\mu} \cdot 100$$

Per lo svolgimento di prove di validazione si utilizza di norma un materiale certificato relativo alla matrice campionata. Tuttavia, per la validazione del metodo sugli indicatori di stress nei pesci *A. fasciatus*, non esistendo in commercio scaglie pure, prive degli analiti di interesse, sono state usate le scaglie dei pesci reali. La validazione è stata svolta inserendo concentrazioni note di DHEAS, analita non presente in questa specie di pesci [96] eseguendo gli stessi trattamenti.

Per la validazione relativa agli indicatori di stress nella saliva, si è usata la saliva sintetica certificata, alla quale è stata inserita una soluzione standard degli analiti nativi e marcati.

4.5. Quantificazione

Il metodo di quantificazione utilizzato nel presente lavoro è quello dello standard interno, una molecola con caratteristiche chimico-fisiche simili agli analiti di interesse, ma marcato isotopicamente o deuterato. Si aggiunge dunque al campione una soluzione degli standard marcati a concentrazione nota, prima della procedura di preanalitica, permettendo di eliminare errori compiuti dall'operatore ed eventuali fluttuazioni del segnale strumentale.

La quantificazione sfrutta la relazione lineare tra il rapporto tra la concentrazione dell'analita (C_{analita}) e dello standard interno ($C_{\text{std.int}}$) e il rapporto tra l'area del picco dell'analita (A_{analita}) e dello standard ($A_{\text{std.int}}$). L'equazione risultante fornisce il fattore di risposta (FR). L'FR viene calcolato preparando una soluzione contenente tutti gli standard interni marcati e tutti gli analiti a

concentrazione nota. La soluzione viene analizzata periodicamente durante l'analisi dei campioni, in modo da monitorare costantemente il valore di FR.

$$FR = \frac{A_{analita}}{A_{std.int}} \cdot \frac{C_{std.int}}{C_{analita}}$$

5. Messa a punto dei metodi

5.1. Standard di riferimento e materiali

Nel presente lavoro di tesi sono state preparate delle soluzioni di standard, a concentrazioni note e ad alto grado di purezza, in acqua ultra pura. Queste sono state conservate in un congelatore a temperatura di -20°C . In Tabella 4 sono riportati gli standard utilizzati per entrambi gli studi.

Tabella 4: standard utilizzati con i relativi fornitori e n° CAS. Nella tabella sono riportati in rosso gli standard utilizzati in entrambi i metodi, in verde solo per le scaglie dei pesci, in nero solo per la saliva.

STANDARD	FORNITORE	N° CAS
CORTISOLO	Sigma-Aldrich®	50-23-7
CORTISOLO $^{13}\text{C}_3$	Sigma-Aldrich®	1996649-39-8
CORTISONE	Sigma-Aldrich®	53-06-5
DHEAS	Sigma-Aldrich®	1099-87-2
EPINEFRINA	Sigma-Aldrich®	329-63-5
EPINEFRINA-d6	Sigma-Aldrich®	1219803-77-6
DOPAMINA	Sigma-Aldrich®	62-31-7
DOPAMINA-d4	Sigma-Aldrich®	203633-19-6
NOREPINEFRINA	Sigma-Aldrich®	492-41-1

Tutti i materiali utilizzati sono stati precedentemente decontaminati con metanolo ultra puro (VWE Chemicals, Radnor, PA, USA). I tubi da centrifuga in plastica usati per la pesatura delle scaglie sono stati decontaminati tramite un bagno ad ultra suoni (Ceia CP104) per un tempo di 30 minuti.

Di seguito sono riportati tutti i solventi utilizzati per questo lavoro di tesi:

- acido acetico (CH_3COOH) (Fluka)
- acqua ultra pura (18.2 M Ω , 1ppb TOC) prodotta usando il sistema di purificazione *Purelab Ultra System* (Elga®, High-Wycombe, UK).
- Ammoniaca (NH_3) (25%) (LiChropur®)
- metanolo ultra puro (CH_3OH) (VWE Chemicals, Radnor, PA, USA)

5.2. Sviluppo del metodo strumentale

Nel presente progetto è stato sviluppato il metodo strumentale per l'analisi degli indicatori di stress per i campioni di saliva, mentre per i campioni di pesci è stato usato un metodo strumentale già ottimizzato in passato [96]. Le soluzioni contenenti gli analiti di interesse sono state preparate per diluizione partendo da composti solidi puri (CON, DHEAS, EPI, NORE e DOPA) o liquidi (COL, cortisolo $^{13}\text{C}^3$, epinefrina-d6, dopamina-d4).

5.2.1. Metodo spettrometria di massa

Lo sviluppo del metodo di massa è stato eseguito mediante infusione diretta delle soluzioni standard a concentrazione di 1 mg L⁻¹. In un primo momento si sceglie la polarità della sorgente H-ESI, successivamente si individua lo ione precursore, per ciascun analita, impostando il Q1 in modalità *full scan*. Come esempio si riportano solo i dati dei singoli passaggi dell'epinefrina. In Figura 13 si ha lo spettro di acquisizione *full scan*, da m/z 134 a m/z 234, identificando lo ione precursore $[\text{M}+\text{H}]^+$ a m/z 184, che coincide con lo ione molecolare carico positivamente.

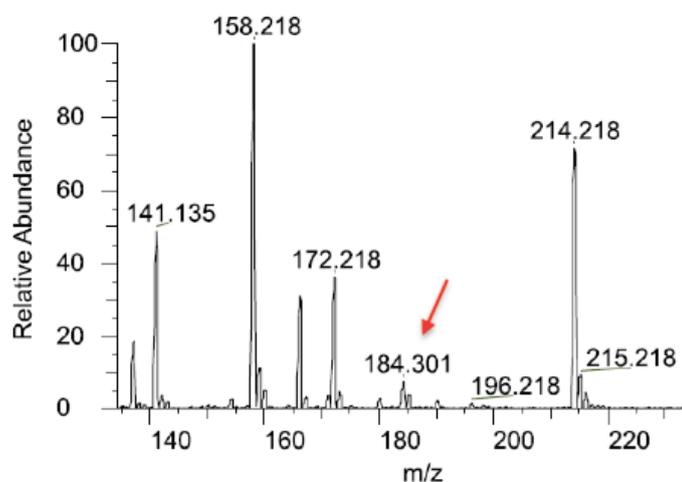


Figura 13: spettro di acquisizione *full scan* dell'epinefrina.

Per lo ione molecolare viene ottimizzato il potenziale delle lenti focalizzatrici per aumentarne l'intensità del segnale. Il valore ottimale delle lenti per l'epinefrina è di 30 V (Figura 14).

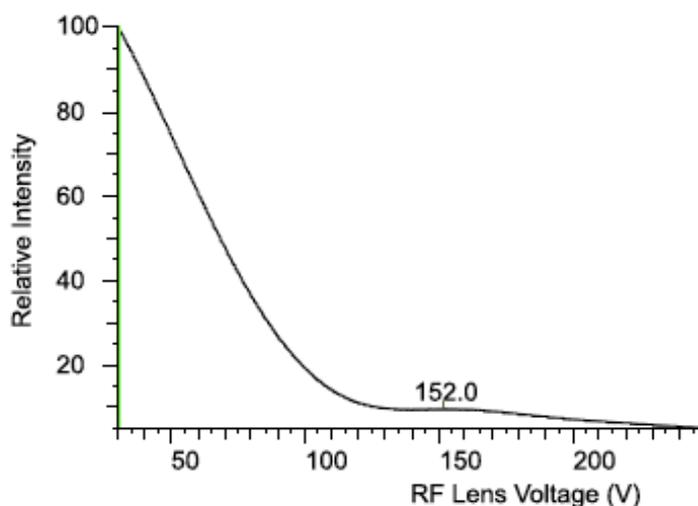


Figura 14: grafico del potenziale delle lenti focalizzatrici dell'epinefrina.

Una volta individuato lo ione precursore si verifica che il segnale sia stabile e mediante la modalità *product ion scan* si individuano i frammenti figli più abbondanti. In Figura 15 si riporta lo spettro ottenuto, evidenziando il frammento più abbondante a m/z 166 e a seguire m/z 107 e m/z 135.

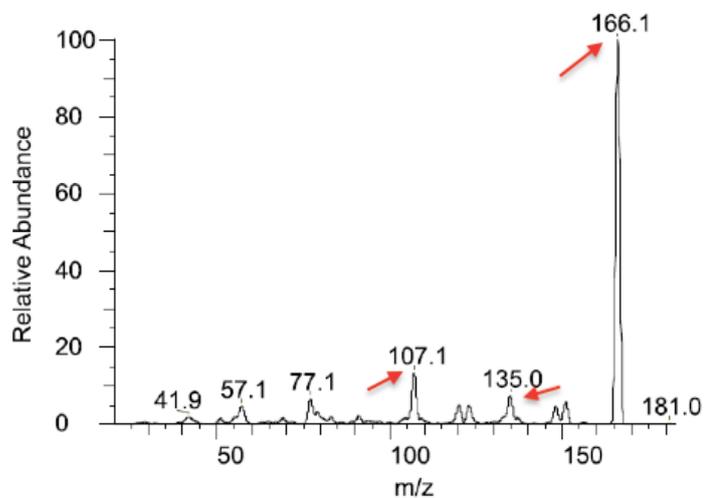


Figura 15: spettro di acquisizione *product ion scan* dell'epinefrina.

Per ciascun frammento si ottimizza il valore dell'energia di collisione. Queste sono riportate in Figura 16 e si ha per il frammento più abbondante un valore di 10 V e a seguire 22 V e 40 V.

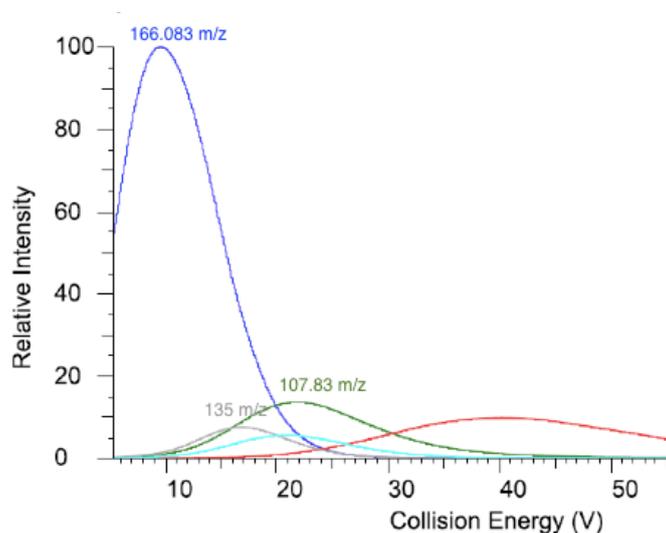


Figura 16: grafico dell'energia di collisione dell'epinefrina.

5.2.2. Metodo cromatografico

Per la validazione del metodo cromatografico è stata preparata una soluzione contenente tutti gli standard, sia nativi che marcati, ad una concentrazione media di $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

La colonna cromatografica scelta per la separazione degli analiti è una Agilent Eclipse XDB-C18 da 4.6 ID x 150 mm. La fase stazionaria di questa colonna è costituita da un *monolayer* di dimetil-n-octadecilsilano supportato su uno strato poroso di silice di area superficiale $180 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e una dimensione dei pori di 80 \AA . Per arrivare a questa scelta sono state escluse le colonne con catene idrofobiche corte C4, poiché gli analiti non venivano trattenuti dalla fase stazionaria con conseguenti tempi di ritenzione al di sotto dei 3 minuti. Sono state testate anche colonne con catene C8, come riscontrato in letteratura [97], [98], ma la migliore separazione è stata ottenuta con colonne C18 [81], [99]. Il metodo cromatografico prevede un flusso di $0.350 \text{ \mu L min}^{-1}$ con fase A composta da una soluzione acquosa acidificata con acido acetico allo 0.1% mentre la fase B è composta da metanolo. È stato utilizzato anche un reattivo post-colonna, costituito da una miscela di metanolo e ammoniaca allo 0.7%. La corsa cromatografica scelta ha una durata di 25 min e il volume di iniezione è di 60 \mu L . Il gradiente delle fasi mobili A e B, riportato in Figura 17, consiste in: gradiente lineare 0-5.5 min 10% B, 5.5-12 min da 10% B a 100% B, 12-19.5 min 100% B, a 19.5 min equilibratura a 10% B fino a 26 min.



Figura 17: rappresentazione del gradiente delle fasi mobili A e B della corsa cromatografica.

Mentre fino a 13.5 minuti l'acido acetico presente in fase A aiuta la ionizzazione positiva, da 13.5 min a 17.5 min, nella fase in cui il gradiente è al 100% di metanolo, il reattivo post colonna viene indirizzato in sorgente, in modo da aiutare la ionizzazione negativa. È importante che non ci siano tracce di acido acetico residue durante le analisi al tempo di utilizzo del reattivo post colonna in modo tale che non si verifichi la formazione di formiato d'ammonio.

5.2.3. Ottimizzazione della sorgente ESI

Con lo scopo di aumentare l'intensità del segnale analitico, una volta scelto il tipo di colonna, le fasi mobili e le condizioni di eluizioni, si svolge l'ottimizzazione dei parametri della sorgente:

- potenziale di ionizzazione positivo (PI) e negativo (NI) della sorgente
- pressione dei due gas ausiliari, *sheath gas* e *aux gas*
- temperatura del *ion transfer tube* e della vaporizzazione

In Tabella 5 si riassumono i parametri della sorgente e le condizioni della corsa cromatografica selezionati.

Tabella 5: parametri della corsa cromatografica e della sorgente selezionati.

Corsa cromatografica		Sorgente	
Tempo (min)	B%	PI (V)	2600
0	10	NI (V)	-2700
5.5	10	<i>Sheath gas (Arb)</i>	55
12	100	<i>Aux Gas (Arb)</i>	8
19.5	100	<i>Ion transfer tube Temp (°C)</i>	320
25	10	<i>Vaporizer Temp (°C)</i>	400
Volume di iniezione (μL)	60		
Flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)	0.350		

In Figura 18, invece, è raffigurato il cromatogramma finale. Si nota un doppio picco del cortisolo dato dalla formazione di cortisone in sorgente. Gli analiti eluiti fino al tempo di 5 minuti sono ionizzati positivamente, mentre cortisone, cortisolo e cortisolo marcato sono ionizzati negativamente.

