UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Avances en la medicina de elasmobranquios: farmacocinética del meloxicam y contribuciones clínicas a la analítica sanguínea de tiburones y rayas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Morón Elorza

Directores

Mª Teresa Encinas Cerezo
Daniel García Párraga

Madrid

© Pablo Morón Elorza, 2023

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

AVANCES EN LA MEDICINA DE ELASMOBRANQUIOS: FARMACOCINÉTICA DEL MELOXICAM Y CONTRIBUCIONES CLÍNICAS A LA ANALÍTICA SANGUÍNEA DE TIBURONES Y RAYAS

ADVANCES IN ELASMOBRANCH MEDICINE: PHARMACOKINETICS OF MELOXICAM AND CLINICAL CONTRIBUTIONS TO SHARK AND SKATE BLOOD ANALYSIS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pablo Morón Elorza

DIRECTORES

Mª Teresa Encinas Cerezo
Daniel García Párraga

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Doctorado en Veterinaria



AVANCES EN LA MEDICINA DE ELASMOBRANQUIOS: FARMACOCINÉTICA DEL MELOXICAM Y CONTRIBUCIONES CLÍNICAS A LA ANALÍTICA SANGUÍNEA DE TIBURONES Y RAYAS

ADVANCES IN ELASMOBRANCH MEDICINE: PHARMACOKINETICS OF MELOXICAM AND CLINICAL CONTRIBUTIONS TO SHARK AND SKATE BLOOD ANALYSIS

TESIS DOCTORAL

Pablo Morón Elorza

DIRECTORES

Mª Teresa Encinas Cerezo

Daniel García Párraga

Madrid, 2023

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a:

Contrato Predoctoral UCM CT63/19-CT64/19.

Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, bajo el ID de proyecto OCE-22-19.

Y se ha realizado en el marco de los convenios de colaboración con las siguientes instituciones:

Oceanogràfic de Valencia, Valencia.

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, Valencia.

Finisterrae Aquarium, La Coruña.

Bioparc Acuario de Gijón, Gijón.

Museo Marítimo del Cantábrico, Santander.

Acuario de Sevilla, Sevilla.

Oceanario de Lisboa, Lisboa.

Acuario Poema del Mar, Las Palmas de Gran Canaria.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dedicar mis primeras palabras de agradeciendo a mis directores de tesis: a la Profesora Dra. María Teresa Encinas Cerezo y al Dr. Daniel García Párraga, que desde el primer momento confiaron en mí y me dieron la gran oportunidad de trabajar con ellos en este proyecto. Teresa, gracias por tu gran tutela y tus enseñanzas, pero gracias también por darme la libertad necesaria para poder crecer profesionalmente más allá del doctorado durante estos años. Gracias a la flexibilidad que me has dado para realizar este doctorado, he tenido la oportunidad de llevar a cabo estancias en centros muy diversos, mucho más allá de la universidad, siguiendo mi curiosidad, mi vocación clínica y científica. Siempre recordaré con cariño cuando viniste a Valencia para echarme una mano con el primer estudio con los tiburones y estuvimos capturándolos juntos. Daniel, desde que nos conocimos en 2019 durante el Congreso Europeo de Veterinarios de Fauna Silvestre en Suecia, donde estuvimos comiendo y charlando juntos, siempre me has guiado y dado grandes consejos para avanzar en mi carrera profesional. En todo momento me he sentido tremendamente apoyado por ti y te lo agradezco mucho. Os admiro enormemente, tanto por vuestra inagotable capacidad de trabajo como por vuestra excelente calidad humana y dedicación. Me siento muy agradecido y honrado de teneros no sólo como directores, sino también como buenos amigos.

Gran parte del tiempo dedicado a este doctorado lo he pasado trabajando junto al Departamento de Veterinaria del Oceanogràfic, lo que me permitió aprender del trabajo clínico y formarme con el maravilloso equipo del Oceanogràfic. Me gustaría agradecer toda la ayuda y el esfuerzo a Mónica Valls, Teresa Álvaro, Jose Luis Crespo, Vicente Marco y sobre todo a Carlos Rojo, que ha sido un pilar fundamental para la realización de esta tesis, siempre dispuesto a echar una mano. Quiero agradecer al Oceanogràfic, a través de la Fundación Ocanogràfic de la Comunitat Valenciana, el haber aportado gran parte de la financiación y los recursos utilizados para llevar a cabo esta Tesis Doctoral. Gracias a este apoyo económico y logístico hemos podido realizar estudios con especies que requieren un mantenimiento tan complejo como son los elasmobranquios.