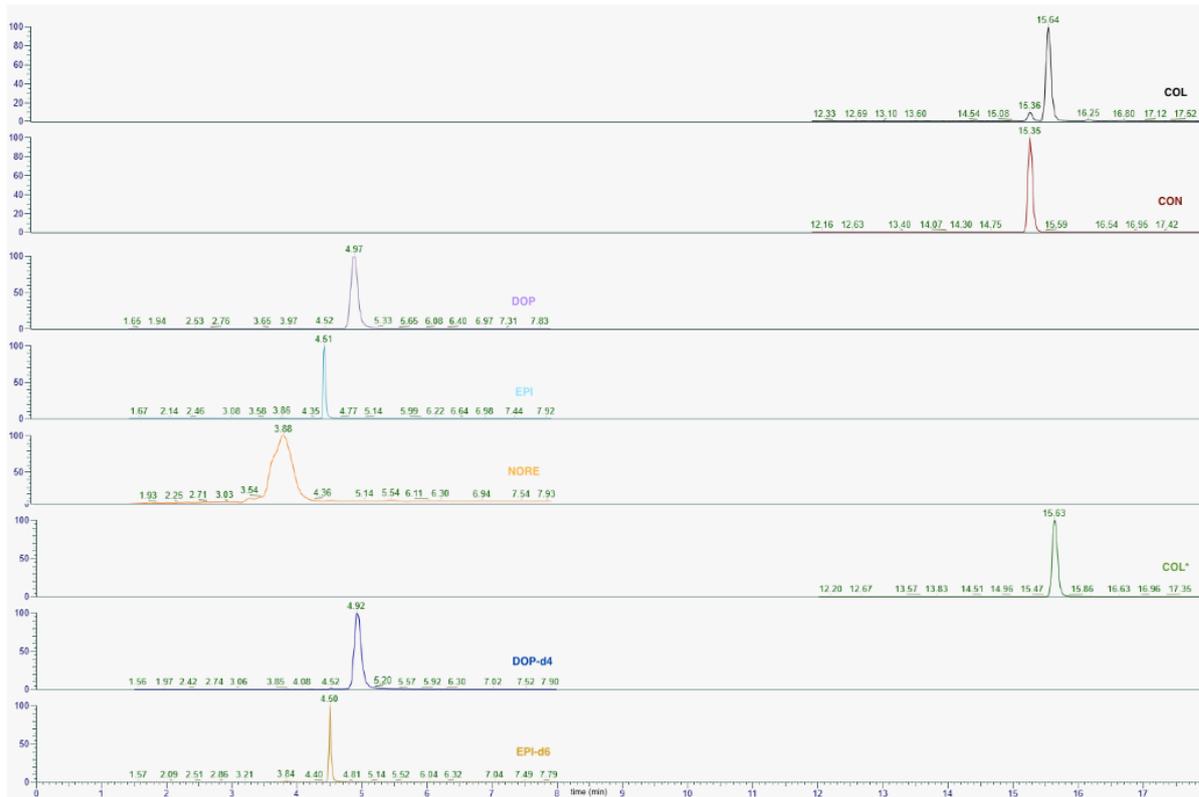


Figura 18: cromatogramma finale ottenuto con i tempi di ritenzione di ciascun analita e degli standard interni.

5.3. Risposta strumentale

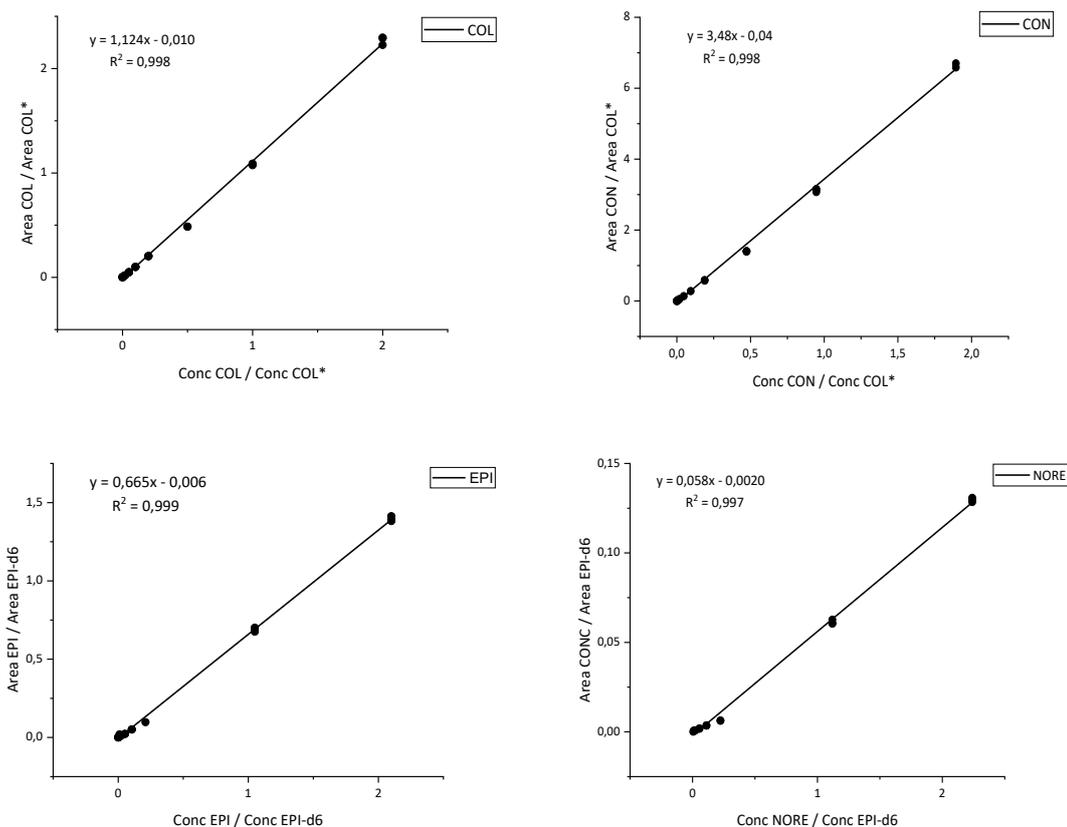
La risposta strumentale è stata verificata attraverso la linearità della risposta, precisione, LOD e LOQ. La linearità della risposta è stata effettuata preparando delle soluzioni standard di nativi con un range di concentrazione da 0.002 ng L⁻¹ a 20 ng L⁻¹, con concentrazione di standard interno sempre costante a 10 µg L⁻¹. Per valutare la precisione sono state eseguite tre analisi per ciascuna soluzione. Le procedure strumentali appena descritte sono state valutate anche per la determinazione di indicatori di stress nei pesci *Aphanius fasciatus* da [96]. In Tabella 6 sono riportate le assegnazioni analita-standard interno.

Tabella 6: analiti e rispettivi standard interni marcati.

Analita	Standard interno marcato
COL	Cortisolo ¹³ C ₃ (COL*)

CON	Cortisolo ¹³ C ₃ (COL*)
EPI	EPI-d6
NORE	EPI-d6
DOPA	DOPA-d4

Per ciascun analita si esegue la retta di calibrazione, la quale riporta il rapporto dell'area degli analiti con quella dei marcati in funzione del rapporto della concentrazione degli analiti con quella dei marcati. Il range di linearità è stato testato da una concentrazione di circa 0.5 ng L⁻¹ fino a 20 µg L⁻¹. Gli standard interni sono stati utilizzati ad una concentrazione costante di 10 µg L⁻¹. Le aree sono state ricavate mediante l'integrazione con il software *Thermo TraceFinder General LC*. In Figura 19 si riportano le rette di taratura ottenute, con la rispettiva equazione e il parametro R².



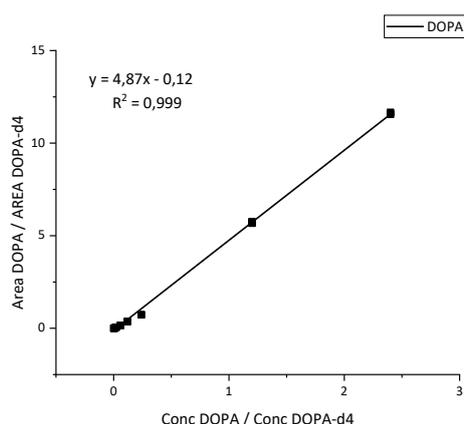


Figura 19: rette di taratura ottenute per ciascun analita con la rispettiva equazione e il parametro R^2 .

In Tabella 7 si riportano i limiti di rivelabilità e quantificazione ottenuti per ciascun analita per la validazione strumentale del metodo della saliva.

Tabella 7: valori di LOD e LOQ per ciascun analita e le rispettive concentrazioni a cui sono stati calcolati.

	Concentrazione (ng L ⁻¹)	LOD (ng L ⁻¹)	LOQ (ng L ⁻¹)
COL	2	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2
CON	2	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2
DOPA	20	7 ± 1	23 ± 5
EPI	100	13.1 ± 0.5	44 ± 2
NORE	50	21 ± 1	71 ± 4

Il LOD e il LOQ riferiti al cortisolo e al cortisone ottenuti con il presente metodo strumentale sono più bassi rispetto a quelli riscontrati in letteratura utilizzando sempre la tecnica ifenata HPLC-MS/MS (con sorgente ESI). Per il cortisolo sono stati ottenuti valori di LOD e LOQ rispettivamente di 100 ng L⁻¹ e 500 ng L⁻¹, mentre per il cortisone di 500 ng L⁻¹ e 1 µg L⁻¹ [100]. In letteratura non sono presenti studi dell'epinefrina, della norepinefrina e della dopamina nella saliva umana, ma sono stati identificati nelle urine tramite HPLC-MS/MS con un LOD di rispettivamente 3.2 µg L⁻¹, 6.6 µg L⁻¹ e 1.5 µg L⁻¹ e un LOQ di rispettivamente 10.7 µg L⁻¹, 21.9 µg L⁻¹ e 5 µg L⁻¹ [101].

5.4. Procedura preanalitica

Nel presente studio si analizzano analiti simili, ovvero biomolecole *marker* utilizzate come indicatori di stress, in due campioni differenti: nelle scaglie dei pesci e nella saliva umana. Le due operazioni di preanalitica richiedono procedure differenti, ma in entrambi i casi, il trattamento sviluppato permette di adoperare la stessa procedura per analizzare simultaneamente tutti gli analiti.

I dati che si riferiscono all'ottimizzazione per quanto riguarda il metodo per lo studio degli indicatori di stress nei pesci sono riportati in [96].

5.4.1. Preanalitica dei campioni di *A. fasciatus*

I pesci *A. fasciatus* procurati per il presente lavoro derivano in parte dalla pesca e in parte dagli acquari presenti nei laboratori dell'Università di Ca' Foscari. L'eutanasia è stata effettuata inizialmente mediante anestesia attraverso una soluzione diluita in acqua ed etanolo, andando successivamente ad aumentare la dose di etanolo. Questo processo si è svolto rispettando il codice etico per la protezione degli animali utilizzati per fini scientifici della Direttiva 2010/63/UE, apportando il minor grado di stress e sofferenza, e seguendo la linea guida dell'*American Veterinary Medical Association* [102].

Le scaglie dei campioni analizzati sono state rimosse mediante una pinzetta di acciaio inossidabile, percorrendo il corpo del pesce dalla testa alla coda. Sono state poi pesate, all'interno dei tubi da centrifuga circa 40-50 mg di scaglie umide per ciascun campione. Successivamente sono state essiccate a 60°C per 1 ora fino a peso secco costante. La rimozione dell'epidermide, per la determinazione dello stress acuto nei pesci, è stata effettuata aggiungendo alle scaglie 1 ng assoluto di standard COL* e 500µL di acqua ultra pura, mescolando per 5 minuti a 2000 rpm mediante un agitatore automatico Ika-Vibrax-VRX del tipo VX8. Il surnatante è stato poi filtrato, per rimuovere il particolato, in una vial di vetro, usando una siringa di plastica (Braun, Melsugen, Germany) con un filtro di acetato di cellulosa da 0.22 µm (GVS Sanford, USA).

Le scaglie sono state poi lavate in 1 mL di acqua ultra pura usando un vortex per qualche secondo e questa operazione è stata svolta per tre volte, in modo da rimuovere completamente frammenti di epidermide e tracce di standard interno.

I campioni bagnati di scaglie (senza lo strato esterno di muco ed epidermide) sono stati trasferiti in delle vial in vetro con all'interno un microinserto, per limitarne il volume, ed essiccate nuovamente per 1h a 60°C. Le scaglie sono state pesate e poi frantumate e ridotte in polvere mediante un utensile rotante (*dremel*, modello PCG01B, TACKlife). Previa aggiunta di 0.6 ng di standard COL* e di 300 µL di acqua ultra pura, gli analiti sono stati estratti mediante bagno ultra suoni per mezz'ora a 50°C. Il surnatante è stato sempre filtrato in una vial da iniezione per essere poi analizzato. In Figura 20 è riportato lo schema a blocchi della procedura di trattamento dei campioni.

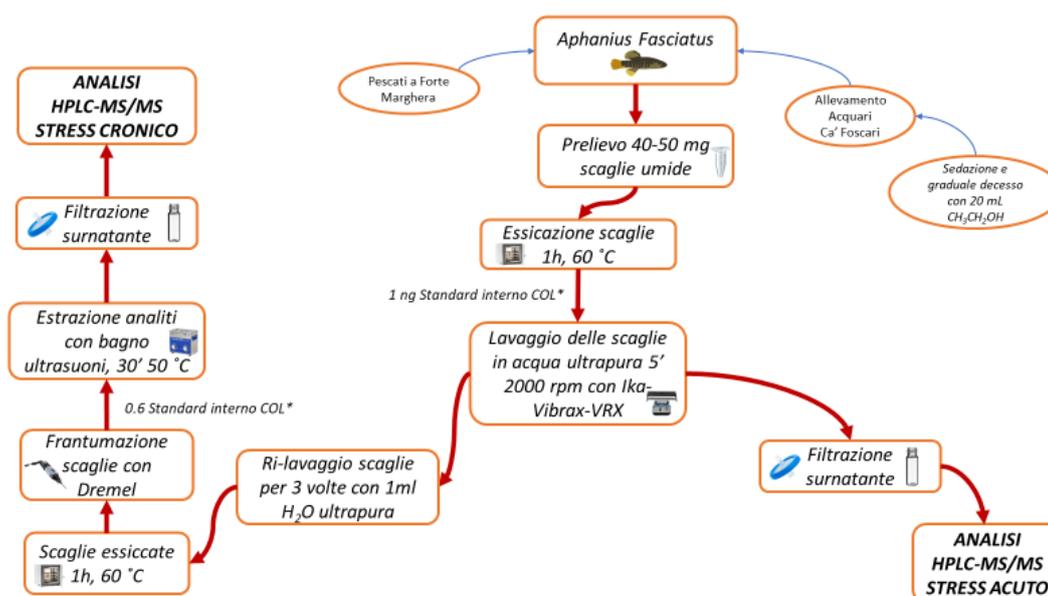


Figura 20: schema a blocchi del trattamento dei campioni.

5.4.2. Preanalitica dei campioni di saliva

I campioni di saliva dei donatori di sangue AVIS, prelevati tramite le salviette, sono stati conservati in una cella a -80°C fino al loro utilizzo. Nel momento dell'analisi i campioni vengono scongelati a temperatura ambiente e centrifugati per 2 min a 1000 rpm (Serie Frontier™ 500 Multi Pro, FC5916) per recuperare la

saliva presente nel tampone che viene raccolta all'interno dell'apposito contenitore per centrifuga, vedi Figura 10, Capitolo 3.2. 250 μ L di saliva sono stati addizionati con 10 ng assoluti di ogni standard interno. La miscela è stata portata a volume finale di 1 mL di acqua ultra pura. In Figura 21 si riporta uno schema a blocchi riassuntivo della fase di preanalitica descritta.

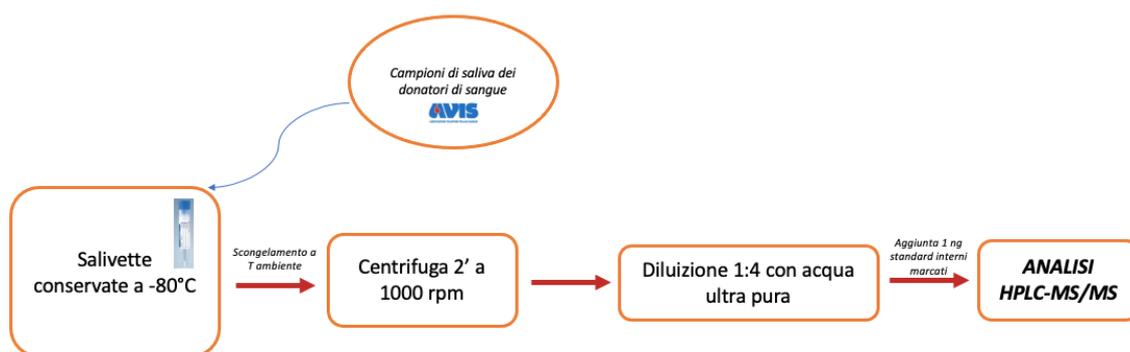


Figura 21: schema a blocchi del trattamento dei campioni.

5.5. Validazione della procedura analitica

La procedura analitica per entrambi gli studi proposti nel presente lavoro di tesi è stata validata mediante la stima del limite di rivelabilità e quantificazione procedurale (rispettivamente MDL e MQL), della precisione del bianco procedurale, della resa e dell'esattezza. L'analisi quantitativa, invece, è stata eseguita con iniezione degli standard interni marcati isotopicamente e corretta con un fattore di risposta.

5.5.1. Validazione dei campioni di *A. fasciatus*

Per il primo step di lavaggio delle scaglie, per rimuovere lo strato superficiale di epidermide, sono stati provati diversi solventi. La separazione permette l'analisi separata dello stress acuto (accumulato nell'epidermide) e dello stress cronico (accumulato nelle scaglie) [17], [103]. Sono stati testati solventi con diverse polarità come l'isopropanolo, suggerito da alcuni studi presenti in letteratura [49]. Le immagini al microscopio (Figura 22d) hanno però dimostrato che il lavaggio con isopropanolo non è adeguato per rimuovere ogni traccia di

epidermide [16], [27]. Sono stati provati anche diversi composti organici meno polari come il diclorometano, l'eptano e l'esano, ma nessuno portava a buone prestazioni. L'acqua ultra pura è risultata essere il miglior solvente, probabilmente per la sua maggiore polarità rispetto agli altri solventi citati (Figura 22c).

La fase di agitazione è stata testata con diversi tempi e, come si vede in Figura 22b, il lavaggio di 2 minuti non ha rimosso completamente l'epidermide, soprattutto se questa risultava essere accumulata tra le scaglie impaccate. Il lavaggio della durata di 5 minuti ha rimosso completamente l'epidermide (Figura 22c).

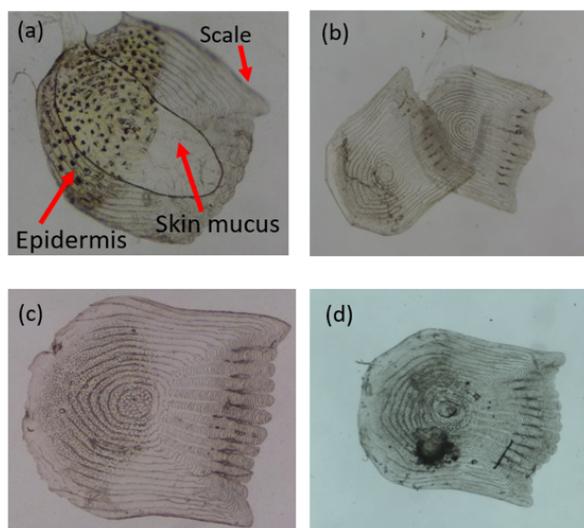


Figura 22: immagine al microscopio di: a) scaglie del pesce *A. fasciatus* con strato superficiale di muco e epidermide, b) scaglie sovrapposte, c) scaglia lavata tre volte con acqua ultra pura e d) scaglia lavata tre volte con isopropano.

Nella fase di validazione del metodo procedurale per lo studio degli indicatori di stress COL, CON e DHEAS nei pesci *A. fasciatus*, sono state usate come matrice le scaglie dei pesci stessi. La validazione è avvenuta sia per la fase di estrazione dell'epidermide e del muco che per la fase di estrazione delle scaglie.

Per valutare il limite di rivelabilità (MDL) e di quantificazione (MQL) della metodologia preanalitica sono stati analizzati tre campioni di bianco procedurale seguendo tutti i passaggi descritti nella procedura analitica, ma senza le scaglie. I valori ottenuti per l'epidermide sono rispettivamente di 0.001 ng e 0.002 ng, mentre per le scaglie sono rispettivamente 0.0005 ng e 0.002 ng (Tabella 8).

La stima dell'accuratezze (l'errore sul valore vero) è stata effettuata seguendo la procedura analitica descritta nel Capitolo 5.4.1 utilizzando il DHEAS come standard per la validazione. Il DHEAS è stato utilizzato per validare anche COL e CON perché ha simili caratteristiche chimico-fisiche. Inoltre, durante i test preventivi non è mai stato determinato in epidermide e scaglie.

5.5.1.1. Epidermide

La procedura analitica per l'accuratezza prevede che dopo l'essiccazione delle scaglie venga aggiunto 1 ng di standard interno COL* e 1 ng di DHEAS. Dopo il lavaggio tramite Vortex, il surnatante viene filtrato in una vial da iniezione. Le scaglie bagnate sono sottoposte poi ad altri 3 lavaggi (lav1, lav2, lav3) in 1 mL di acqua ultra pura. Durante lo sviluppo del metodo, come test per valutare l'efficienza di lavaggio, il surnatante di questi tre risciacqui è stato filtrato e trasferito nelle vial d'analisi per dimostrare la completa rimozione dello standard interno. Dai cromatogrammi in Figura 23 si nota come le intensità del picco riferito al COL* e di conseguenza la sua quantità diminuiscono gradualmente nei tre lavaggi. Al quarto lavaggio la quantità di COL* è trascurabile.

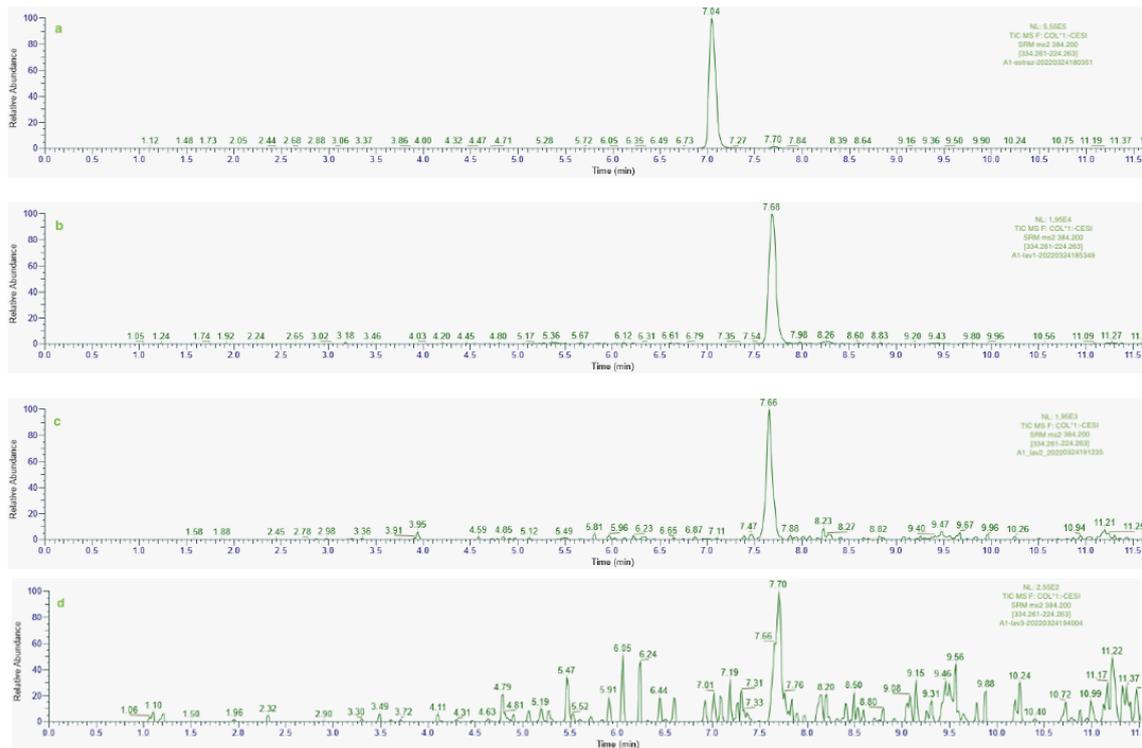


Figura 23: intensità del picco dello standard interno COL* dopo i diversi lavaggi: a) COL* dopo lavaggio con Vortex per 5 minuti (intensità 5.55E5), b) COL* dopo lav1 (intensità 1.95E4), c) COL* dopo lav2 (intensità 1.95E3) e d) COL* dopo lav3 (intensità 2.55E2).

La Figura 24 mostra la quantità di DHEAS estratto, aggiunta in fase di validazione dell'epidermide. Gran parte di composto è stato rimosso con una media di 0.92 ng e l'errore di quantificazione risulta essere di -8%. I dati relativi all'epidermide sono riportati in Tabella 8.

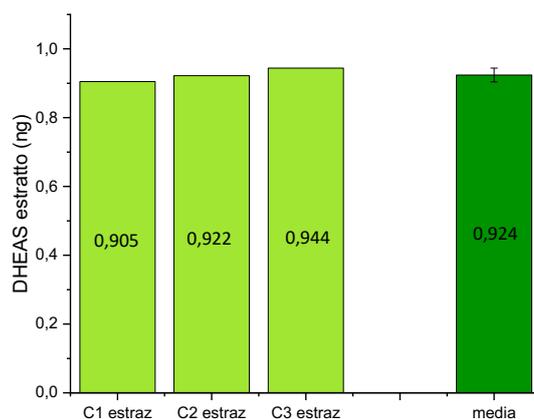


Figura 24: quantità di DHEAS estratto nella fase di estrazione dell'epidermide e del muco nei tre campioni e la relativa media

5.5.1.2. Scaglie

Dopo l'essiccazione delle scaglie pulite e la loro frantumazione, sono stati aggiunti 0.6 ng di COL* e 0.6 ng di DHEAS in 300 μ L di acqua ultra pura e si esegue l'estrazione con bagno a ultra suoni. In Figura 25 viene riportata la quantità di DHEAS estratto, aggiunta in fase di validazione delle scaglie. È stata estratta una media di 0.57 ng di DHEAS dopo i diversi passaggi e l'errore di quantificazione risulta essere del 5% (Tabella 8).

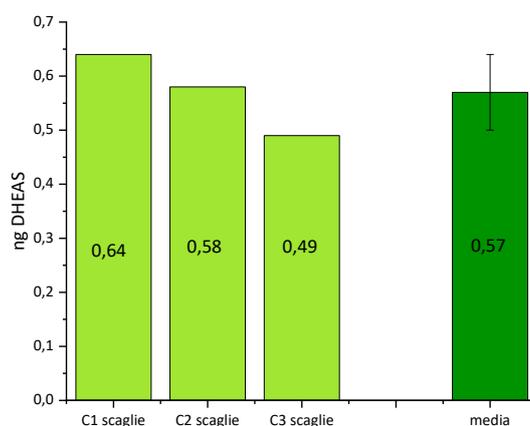


Figura 25: quantità di DHEAS estratto nella fase di estrazione delle scaglie nei tre campioni e la relativa media.

Tabella 8: errore medio, CV%, bianco medio, MDL e MQL per DHEAS nell'estrazione di epidermide e nell'estrazione di scaglie.

	Errore medio %	CV %	Bianco medio (ng assoluti)	MDL (ng assoluti)	MQL (ng assoluti)
Epidermide					
DHEAS	-8	2	0.0035 ± 0.0003	0.001	0.002
Scaglie					
DHEAS	5	13	0.0021 ± 0.0002	0.0005	0.002

La procedura preanalitica permette un'efficiente separazione tra epidermide e scaglie consentendo di studiare separatamente lo stress acuto e cronico dei pesci *A. fasciatus*.

5.5.2. Validazione dei campioni di saliva

Il calcolo dei limiti di rilevabilità (MDL) e quantificazione (MQL) è stato effettuato attraverso l'analisi dei composti in esame in acqua ultra pura, addizionati con 1 ng assoluto di standard interni marcati (COL*, EPI-d6 e DOP-d4).

Per la determinazione delle accuratezze sono state ottimizzate diverse diluizioni di saliva sintetica per cercare di ridurre l'impatto della matrice. I diversi test hanno portato alla scelta della diluizione 1:4. Un esempio dei cromatogrammi ottenuti è riportato in Appendice A1, dove si evince come la diluizione 1:2 mostri dei cromatogrammi molto complessi, principalmente a causa dell'effetto matrice.

L'accuratezza è stata valutata seguendo gli stessi passaggi della preanalitica descritti nel Capitolo 5.5.2. Sono stati dunque imbevuti i tamponi di cinque salivette con 1 mL di saliva sintetica e centrifugati a 1000 rpm per due minuti estraendo la saliva nell'apposito contenitore (Capitolo 3.2 Figura 10). Sono stati prelevati 250 µL di saliva, aggiunti 1 ng di standard interni e nativi e portato a volume con acqua ultrapura a 1 mL. In Tabella 9 sono riportati i valori di errore percentuale, coefficienti di variazione, bianco medio, MDL e MQL.

Tabella 9: errore medio, CV%, bianco medio, MDL e MQL per COL, CON, EPI, NORE e DOPA.

	Errore medio %	CV %	Bianco medio (ng assoluti)	MDL (ng assoluti)	MQL (ng assoluti)
COL	1	2	0.017 ± 0.001	0.003	0.01
CON	7	3	0.00072 ± 0.00003	0.0001	0.0003
EPI	9	5	0.0173 ± 0.0001	0.0004	0.001
NORE	-10	6	0.00002 ± 0.00001	0.00002	0.0001
DOPA	8	4	0.0012 ± 0.0001	0.0003	0.001

Gli standard interni marcati scelti per la quantificazione possono essere considerati adatti in quanto i valori degli errori medi percentuali sono bassi. Il COL* è usato per l'analisi quantitativa del COL e CON comportando rispettivamente un errore del 1% e 7%. L'EPI-d6, usato invece per la quantificazione dell'EPI e della NORE, porta a un errore del 9% per il primo e -10% per il secondo; infine il marcato DOPA-d4 per la quantificazione della DOPA comporta un errore medio percentuale dell'8%. Il limite di rilevabilità più basso risulta essere quello della norepinefrina con 0.00002 ng assoluti, viceversa quello più alto è del cortisolo con 0.003 ng assoluti.

Le misure si possono affermare precise poiché i coefficiente di variazione percentuale sono al di sotto del 10% in un range che va dal 2% del COL al 6% della NORE.

In questa fase è stato anche verificato l'effetto matrice dato da ciò che è presente nel campione, eccetto gli analiti, che può influenzare la risposta strumentale, aumentando o sopprimendo il segnale. La retta matrice consiste in cinque concentrazioni note di standard nativi nell'intervallo compreso tra 0.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ con una concentrazione di 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ di standard marcati. Il rapporto saliva sintetica e acqua è sempre 1:4 (250 μL di saliva sintetica). Come esempio si riporta il confronto tra la retta matrice e la retta di calibrazione del cortisolo alle stesse concentrazioni di standard nativi e marcati (Figura 26); per gli altri analiti si riportano le rette in Appendice A2 e le rispettive equazioni in Appendice A3. Si osserva come per l'effetto della matrice, la pendenza (m) della retta matrice (0.874) è minore rispetto alla pendenza della retta di calibrazione (1.077), con conseguente soppressione del segnale e minore sensibilità. La diluizione 1:4 ha

sicuramente diminuito questo effetto aumentando però il limite di quantificazione.

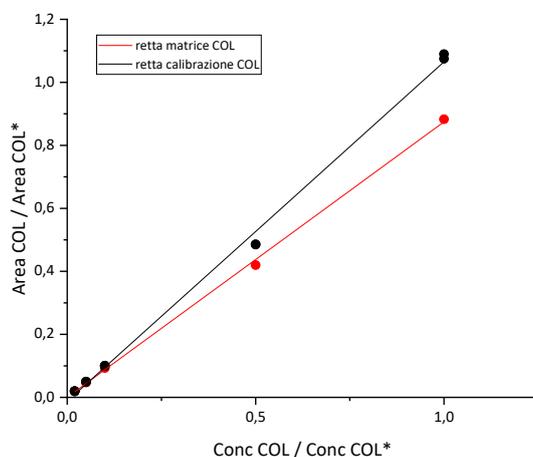


Figura 26: confronto tra retta di calibrazione e retta matrice di COL.

Il contributo dell'effetto matrice per ciascuna concentrazione e per ogni analita è riportato in Tabella 8, più il valore è vicino al 100% e meno effetto matrice è presente. Questo fenomeno è minore per gli analiti COL e CON, mentre è più evidente per EPI, NORE e DOPA.

Tabella 8: effetto matrice % per ciascuna concentrazione della retta matrice e di calibrazione per ogni analita.

	Effetto matrice %				
	COL	CON	EPI	NORE	DOPA
0.2 ng L ⁻¹	72	71	4	4	7
0.5 ng L ⁻¹	68	68	5	5	9
1 ng L ⁻¹	70	67	3	4	7
5 ng L ⁻¹	65	64	1	1	2
10 ng L ⁻¹	68	68	3	3	6

6. Analisi e discussione dati

6.1. Indicatori di stress nei campioni di *A. fasciatus*

Nel presente lavoro di tesi la procedura di preanalitica validata per determinare gli indicatori di stress COL, CON e DHEAS nelle scaglie dei pesci è stata applicata a dieci campioni di *A. fasciatus* appena pescati (AP) e dieci presenti da un anno nell'acquario del laboratorio del Dipartimento di Scienze Ambientali, Informatica e Statistica (PO). La comparazione permette di valutare lo stato di stress dei pesci a seconda dell'ambiente in cui si trovano. Dall'analisi strumentale HPLC-MS/MS si osserva che il DHEAS è sempre risultato al di sotto del limite di rilevabilità (8 ng L^{-1}), sia nell'epidermide che nelle scaglie, come evidenziato anche da altri studi presenti in letteratura [27]. Gli analiti COL e CON sono sempre presenti sopra il MQL, sia nell'epidermide che nelle scaglie. I dati sono riportati nei grafici in Figura 27.

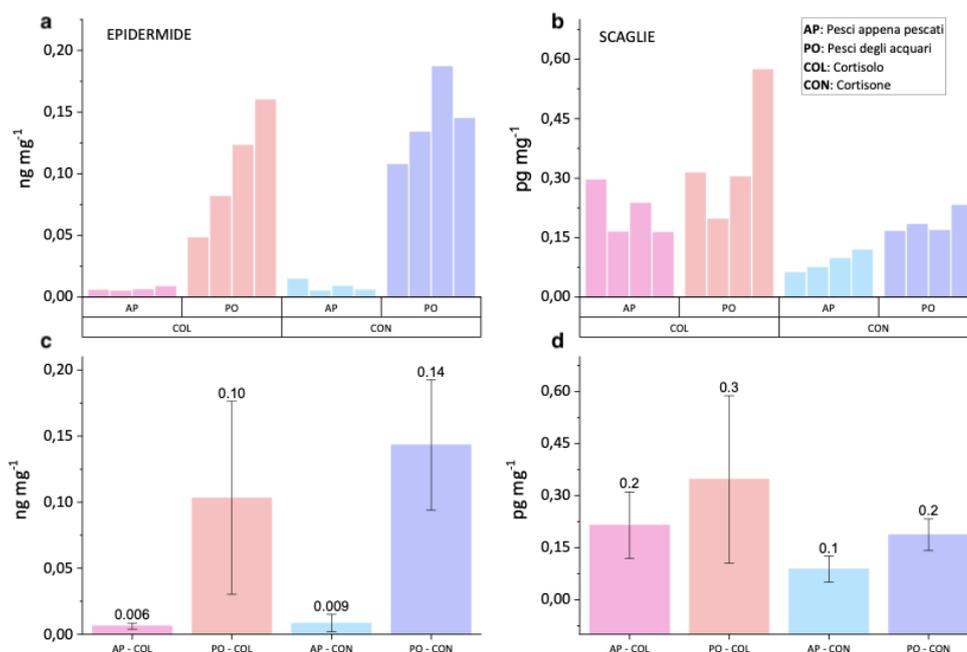


Figura 27: a) e b) confronto tra i livelli di concentrazione di COL e CON nei pesci appena pescati (AP) e nei pesci presenti da un anno negli acquari di laboratorio (PO) rispettivamente nell'epidermide e nelle scaglie. c) e d) valori medi COL e CON rispettivamente nell'epidermide e nelle scaglie.

I dati mostrano come i livelli di concentrazione di COL e CON nei campioni PO siano sempre maggiori rispetto a quelli nei campioni AP, sia per il contributo di stress acuto sia per quello cronico (Figura 27), suggerendo che l'ambiente dei pesci di laboratorio influenza negativamente lo stato fisiologico del pesce.

Le concentrazioni degli ormoni nell'epidermide dei pesci appena pescati (0.006 ng mg⁻¹ di COL e 0.009 ng mg⁻¹ di CON) sono sempre inferiori rispetto a quelle dei pesci d'acquario (0.10 ng mg⁻¹ di COL e 0.14 ng mg⁻¹ di CON). Inoltre i dati del COL e di CON in AP e PO hanno una differenza statisticamente significativa, con dei valori di *p-value* rispettivamente di 0.03 e 0.003. Lo stress acuto può essere associato al momento della neutralizzazione per i campioni AP e della pesca per i campioni PO quindi, la differenza dei livelli di COL e CON può essere dovuta alle diverse tecniche di cattura utilizzate. Per i campioni PO si è usata una rete rettangolare per catturare i pesci, che simula l'azione di un predatore, inducendo dello stress acuto. Successivamente, tramite etanolo, è stata eseguita l'eutanasia, apportando ulteriore tensione alla specie. Nel caso dei campioni AP, invece, è stato adottato un metodo passivo utilizzando una rete a strascico per la cattura e successivamente si esegue l'eutanasia, riducendo così lo stress. Inoltre, per i pesci PO, le condizioni di vita all'interno degli acquari di laboratorio possono generare ulteriore stress acuto.

Per quanto riguarda invece lo stress cronico (estrazione da scaglie) non è presente una differenza statistica significativa tra la concentrazione del COL nei due tipi di campioni (*p-value* > 0.18) e le concentrazioni determinate sono in media 0.2 pg mg⁻¹ per i campioni AP e 0.3 pg mg⁻¹ per i campioni PO. I dati della concentrazione di CON tra i campioni AP e PO hanno un significato statistico (*p-value* < 0.002) ottenendo rispettivamente 0.09 pg mg⁻¹ e 0.2 pg mg⁻¹. La concentrazione degli ormoni è risultata maggiore nei campioni dei pesci allevati per un anno nel laboratorio rispetto a quelli appena pescati. Probabilmente i pesci allevati negli acquari per un anno vivono in condizioni non naturali che influenzano la percezione dello stress: il limitato raggio di movimento, il sovraffollamento degli acquari e l'alimentazione possono essere cause dell'incremento di tensione della specie, che si riflette sull'aumento dello stress cronico.

Il motivo per cui i dati significativi sono riferiti al CON, piuttosto che al COL, è data dal fatto che il cortisolo rilasciato nel plasma, a seguito di un forte stimolo

esterno, è stato convertito nel suo metabolita inattivo tramite un enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi, e viene a sua volta poi bioaccumulato [16], [27], [104]. L'attività di questo enzima varia molto per fattori genetici della specie del pesce, ma anche per fattori ambientali quali temperatura, salinità, ore del giorno e stagioni dell'anno [105]. Il rapporto CON:COL fornisce maggiori informazioni sullo stress dei pesci e sul funzionamento dell'enzima [104], [106]. Ad esempio è stato dimostrato nel *salmon* *coho* come il rapporto CON:COL sia maggiore nel mese di giugno, in cui la temperatura dell'acqua è maggiore (16-18 °C), rispetto al mese di aprile, quando le temperature sono più basse (12-13°C) [104]. Come si osserva in Figura 28 nel nostro studio sono stati rilevati rapporti CON:COL di 1.3 e 0.4 per rispettivamente l'epidermide e le scaglie dei campioni AP, mentre 1.6 e 0.6 per l'epidermide e le scaglie dei campioni PO.

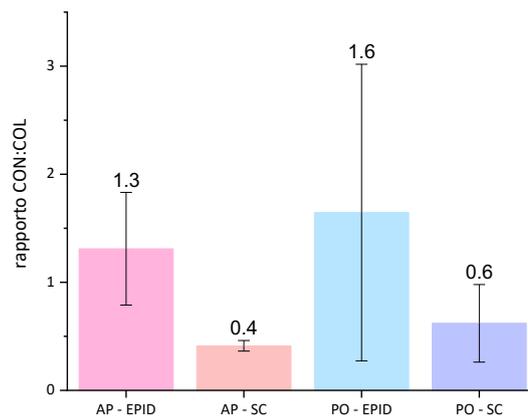


Figura 28: rapporto medio CON:COL nell'epidermide e nelle scaglie dei campioni AP e PO.

Nonostante il rapporto CON/COL sia dell'epidermide che delle scaglie del gruppo di campioni PO sia maggiore rispetto ai campioni AP, la differenza non è statisticamente significativa (*p-value* epidermide pari a 0.53, *p-value* scaglie pari a 0.18). Il rapporto maggiore nell'epidermide indica comunque che per far fronte all'evento perturbante e di conseguenza all'aumento di produzione di cortisolo nelle cellule interrenali, il cortisolo venga convertito in cortisone. Ciò è una forma di difesa della specie per evitare danni ai tessuti dati dalle alte concentrazioni dell'ormone glucocorticoide attivo [16], [106]. Dall'altro lato il rapporto più basso nelle scaglie può essere associato a una bassa concentrazione di cortisolo, non

considerata nociva dall'organismo come quella dello stress acuto, ma utile alla specie per adattarsi. Il cortisolo viene quindi convertito al suo metabolita inattivo più lentamente.

Si conclude sostenendo che i diversi ambienti in cui vivevano i pesci campionati (in laboratorio e in laguna) contribuiscono diversamente allo stato fisiologico del pesce: la vita in laboratorio porta a stress acuto e cronico maggiore. Come detto in precedenza il benessere del pesce può essere influenzato dalla temperatura in cui vive, ma nel presente caso studio questa condizione è stata mantenuta uguale a quella presente nella laguna di Venezia; si deduce dunque che questo parametro non abbia aumentato la produzione degli ormoni glucocorticoidi. La limitata area di movimento potrebbe aver influenzato il benessere dei pesci *A. fasciatus*, favorendo una forte conversione del cortisolo in cortisone, osservabile sia nell'epidermide che nelle scaglie.

6.2. Indicatori di stress nella saliva

La procedura analitica sviluppata nel presente lavoro di tesi per i campioni di saliva umana è stata applicata ai donatori di sangue della sede AVIS di Marcon, in provincia di Venezia. I donatori che hanno aderito al progetto sono stati 26, 16 di sesso maschile e 10 di sesso femminile. In questi campioni di liquido biologico sono stati determinati gli ormoni glucocorticoidi COL e CON e le catecolammine EPI, NORE e DOPA, che vengono prodotti dall'organismo umano nei momenti di stress. Campionare in tre momenti differenti della donazione, ovvero all'arrivo in sede, prima e dopo la donazione stessa, ha permesso di analizzare come varia la tensione fisica del donatore durante l'intera attività e verificare quale sia il momento più critico.

Le catecolammine NORE e DOPA sono sempre risultate al di sotto del MQL, mentre l'EPI è stata determinata sporadicamente solo in alcuni campioni. Si può affermare che NORE, DOPA ed EPI presentano una stabilità chimica limitata e possono essere inattivati per degradazione enzimatica, prima di diffondersi nella saliva [107], [108]. Il COL e il CON invece sono stati rilevati in tutti i campioni. In Figura 29 si riporta la concentrazione media di COL, CON e EPI riferita a tutti i campioni nei tre momenti diversi: A all'arrivo dei volontari, durante la

compilazione del questionario di idoneità, B prima della donazione e C dopo la donazione.

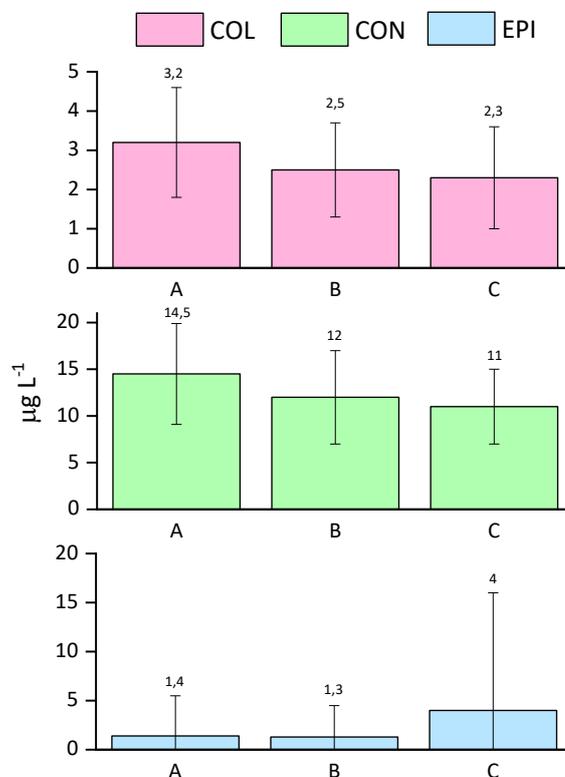


Figura 29: istogrammi delle concentrazioni medie di COL, CON e EPI nei tre momenti di campionamento (A, B e C).

Le concentrazioni determinate di COL, CON e EPI sono nell'ordine di grandezza $\mu\text{g L}^{-1}$ e dal calcolo delle medie dei valori si osserva una variazione decrescente di COL e CON, mentre crescente di EPI durante l'attività di donazione. I dati riguardanti l'analita EPI risultano essere pochi quindi non sufficienti per svolgere dei ragionamenti quantitativi (solo in otto volontari è stata riscontrata e in alcuni casi solo in un campione).

Le concentrazioni maggiori di COL e CON sono state riscontrate nel primo campionamento (rispettivamente 3.2 e $14.5 \mu\text{g L}^{-1}$) e, considerando che gli indicatori di stress si diffondono 15 minuti dopo l'evento destabilizzante, questo è riferito al momento prima dell'arrivo in sede. Le concentrazioni, in generale, risultano più basse per entrambi gli analiti nel terzo campionamento (rispettivamente 2.3 e $11 \mu\text{g L}^{-1}$). Il periodo estivo potrebbe aver esposto il corpo

a maggior stress prima dell'arrivo del donatore a causa delle alte temperature, oppure l'ambiente familiare all'interno delle sedi AVIS potrebbe aver diminuito i fattori di stress sviluppati prima dell'arrivo. Tuttavia, le medie presentano un'alta deviazione standard, dovuta a importanti differenze in termini di concentrazione tra i soggetti studiati.

Per comprendere se l'abitudine alla donazione possa essere una discriminante è stata valutata la risposta allo stress per i donatori veterani (donatori da più di otto anni), i non veterani (donatori da meno di otto anni) e i volontari alla loro prima donazione. La Figura 30 riporta la variazione di concentrazione per ciascun donatore nei tre momenti A,B,C. gli andamenti evidenziano come le concentrazioni di COL siano molto eterogenee. Mentre alcuni veterani (Figura 30a) hanno un andamento decrescente nei tre momenti, altri hanno un andamento crescente o presentano un aumento durante la fase B. La stessa variabilità è presente anche per gli andamenti per le altre due classi di donatori (Figura 30b e 30c). Gli andamenti sono variabili anche per i campioni dei non veterani e delle prime donazioni. C'è dunque sicuramente una variazione tra i tre momenti (A, B e C), ma ciascun individuo reagisce in maniera differente alla tensione data dalla donazione di sangue e dal prelievo stesso.

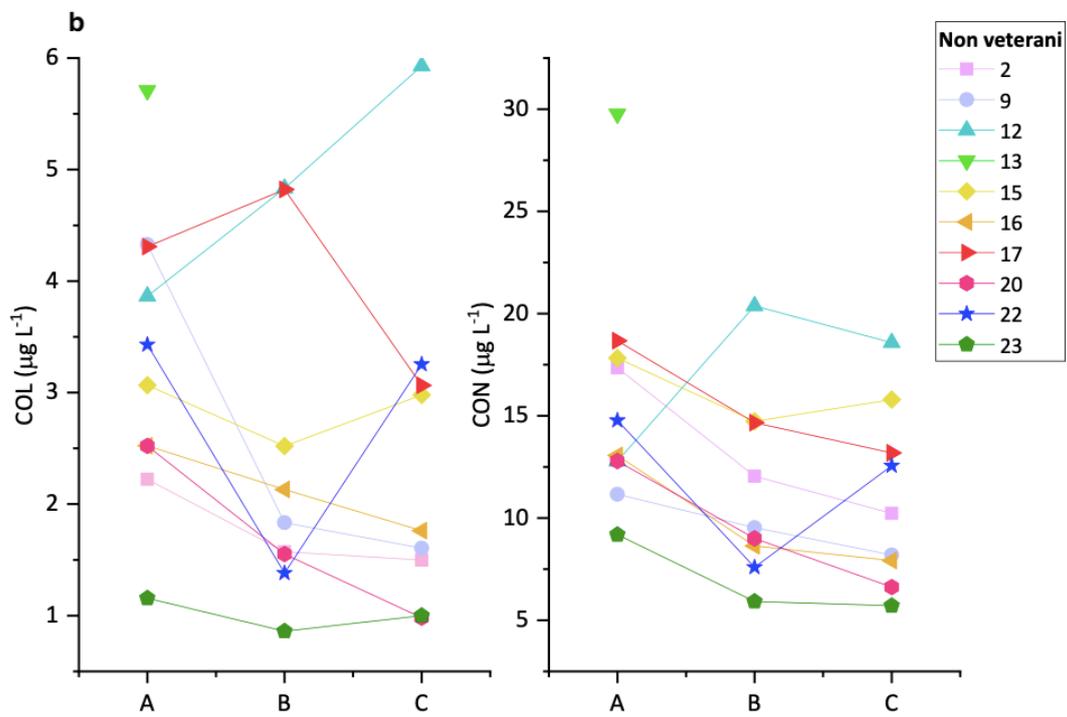
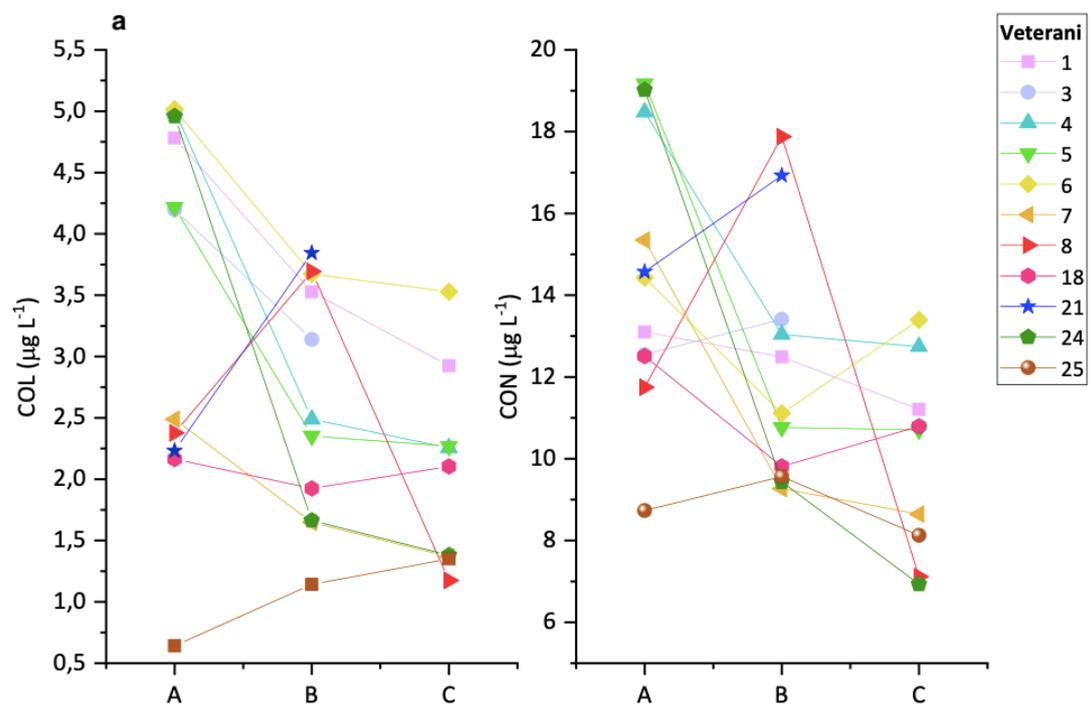
L'utilità degli indicatori di stress viene dimostrata se si osserva l'andamento del campione 14, che presenta un incremento di concentrazione di COL nella fase C. Il soggetto di studio ha dimostrato stress e debolezza nella fase finale della prima donazione, fino alla perdita dei sensi. Il cortisolo, insieme alle catecolammine, svolge un ruolo sulla regolazione della pressione sanguigna e sulla circolazione e questo fenomeno di svenimento conferma l'incremento dei livelli di cortisolo prima della sincope [109], [110], influenzati dallo stress acuto dato dalla venipuntura [111]. Il CON segue un andamento simile al cortisolo subendo un forte aumento dei livelli di concentrazione nella fase C. Il rapporto COL:CON è basso, pari a 0.26, indice di una forte attività dell'enzima 11 β -idrossisteroide deidrogenasi 2, responsabile della conversione del cortisolo in cortisone come forma di difesa dell'organismo per regolare la concentrazione di COL [112].

La concentrazione di COL del campione 14C risulta essere di 5.17 $\mu\text{g L}^{-1}$ e nonostante sia dovuta a una tensione fisica elevata che ha portato a una sincope, risulta essere molto vicina alla concentrazione maggiore riscontrata nei campioni

dei veterani, pari a $5.01 \mu\text{g L}^{-1}$ (nel momento A) e dei non veterani, pari a $5.93 \mu\text{g L}^{-1}$ (nel momento C). Questo indica come la sintesi e il consumo di questi indicatori siano strettamente collegati al soggetto che subisce la situazione di stress. Infatti altre discrepanze tra soggetti donatori sono state riscontrate: un esempio è il donatore 10 nella fase A, il cui valore ($2.06 \mu\text{g L}^{-1}$) di massima tensione risulta essere comunque inferiore rispetto ai valori massimi del veterano 1 e del non veterano 22 (rispettivamente $4.78 \mu\text{g L}^{-1}$ e $3.43 \mu\text{g L}^{-1}$), nonostante quest'ultimi siano abituati alla tensione apportata dalla venipuntura [111].

L'eterogeneità dei livelli di cortisolo in risposta allo stress dato dalla donazione può essere anche legata al diverso stile di vita e alla differente alimentazione dei donatori. Ai primi donatori è consigliato di non svolgere la colazione prima della donazione di sangue e questo è dimostrato possa comportare una diminuzione di cortisolo mattutino, data da un ritardo dell'azione dell'asse HPA [113]. Viceversa, l'assunzione di caffeina, consigliata ai volontari veterani e non veterani per la donazione, incrementa la sua secrezione [114]. Questo effetto si osserva ad esempio nel primo donatore 11 i cui livelli di COL nella fase di maggior tensione B ($2.18 \mu\text{g L}^{-1}$) risultano essere inferiori alla concentrazione più bassa dei donatori 6 e 17 (rispettivamente 3.53 e $3.06 \mu\text{g L}^{-1}$).

Focalizzandosi dunque sui singoli individui è visibile una variazione di tensione fisica durante i tre momenti differenti di donazione (A, B e C), ma è difficile un confronto interpersonale poiché gli individui percepiscono e rispondono allo stress in modo differente. Infatti durante la donazione si possono verificare delle condizioni in cui un soggetto molto stressato presenti concentrazioni più basse di cortisolo rispetto a un volontario con minore tensione.



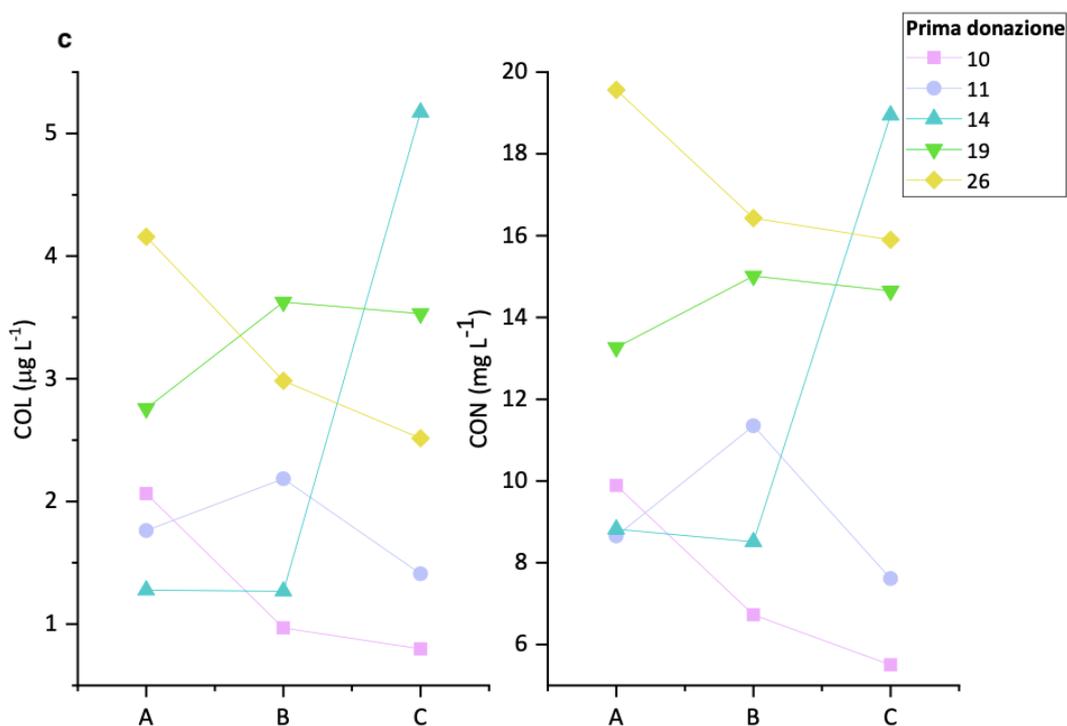


Figura 30: variazione di concentrazione di COL e CON nei tre momenti A, B, C: a) valori dei veterani, b) valori dei non veterani e c) prima donazione.

L'andamento delle concentrazioni di CON nei tre momenti di campionamento è simile all'andamento del COL per ciascun volontario (Figura 31), ad esclusione di due casi tra i campioni dei non veterani (12 e 17). I valori di concentrazione sono molto più elevati rispetto al COL, con un rapporto CON:COL di 2.7, simile ai valori riportati in letteratura [115]. Tale rapporto è dato dalla pendenza della retta riportata in Figura 31. Nelle ghiandole salivari è presente, infatti, l'enzima 11-idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2 (11-HSD), che converte il cortisolo in cortisone, raggiungendo concentrazioni di quest'ultimo quattro volte superiori al COL al mattino [63], [69], [116].

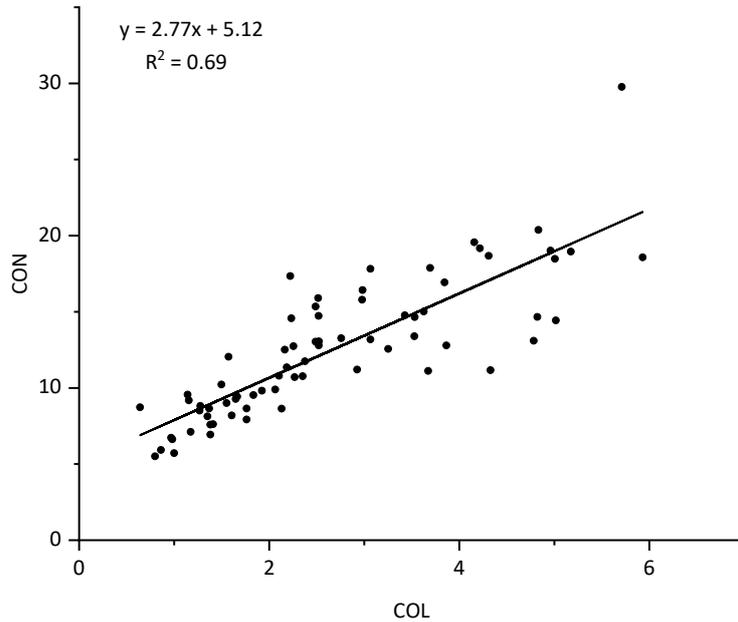


Figura 31: CON in funzione di COL di tutti i campioni, con relativa equazione e parametro R^2 .

Sono stati inoltre confrontati i valori medi di COL e CON anche tra sesso maschile e femmine nei tre differenti momenti di campionamento A, B e C, come riportato in Figura 32.

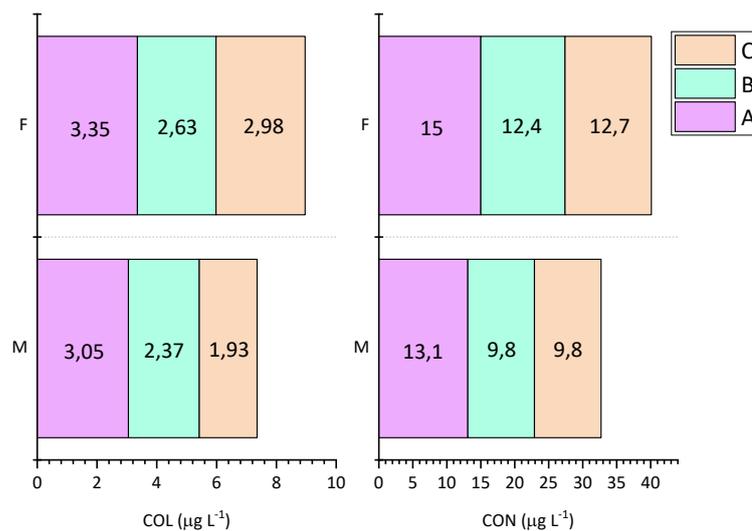


Figura 32: confronto della concentrazione media di COL e CON, nei tre momenti di campionamento A, B e C, tra sesso maschile e femminile.

Le concentrazioni dei due ormoni glucocorticoidi risultano essere maggiori nelle donne e questo si nota principalmente nel CON. Infatti, l'attività dell'enzima 11-HSD1 (11-idrossisteroide deidrogenasi di tipo 1) è meno elevata nelle donne, comportando una maggiore conversione di cortisolo in cortisone [69].

I livelli medi di cortisolo nella fase A e B sono confrontabili tra i diversi generi affermando che complessivamente i momenti prima della donazione sono stati percepiti in modo simile. Nella fase C invece questo *marker* risulta essere più elevato nelle donne indice del fatto che risentono maggiormente lo stress cronico della venipuntura, come dimostrato da [117]. L'aumento degli indicatori di stress può essere legato a un maggior timore dell'inserimento dell'ago, infatti alcuni studi ritengono che le donne tendono ad avere una paura degli aghi maggiore rispetto agli uomini [118]. Si conclude affermando che i due gruppi di donatori reagiscono in modo differente alla tensione confermando l'eterogeneità della percezione dello stress.

Conclusioni

Nel presente lavoro di tesi sono stati determinati diversi indicatori di stress in due matrici differenti: nelle scaglie dei pesci *Aphanius fasciatus* e nella saliva umana dei donatori di sangue iscritti all'associazione volontari italiani sangue.

Pesci *Aphanius fasciatus*

È stata validata una procedura preanalitica per l'estrazione degli ormoni glucocorticoidi cortisolo, cortisone e DHEAS nell'epidermide e nelle scaglie dei pesci tramite HPLC-MS/MS. L'obiettivo è stato quello di valutare separatamente il contributo dello stress acuto (accumulato nell'epidermide) e dello stress cronico (accumulato nelle scaglie).

La validazione strumentale è stata affrontata in precedenza ed è oggetto di pubblicazione [96] mentre la validazione procedurale è stata effettuata mediante la stima dell'accuratezza, precisione e MDL e MQL, utilizzando come standard il DHEAS.

Le analisi sono state eseguite su 4 campioni di pesci *A. fasciatus* appena pescati (AP) e 4 di pesci presenti da un anno negli acquari di laboratorio dell'Università Ca' Foscari (PO). In tutti i campioni il DHEAS è risultato sotto i limiti di rivelabilità, sia nell'epidermide che nelle scaglie. I dati mostrano come i livelli di concentrazione di COL e CON nei campioni PO siano sempre maggiori rispetto a quelli nei campioni AP, sia per il contributo di stress acuto sia per quello cronico, suggerendo che l'ambiente dei pesci di laboratorio influenza negativamente lo stato di salute del pesce. Inoltre anche le due modalità di cattura influenzano in modo differente lo stress dei pesci, causando un maggior stress acuto nei PO. I valori riscontrati nell'epidermide vanno da 0.006 ng mg⁻¹ a 0.14 ng mg⁻¹, mentre nelle scaglie intorno allo 0.2 pg mg⁻¹.

Il metodo descritto e sviluppato permette il monitoraggio del benessere dei pesci *A. fasciatus* nell'ambiente in cui vivono attraverso la quantificazione degli ormoni dello stress, discriminando lo stress cronico da quello acuto. I risultati ottenuti saranno applicati ad un pool di campioni molto più ampio, proveniente da diversi siti della laguna di Venezia, con l'obiettivo di andare a verificare se

cortisolo e cortisone siano *marker* affidabili per la valutazione dello stress dovuto sia a fattori ambientali che antropogenici.

Saliva umana

È stato validato un metodo per la determinazione simultanea degli indicatori di stress cortisolo, cortisone, epinefrina, norepinefrina e dopamina tramite UHPLC-MS/MS. Per la messa a punto del metodo è stato per prima ottimizzato il metodo strumentale utilizzato poi per la validazione preanalitica in campioni di saliva umana. I limiti di rilevabilità ottenuti sono riportati in Tabella 7 (Capitolo 5.3) e risultano essere più bassi di quelli presenti in letteratura. Questo metodo strumentale offre un'alternativa ai saggi di immunoassorbimento enzimatico come il kit ELISA, usati per analisi cliniche, nonostante siano rapidi, economici e facili da usare

La validazione per ciascun analita è stata effettuata tramite stima di accuratezza, precisione, range di linearità, MDL e MQL, (Tabella 9, Capitolo 5.5.2).

Le analisi sono state eseguite per 26 donatori di sangue della sede AVIS di Marcon (VE), nel mese di luglio, tramite prelievo di saliva con le salviette. Questo è un metodo non invasivo per diagnosticare lo stress durante la donazione di sangue. Ogni volontario è stato sottoposto a tre campionamenti in diversi momenti della donazione: al loro arrivo in sede, prima e dopo la donazione.

Le catecolammine NORE e DOPA sono risultate sotto al limite di rilevabilità per tutti i campioni, invece l'EPI è stato rilevato sporadicamente in alcuni campioni, non sufficienti per considerazioni quantitative. Questi *marker* infatti tendono ad essere degradati per azione enzimatiche non permettendo di rilevarli nella saliva [107].

Gli ormoni glucocorticoidi COL e CON invece sono sempre stati rilevati e presentano un range di concentrazione che va da valori di $0.64 \mu\text{g L}^{-1}$ e $5.50 \mu\text{g L}^{-1}$ rispettivamente a valori di $5.93 \mu\text{g L}^{-1}$ e $29.77 \mu\text{g L}^{-1}$.

La concentrazione di CON risulta essere sempre maggiore rispetto al COL a causa della presenza nella saliva dell'enzima 11-idrossisteroide deidrogenasi di tipo 2.

Le concentrazioni medie sono risultate maggiori nella fase A di campionamento, ovvero all'arrivo dei donatori e inferiori nella fase C riferita al momento della venipuntura. Le condizioni di temperature elevate del mese di luglio possono aver indotto uno stress ai volontari prima del loro arrivo in sede [119].

Analizzando i singoli donatori, suddivisi in veterani, non veterani e prima donazione, ma anche facendo un confronto tra generi diversi, si notano molte differenze in termini di concentrazione concludendo che ogni soggetto reagisce alla stress cronico dato dalla donazione in modo differente. Concentrazioni alte di indicatori di stress non sono sempre indice di malessere e tensione, infatti volontari più stressati possono essere caratterizzati da livelli più bassi di COL e CON.

Il metodo sviluppato sarà applicato ai donatori di diverse sedi AVIS della provincia di Venezia e Treviso, per confrontare i differenti ambienti di donazione valutando come questi possano influenzare positivamente o negativamente lo stato dei donatori. Inoltre si verifica se si riscontrano variazioni confrontabile tra le tre fasi di campionamento A,B e C e tra i gruppi di donatori.

Interessante sarebbe svolgere indagini su diversi soggetti, come ad esempio studenti, per valutare come lo stress acuto dato dallo svolgimento di un esame varia prima e dopo averlo svolto. Data la soggettività della percezione della tensione a un evento, l'analisi quantitativa degli indicatori di stress potrebbe essere affiancata alla compilazione di un questionario di percezione allo stress [120], il PSS (*Perceived Stress Scale*), che permetterebbe di avere un quadro più completo sulla condizione dei soggetti di studio.

Bibliografia

- [1] S. E. Wendelaar Bonga, "The Stress Response in Fish," 1997. [Online]. Available: <http://hdl.handle.net/2066/16774>
- [2] M. R. Baker, K. S. Gobush, and C. H. Vynne, "Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife," *Journal for Nature Conservation*, vol. 21, no. 5. pp. 309–318, Oct. 2013. doi: 10.1016/j.jnc.2013.03.003.
- [3] G. K. Iwama, M. M. Vijayan, R. B. Forsyth, and P. A. Ackerman, "Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish 1," 1999. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/icb/article/39/6/901/173094>
- [4] T. P. Mommsen, M. M. Vijayan, and T. W. Moon, "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation," 1999.
- [5] B. Sadoul and B. Geffroy, "Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes," *Journal of Fish Biology*, vol. 94, no. 4. Blackwell Publishing Ltd, pp. 540–555, Apr. 01, 2019. doi: 10.1111/jfb.13904.
- [6] D. Li, G. Wang, L. Du, Y. Zheng, and Z. Wang, "Recent advances in intelligent recognition methods for fish stress behavior," *Aquacultural Engineering*, vol. 96. Elsevier B.V., Feb. 01, 2022. doi: 10.1016/j.aquaeng.2021.102222.
- [7] J. Yang *et al.*, "Effect of thiamethoxam on the behavioral profile alteration and toxicity of adult zebrafish at environmentally relevant concentrations," *Science of the Total Environment*, vol. 858, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159883.

- [8] C. Fernandes, A. Fontainhas-Fernandes, E. Rocha, and M. A. Salgado, "Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*," *Environ Monit Assess*, vol. 145, no. 1–3, pp. 315–322, 2008, doi: 10.1007/s10661-007-0041-4.
- [9] M. C. Cartolano *et al.*, "Impacts of a local music festival on fish stress hormone levels and the adjacent underwater soundscape," *Environmental Pollution*, vol. 265, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.114925.
- [10] N. Eissa and H. P. Wang, "Transcriptional stress responses to environmental and husbandry stressors in aquaculture species," *Rev Aquac*, vol. 8, no. 1, pp. 61–88, Mar. 2016, doi: 10.1111/raq.12081.
- [11] N. R. Bury *et al.*, "Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish," 2003. [Online]. Available: <http://www.endocrinology.org>
- [12] Carl B. Schreck, Lluís Tort, and Colin J. Brauner, "The Concept of stress in fish," in *Biology of Stress in Fish*, vol. 35, Anthony P. Farrell and Colin J. Brauner, Ed., 2016, pp. 1–34.
- [13] J. H. Van Weerd and J. Komen, "The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal," 1998.
- [14] G. A. Santos, J. W. Schrama, R. E. P. Mamauag, J. H. W. M. Rombout, and J. A. J. Verreth, "Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The combined effects of fish crowding and water quality deterioration," *Aquaculture*, vol. 299, no. 1–4, pp. 73–80, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.11.018.

- [15] C. B. Schreck, "Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 165, no. 3, pp. 549–556, 2010, doi: 10.1016/j.ygcen.2009.07.004.
- [16] E. K. C. Kennedy and D. M. Janz, "First Look into the Use of Fish Scales as a Medium for Multi-Hormone Stress Analyses," *Fishes*, vol. 7, no. 4, Aug. 2022, doi: 10.3390/fishes7040145.
- [17] J. Aerts, J. R. Metz, B. Ampe, A. Decostere, G. Flik, and S. De Saeger, "Scales tell a story on the stress history of fish," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123411.
- [18] A. K. Greenwood, P. C. Butler, R. B. White, U. Demarco, D. Pearce, and R. D. Fernald, "Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: Distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities," *Endocrinology*, vol. 144, no. 10, pp. 4226–4236, Oct. 2003, doi: 10.1210/en.2003-0566.
- [19] E. Faught, N. Aluru, and M. M. Vijayan, "The Molecular Stress Response," in *Fish Physiology*, vol. 35, Elsevier Inc., 2016, pp. 113–166. doi: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00004-7.
- [20] S. D. McCormick, M. L. Taylor, and A. M. Regish, "Cortisol is an osmoregulatory and glucose-regulating hormone in Atlantic sturgeon, a basal ray-finned fish," *Journal of Experimental Biology*, vol. 223, no. 18, Sep. 2020, doi: 10.1242/jeb.220251.
- [21] A. M. Liebert and C. B. Schreck, "Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation," *Gen Comp Endocrinol*, vol. 148, no. 2, pp. 195–202, Sep. 2006, doi: 10.1016/j.ygcen.2006.03.002.

- [22] S. D. McCormick, "HORMONAL CONTROL OF GILL Na⁺,K⁺-ATPase AND CHLORIDE CELL FUNCTION," 1995. doi: [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60250-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60250-2).
- [23] S. L. Alderman and M. M. Vijayan, "11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in zebrafish brain: A functional role in hypothalamus-pituitary-interrenal axis regulation," *Journal of Endocrinology*, vol. 215, no. 3, pp. 393–402, Dec. 2012, doi: 10.1530/JOE-12-0379.
- [24] M. K. Rasheeda, H. Kagawa, R. Kirubakaran, A. Dutta-Gupta, and B. Senthilkumaran, "Cloning, expression and enzyme activity analysis of testicular 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase during seasonal cycle and after hCG induction in air-breathing catfish *Clarias gariepinus*," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 120, no. 1, pp. 1–10, May 2010, doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.014.
- [25] M. Kusakabe, I. Nakamura, and G. Young, "Enzymatic activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," 2003.
- [26] J. S. Raul, V. Cirimele, B. Ludes, and P. Kintz, "Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair," *Clin Biochem*, vol. 37, no. 12, pp. 1105–1111, Dec. 2004, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.02.010.
- [27] E. K. C. Kennedy and D. M. Janz, "Chronic stress causes cortisol, cortisone and DHEA elevations in scales but not serum in rainbow trout," *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, vol. 276, Feb. 2023, doi: 10.1016/j.cbpa.2022.111352.

- [28] J. Rege *et al.*, "Circulating 11-oxygenated androgens across species," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 190, pp. 242–249, Jun. 2019, doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.04.005.
- [29] S. Sollberger and U. Ehlert, "How to use and interpret hormone ratios," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 63, pp. 385–397, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.09.031.
- [30] J. R. Metz, E. de Vrieze, E. J. Lock, I. E. Schulten, and G. Flik, "Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 28, no. 3, pp. 382–387, Jun. 2012, doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.01990.x.
- [31] E. de Vrieze, L. Heijnen, J. R. Metz, and G. Flik, "Evidence for a hydroxyapatite precursor in regenerating cyprinid scales," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 28, no. 3, pp. 388–392, Jun. 2012, doi: 10.1111/j.1439-0426.2012.01989.x.
- [32] D. Zhu, C. F. Ortega, R. Motamedi, L. Szewciw, F. Vernerey, and F. Barthelat, "Structure and mechanical performance of a 'modern' fish scale," *Adv Eng Mater*, vol. 14, no. 4, Apr. 2012, doi: 10.1002/adem.201180057.
- [33] D. Arola *et al.*, "The limiting layer of fish scales: Structure and properties," *Acta Biomater*, vol. 67, pp. 319–330, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.011.
- [34] J.-Y. Sire and M.-A. Akimenko, "Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (*Danio rerio*)," 2004. [Online]. Available: www.ijdb.ehu.es

- [35] L. Zylberberg and G. Nicolas, "Cell and Tissue Research Ultrastructure of scales in a teleost (*Carassius auratus* L.) after use of rapid freeze-fixation and freeze-substitution," 1982.
- [36] E. de Vrieze, F. Sharif, J. R. Metz, G. Flik, and M. K. Richardson, "Matrix metalloproteinases in osteoclasts of ontogenetic and regenerating zebrafish scales," *Bone*, vol. 48, no. 4, pp. 704–712, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.bone.2010.12.017.
- [37] A. Samaras, A. Dimitroglou, S. Kollias, G. Skouradakis, I. E. Papadakis, and M. Pavlidis, "Cortisol concentration in scales is a valid indicator for the assessment of chronic stress in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.," *Aquaculture*, vol. 545, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737257.
- [38] P. Persson, B. Th. Björnsson, and Y. Takagi, "Characterization of morphology and physiological actions of scale osteoclasts in the rainbow trout," *J Fish Biol*, vol. 54, no. 3, pp. 669–684, Mar. 1999, doi: 10.1111/j.1095-8649.1999.tb00645.x.
- [39] A. A. Schrnbrner, G. Boivin, and C. A. Baud, "Cell and Tissue Research The Mineralization Processes in Teleost Fish Scales," 1979.
- [40] Y. Mugiya, "STUDIES ON FISH SCALE FORMATION AND RESORPTION-II. EFFECT OF ESTRADIOL ON CALCIUM HOMEOSTASIS AND SKELETAL TISSUE RESORPTION IN THE GOLDFISH, *CARASSIUS AURATUS*, AND THE KILLIFISH, *FUNDULUS HETEROCLITUS*," Pergamon Press. Primed in Grenc Brirnin, 1977.
- [41] P. I. S. Pinto, M. D. Estêvão, S. Santos, A. Andrade, and D. M. Power, "In vitro screening for estrogenic endocrine disrupting compounds using Mozambique tilapia and sea bass scales,"

Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology, vol. 199, pp. 106–113, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.cbpc.2017.06.002.

- [42] Y. Ohira, M. Shimizu, K. Ura, and Y. Takagi, "Scale regeneration and calcification in goldfish *Carassius auratus*: quantitative and morphological processes."
- [43] T. Nakano, M. Kameda, Y. Shoji, S. Hayashi, T. Yamaguchi, and M. Sato, "Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon," *Redox Biol*, vol. 2, no. 1, pp. 772–776, 2014, doi: 10.1016/j.redox.2014.05.007.
- [44] H. Wu *et al.*, "Fish stress become visible: A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress," *Biosens Bioelectron*, vol. 67, pp. 503–510, May 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.09.015.
- [45] F. Laberge, I. Yin-Liao, and N. J. Bernier, "Temporal profiles of cortisol accumulation and clearance support scale cortisol content as an indicator of chronic stress in fish," *Fam Pract*, vol. 36, no. 5, pp. 621–626, Oct. 2019, doi: 10.1093/conphys/coz052.
- [46] D. Bertotto, C. Poltronieri, E. Negrato, D. Majolini, G. Radaelli, and C. Simontacchi, "Alternative matrices for cortisol measurement in fish," *Aquac Res*, vol. 41, no. 8, pp. 1261–1267, Jul. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02417.x.
- [47] A. P. Scott and T. Ellis, "Measurement of fish steroids in water-a review," *General and Comparative Endocrinology*, vol. 153, no. 1–3. Academic Press Inc., pp. 392–400, 2007. doi: 10.1016/j.ygcen.2006.11.006.

- [48] J. Aerts, J. R. Metz, B. Ampe, A. Decostere, G. Flik, and S. De Saeger, "Scales tell a story on the stress history of fish," *PLoS One*, vol. 10, no. 4, Apr. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0123411.
- [49] A. Carbajal, L. Monclús, O. Tallo-Parra, M. Sabes-Alsina, D. Vinyoles, and M. Lopez-Bejar, "Cortisol detection in fish scales by enzyme immunoassay: Biochemical and methodological validation," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 34, no. 4, pp. 967–970, Aug. 2018, doi: 10.1111/jai.13674.
- [50] J. L. Chicharro, A. Lucía, M. Pérez, A. F. Vaquero, and R. Ureña, "Saliva composition and exercise," *Sports Medicine*, vol. 26, no. 1, pp. 17–27, 1998.
- [51] J. K. M. Aps and L. C. Martens, "Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva," *Forensic Sci Int*, vol. 150, no. 2–3, pp. 119–131, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.forsciint.2004.10.026.
- [52] D. De Boer, K. M. Höld, B. S. ; Douwe De Boer, J. Zuidema, R. A. A. Maes, and M. K. M. Höld, "Saliva as an Analytical Tool in Toxicology," 1996. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/46598804>
- [53] T. Jensdottir, B. Nauntofte, C. Buchwald, and A. Bardow, "Effects of calcium on the erosive potential of acidic candies in saliva," *Caries Res*, vol. 41, no. 1, pp. 68–73, Dec. 2006, doi: 10.1159/000096108.
- [54] R. Diab-Ladki, B. Pellat, and R. Chahine, "Decrease in the total antioxidant activity of saliva in patients with periodontal diseases.," *Clin Oral Investig*, vol. 7, no. 2, pp. 103–107, 2003, doi: 10.1007/s00784-003-0208-5.

- [55] Y. Guan, Q. Chu, and J. Ye, "Determination of uric acid in human saliva by capillary electrophoresis with electrochemical detection: Potential application in fast diagnosis of gout," *Anal Bioanal Chem*, vol. 380, no. 7–8, pp. 913–917, Dec. 2004, doi: 10.1007/s00216-004-2848-y.
- [56] E. De Corso *et al.*, "Bile acids and total bilirubin detection in saliva of patients submitted to gastric surgery and in particular to subtotal Billroth II resection," *Ann Surg*, vol. 245, no. 6, pp. 880–885, Jun. 2007, doi: 10.1097/01.sla.0000255574.22821.a1.
- [57] J. E. Lloyd, A. Broughton, and C. Selby, "Salivary creatinine assays as a potential screen for renal disease," 1996.
- [58] P. Coufal, J. Zuska, T. van de Goor, V. Smith, and B. Gaš, "Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 4. Wiley-VCH Verlag, pp. 671–677, 2003. doi: 10.1002/elps.200390079.
- [59] A. B. Actis, N. R. Perovic, D. Defagó, C. Beccacece, and A. R. Eynard, "Fatty acid profile of human saliva: A possible indicator of dietary fat intake," *Arch Oral Biol*, vol. 50, no. 1, pp. 1–6, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.08.001.
- [60] S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, and E. F. De Palo, "Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation," *Clinica Chimica Acta*, vol. 383, no. 1–2. pp. 30–40, Aug. 2007. doi: 10.1016/j.cca.2007.04.011.
- [61] R. J. Gibbons and D. I. Hay', "Adsorbed Salivary Acidic Proline-rich Proteins Contribute to the Adhesion of Streptococcus mutans JBP to Apatitic Surfaces," 1989.

- [62] D. Riad-Fahmy, G. F. Read, R. F. Walker, and K. Griffiths, "Steroids in Saliva for Assessing Endocrine Function," 1982.
- [63] M. Gröschl, "Current status of salivary hormone analysis," *Clinical Chemistry*, vol. 54, no. 11. pp. 1759–1769, Nov. 01, 2008. doi: 10.1373/clinchem.2008.108910.
- [64] T. Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, and C. Punyadeera, "Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications," *Clinical Chemistry*, vol. 57, no. 5. pp. 675–687, May 2011. doi: 10.1373/clinchem.2010.153767.
- [65] Aldo Clerico, Simona Vittorini, and Marco Migliardi, "Ruolo e utilità della misura di ormoni nella saliva," *l'Endocrinologo*, vol. 12, no. 5, pp. 227–231, 2011.
- [66] M. W. J. Dodds, D. A. Johnson, and C. K. Yeh, "Health benefits of saliva: A review," *J Dent*, vol. 33, no. 3 SPEC. ISS., pp. 223–233, 2005, doi: 10.1016/j.jdent.2004.10.009.
- [67] A. V. Nieuw Amerongen and E. C. I. Veerman, "Saliva - The defender of the oral cavity," *Oral Dis*, vol. 8, no. 1, pp. 12–22, 2002, doi: 10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x.
- [68] H.P. Lawrence, "Salivary markers of systemic disease:noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health," *Journal of Canadian Dental Association*, vol. 68, no. 3, pp. 170–174, 2002.
- [69] D. Riad-Fahmy, G. F. Read, R. F. Walker, and K. Griffiths, "Steroids in Saliva for Assessing Endocrine Function," 1982.
- [70] R. J. Toone *et al.*, "Measurement of steroid hormones in saliva: Effects of sample storage condition," *Scand J Clin Lab Invest*, vol.

73, no. 8, pp. 615–621, Dec. 2013, doi: 10.3109/00365513.2013.835862.

- [71] E. S. Epel *et al.*, “More than a feeling: A unified view of stress measurement for population science,” *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 49. Academic Press Inc., pp. 146–169, Apr. 01, 2018. doi: 10.1016/j.yfrne.2018.03.001.
- [72] H. Selye, “THE GENERAL ADAPTATION SYNDROME AND THE DISEASES OF ADAPTATION 1,” 1946.
- [73] G. A. Perdrizet, “Hans Selye and beyond: responses to stress,” *Cell Stress and Chaperones*, vol. 2, no. 4, pp. 214–219, 1997.
- [74] A. Faller, M. Schünke, and G. Schünke, “The Human Body: An Introduction to Structure and Function,” 2004.
- [75] N. L. Strominger, R. J. Demarest, and L. B. Laemle, *Noback’s Human Nervous System: Structure and Function*, 7th ed. New York City: Springer, 2012.
- [76] Y. Katsu and M. E. Baker, “Cortisol,” in *Handbook of Hormones*, Elsevier, 2021, pp. 947–949. doi: 10.1016/B978-0-12-820649-2.00261-8.
- [77] S. M. Smith and W. W. Vale, “The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress,” *Dialogues in Clinical Neuroscience*, vol. 8, no. 4. pp. 383–395, 2006. doi: 10.31887/dcns.2006.8.4/ssmith.
- [78] S. Ramamoorthy and J. A. Cidlowski, “Corticosteroids. Mechanisms of Action in Health and Disease,” *Rheumatic Disease Clinics of North America*, vol. 42, no. 1. W.B. Saunders, pp. 15–31, 2016. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002.

- [79] L. Thau, J. Gandhi, and S. Sharma, *Physiology, Cortisol*. 2023.
- [80] M. Quinkler and P. M. Stewart, "Hypertension and the cortisol-cortisone shuttle," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 88, no. 6. Endocrine Society, pp. 2384–2392, Jun. 01, 2003. doi: 10.1210/jc.2003-030138.
- [81] J. Bergquist, S. ´ Ciubisz, A. Kaczor, and J. Silberring, "Invited review Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids," 2002. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/jneumeth
- [82] Vallone Daniela, R. Picetti, and E. Borrelli, "Structure and function of dopamine receptors," 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/neubiorev
- [83] B. Kennedy, E. Dillon, P. J. Mills, and M. G. Ziegler, "Catecholamines in human saliva," 2001.
- [84] Daniel C. Harris, *Chimica analitica quantitativa*, 3rd ed. 2017.
- [85] David S. Hage and James D. Carr, *Chimica Analitica e Analisi Quantitativa*. 2012.
- [86] D. Angeletti, R. Cimmaruta, and G. Nascetti, "Genetic diversity of the killifish *Aphanius fasciatus* paralleling the environmental changes of Tarquinia salterns habitat," *Genetica*, vol. 138, no. 9, pp. 1011–1021, 2010, doi: 10.1007/s10709-010-9487-3.
- [87] F. Cavraro, C. Varin, and S. Malavasi, "Lunar-induced reproductive patterns in transitional habitats: Insights from a Mediterranean killifish inhabiting northern Adriatic saltmarshes," *Estuar Coast Shelf Sci*, vol. 139, pp. 60–66, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.ecss.2013.12.023.

- [88] I. Leonardos, "The feeding ecology of *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) in the lagoonal system of Messolongi (western Greece)," *Sci Mar*, vol. 72, no. 2, pp. 393–401, 2008.
- [89] S. Valdesalici, J. Langeneck, M. Barbieri, A. Castelli, and F. Maltagliati, "Distribution of natural populations of the killifish *Aphanius fasciatus* (Valenciennes, 1821) (Teleostei: Cyprinodontidae) in Italy: past and current status, and future trends," *Italian Journal of Zoology*, vol. 82, no. 2, pp. 212–223, Apr. 2015, doi: 10.1080/11250003.2014.1003418.
- [90] C. Facca, F. Cavarro, P. Franzoi, and S. Malavasi, "Lagoon resident fish species of conservation interest according to the habitat directive (92/43/CEE): A review on their potential use as ecological indicator species," *Water (Switzerland)*, vol. 12, no. 7. MDPI AG, Jul. 01, 2020. doi: 10.3390/w12072059.
- [91] "DIRETTIVA 92/43/CEE DEL CONSIGLIO del 21 maggio 1992 relativa alla conservazione degli habitat naturali e seminaturali e della flora e della fauna selvatiche."
- [92] R. Cimmaruta, F. Scialanca, F. Luccioli, and G. Nascetti, "Genetic diversity and environmental stress in Italian populations of the cyprinodont fish *Aphanius fasciatus* Diversité génétique et stress de l'environnement chez des populations du poisson cyprinidé *Aphanius fasciatus*," 2003. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/oceact
- [93] F. Maltagliati, "Genetic divergence in natural populations of the Mediterranean brackish-water killifish *Aphanius fasciatus*," 1999.
- [94] A. Newton *et al.*, "An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters," *Estuar Coast*

Shelf Sci, vol. 140, pp. 95–122, Mar. 2014, doi: 10.1016/j.ecss.2013.05.023.

- [95] B. Ditto and C. R. France, “Vasovagal symptoms mediate the relationship between predonation anxiety and subsequent blood donation in female volunteers,” *Transfusion (Paris)*, vol. 46, no. 6, pp. 1006–1010, Jun. 2006, doi: 10.1111/j.1537-2995.2006.00835.x.
- [96] G. Mazzi *et al.*, “Cortisol, cortisone and DHEAS in epidermis and scales of fish *Aphanius fasciatus*: HPLC-MS/MS measurement of stress indicators as proxies for natural and human-induced factors,” *Science of The Total Environment*, vol. 904, p. 166900, Dec. 2023, doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.166900.
- [97] M. Mezzullo *et al.*, “Validation of an LC–MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: Evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva,” *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 163, pp. 103–112, Oct. 2016, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.04.012.
- [98] V. Carrera, E. Sabater, E. Vilanova, and M. A. Sogorb, “A simple and rapid HPLC-MS method for the simultaneous determination of epinephrine, norepinephrine, dopamine and 5-hydroxytryptamine: Application to the secretion of bovine chromaffin cell cultures,” *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 847, no. 2, pp. 88–94, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.jchromb.2006.09.032.
- [99] Y. Shibayama *et al.*, “Simultaneous determination of salivary testosterone and dehydroepiandrosterone using LC-MS/MS: Method development and evaluation of applicability for diagnosis and medication for late-onset hypogonadism,” *J*

Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, vol. 877, no. 25, pp. 2615–2623, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.10.051.

- [100] J. Bakusic, S. De Nys, M. Creta, L. Godderis, and R. C. Duca, “Study of temporal variability of salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS using a new atmospheric pressure ionization source,” *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-55571-3.
- [101] F. Gosetti, E. Mazzucco, M. C. Gennaro, and E. Marengo, “Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS,” *Anal Bioanal Chem*, vol. 405, no. 2–3, pp. 907–916, Jan. 2013, doi: 10.1007/s00216-012-6269-z.
- [102] S. L. Leary and American Veterinary Medical Association, “AVMA guidelines for the euthanasia of animals : 2020 edition,” 2020.
- [103] E. De Mercado, A. M. Larrán, J. Pinedo, and C. Tomás-Almenar, “Skin mucous: A new approach to assess stress in rainbow trout,” *Aquaculture*, vol. 484, pp. 90–97, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.10.031.
- [104] R. Patino, J.M. Redding, and C.B. Schreck, “Interrenal Secretion of Corticosteroids and Plasma Cortisol and Cortisone Concentrations after Acute Stress and during Seawater Acclimation in Juvenile Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*)”, 1987. doi: [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90082-7](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90082-7).
- [105] B. A. Barton, “Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids 1,” 2002. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/icb/article/42/3/517/723932>

- [106] T.G. Pottinger and T.A. Moran, "Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *J Fish Biol*, vol. 43, pp. 121–130, 1993.
- [107] G. Giacomello, A. Scholten, and M. K. Parr, "Current methods for stress marker detection in saliva," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 191. Elsevier B.V., Nov. 30, 2020. doi: 10.1016/j.jpba.2020.113604.
- [108] K. O. Schwab, G. Heubel, and H. Bartels, "Free epinephrine, norepinephrine and dopamine in saliva and plasma of healthy adults.," *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, vol. 30, no. 9, pp. 541–4, Sep. 1992.
- [109] D. L. Jardine, I. C. Melton, I. G. Crozier, S. I. Bennett, R. A. Donald, and H. Ikram, "Neurohormonal Response to Head-Up Tilt and Its Role in Vasovagal Syncope," 1302.
- [110] K. A. Ellenbogen, C. A. Morillo, M. A. Wood, D. M. Gilligan, D. L. Eckberg, and M. L. Smith, "Neural monitoring of vasovagal syncope," *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*, vol. 20, no. 3 II, pp. 788–794, 1997, doi: 10.1111/j.1540-8159.1997.tb03905.x.
- [111] B. Dalile, K. Verbeke, and L. Van Oudenhove, "Vasovagal reactions following venepuncture result in aberrant stress-induced cortisol levels," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 128, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.psyneuen.2021.105220.
- [112] Ray J.A. and Meikle A.W., "Cortisol-cortisone shuttle: A functional indicator of 11B-HSD activity.," *Cortisol: Physiology, regulation and Health*, pp. 91–106, 2012.

- [113] S. Chawla, S. Beretoulis, A. Deere, and D. Radenkovic, "The window matters: A systematic review of time restricted eating strategies in relation to cortisol and melatonin secretion," *Nutrients*, vol. 13, no. 8. MDPI, Aug. 01, 2021. doi: 10.3390/nu13082525.
- [114] A. Harris, H. Ursin, R. Murison, and H. R. Eriksen, "Coffee, stress and cortisol in nursing staff," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 32, no. 4, pp. 322–330, May 2007, doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.01.003.
- [115] J. Blair, J. Adaway, B. Keevil, and R. Ross, "Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting," *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, vol. 24, no. 3. Lippincott Williams and Wilkins, pp. 161–168, Jun. 01, 2017. doi: 10.1097/MED.0000000000000328.
- [116] I. Perogamvros, L. J. Owen, J. Newell-Price, D. W. Ray, P. J. Trainer, and B. G. Keevil, "Simultaneous measurement of cortisol and cortisone in human saliva using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application in basal and stimulated conditions," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 877, no. 29, pp. 3771–3775, Nov. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.09.014.
- [117] M.D. Hoogerwerf, I.J.T. Veldhuizen, E.-M. Merz, W.L.A.M. de Kort, M.H.W. Frings-Dresen, and J.K. Sluiter, "Psychological and hormonal stress response patterns during a blood donation," *Vox Sang*, 2017, doi: 10.1111/vox.12556.
- [118] M. H. J. Bekker, "AGORAPHOBIA AND GENDER: A REVIEW," *Clin Psychol Rev*, vol. 16, no. 2, pp. 129–146, 1996.

- [119] X. Zhang *et al.*, "Association between thermal comfort and cortisol depends on the air temperature and exposure time," *Build Environ*, vol. 233, Apr. 2023, doi: 10.1016/j.buildenv.2023.110073.
- [120] S. Cohen, T. Kamarck, and R. Mermelstein, "A Global Measure of Perceived Stress," 1983.

Appendice

A1

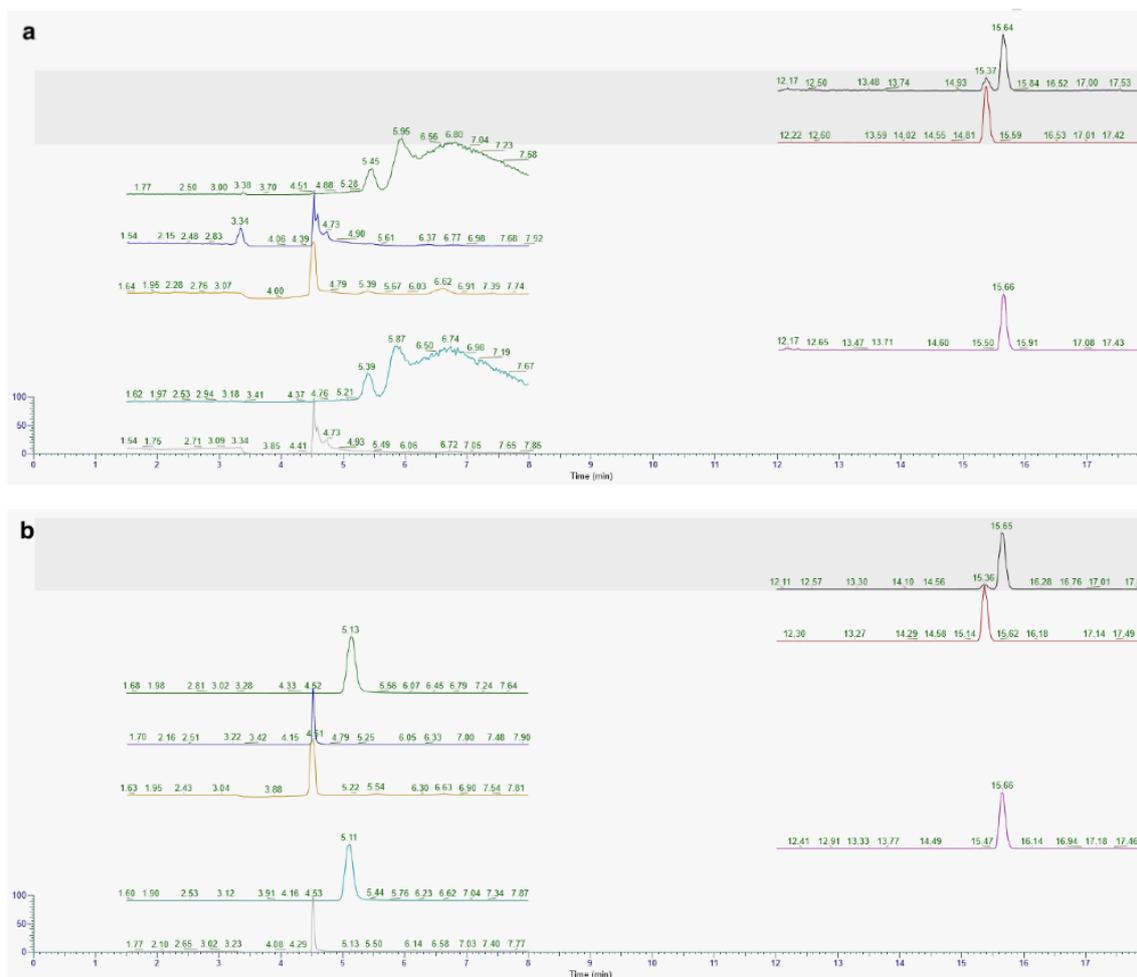


Figura A 1: confronto effetto matrice in diverse diluizioni della saliva con acqua ultrapura: a) diluizione 1:2 e b) diluizione 1:4.

A2

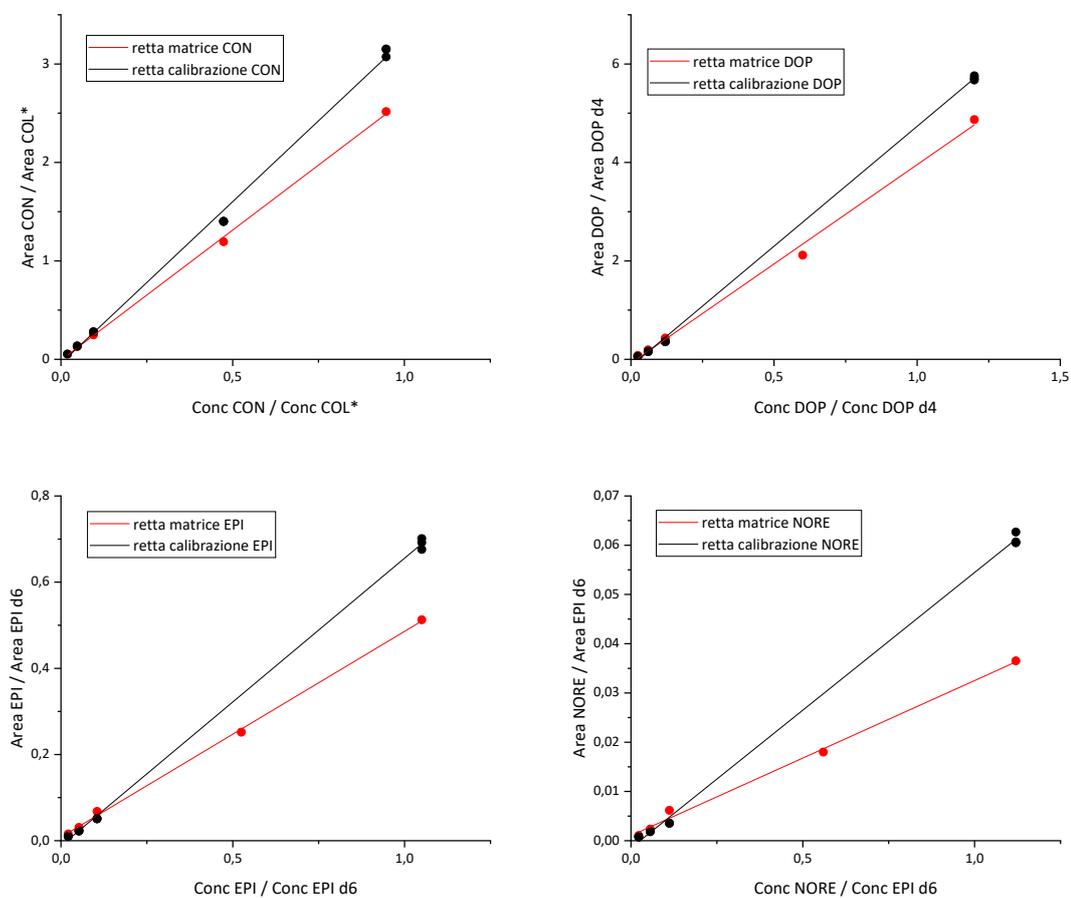


Figura A 2: confronto retta matrice e retta di calibrazione degli analiti CON, DOP, EPI e NORE.

A3

	Retta calibrazione			Retta matrice		
	m	q	R ²	m	q	R ²
COL	1.077	0.013	0.997	0.874	0.0004	0.999
CON	3.284	0.040	0.998	2.640	0.007	0.999
DOPA	4.870	0.137	0.999	4.034	0.079	0.998
EPI	0.667	0.012	0.999	0.478	0.008	0.999
NORE	0.056	0.001	0.999	0.031	0.001	0.998

Figura A 3: parametri m,q e R² della retta di calibrazione e della retta matrice per ciascun analita.