Dentro de la Fundación Oceanogràfic hay varias personas que han sido una fuente muy importante de ayuda e inspiración a las que me gustaría dedicar mi agradecimiento: al Dr. Nathan Robinson, gracias por compartir conmigo toda tu energía y experiencia, por guiarme y motivarme a crecer como investigador y comunicador; a Pablo Rodríguez, la

Dra. Alicia Borque, la Dra. Audra Ames y Marta Muñoz por vuestro consejo y el tiempo que me habéis dedicado. Gracias también a Beatriz Domínguez, Carlos Barros, Carlos Taurá y Mario Roche por toda la ayuda para poder estructurar y llevar a cabo los estudios científicos con tiburones, que muchas veces no son fáciles de organizar, pero que gracias a vosotros han podido salir siempre de la mejor forma posible. Agradecer también a todos los profesionales del equipo de Biología del Oceanogràfic, especialmente al Departamento de Océanos: Marga, Andrea, Laura, Carlos y equipo, y al Departamento de Cuarentena: Manuela, Adrián, María, Marieta, Juan, Blanca, mil gracias por toda la ayuda que me habéis dado con los tiburones y las rayas del acuario. En esos estudios que parecían no acabar, pero gracias a los que hemos podido completar esta tesis. Por vuestro excelente trabajo, dedicación, cariño y ayuda os doy las gracias.

En marzo de 2020, todavía durante el primer año de esta tesis, la situación global dio un vuelco con la Pandemia ocasionada por la Covid-19. Fue un año difícil pero también lleno de grandes oportunidades: en los momentos más duros de la situación sanitaria se detuvo la actividad investigadora en el Oceanogràfic y tuve que cambiar la dedicación de tiempo completo de doctorado, comenzando a trabajar como veterinario en el Biodomo, en el Parque de las Ciencias de Granada. A la vez que me iba haciendo con el trabajo diario del Biodomo, continué con las actividades investigadoras del doctorado a tiempo parcial, durante las vacaciones y tiempo libre que conseguía sacar, viajando a Valencia y a Madrid para llevar a cabo los estudios de la tesis. El trabajar como veterinario responsable en un Zoo y Acuario durante un año ha sido una gran experiencia; gracias a este trabajo he podido crecer como clínico, pudiendo combinar esta faceta con la investigación. De esta etapa trabajando en Granada me quedo con todo el apoyo, cariño y confianza que recibí por parte de la plantilla del Biodomo. Gracias a Rain Forest por facilitarme el compaginar el trabajo diario en el centro con el programa de doctorado, pudiendo asistir a las actividades de doctorado y seguir realizando los estudios y proyectos de investigación en el Oceanogràfic de Valencia. Quisiera agradecer también a los colegas y amigos Jesús Recuero, Rosa Martínez y Elena Bertos por el apoyo y guía clínica, por formarme y confiar en mí. Gracias también a todos los compañeros del equipo de biología, mantenimiento, y atención al público del Biodomo y el Parque de las Ciencias por todo lo que me han enseñado y los momentos vividos juntos. Gracias a todos los amigos granadinos con los que compartí ese año tan bonito y lleno de experiencias.

En junio de 2021 conseguí mi primer contrato predoctoral con la Universidad Complutense de Madrid, que me permitió volver a incorporarme a tiempo completo a la tesis, pudiendo volver a pasar temporadas largas en Valencia para acelerar los ensayos clínicos y la lectura de muestras. De este último periodo de tesis en Valencia me gustaría agradecer al Prof. Dr. Julio Cortijo el darme la confianza y las llaves (literalmente) de su departamento para poder realizar allí la lectura de las últimas muestras de la tesis, ya que el equipo de Madrid estaba siendo reparado. Gracias a Paula, Cris, Inés y Xavi por acogerme en el laboratorio como a uno más. Gracias a mis compañeros de piso en Valencia: David, Roberto y Clara, por ser una fuente de alegrías, y por todas las aventuras que hemos vivido juntos.

Durante el último año de tesis, tuve la suerte de poder realizar una estancia de tres meses en Portugal, como parte del Doctorado Internacional. De este periodo me gustaría dar también las gracias al equipo del Oceanario de Lisboa, que me formó durante los tres meses de estancia predoctoral y con los que aprendí muchísimo, no sólo de medicina de especies acuáticas sino también de la gestión de un acuario. Muchas gracias a Nuno Marqués Pereira, Hugo David, Nuria Baylina, Hugo Batista, Ana Figeras, Ana Profeta, Simão Santos y a todos los grandes profesionales del acuario. Agradecer también a los equipos de los distintos acuarios en los que hemos realizado los muestreos requeridos para llevar a cabo este doctorado: Finisterrae Aquarium de Coruña, Bioparc Acuario de Gijón, Museo Marítimo del Cantábrico, Acuario de Sevilla y Poema del Mar. Gracias a todas las personas trabajando en estos centros que han favorecido y contribuido en la consecución de esta tesis, ha sido una suerte poder contar con todo vuestro apoyo.

Me gustaría agradecer a Santiago Borragán, Gonzalo Fernández, Fernando González, Marc Gölkl, Frank Göritz y Endre Sós, por haberme guiado y servido de inspiración y motivación para crecer y continuar en el mundillo de la medicina veterinaria de fauna silvestre. Gracias a mis buenos amigos y compañeros de profesión Manu, Emma, Ángel, Javi, Daniela y Umberto, con los que espero poder seguir viviendo experiencias y hacer grandes proyectos juntos en el futuro.

Gracias a la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y a los profesores que me han formado y guiado desde mis inicios en Veterinaria. Porque, gracias a todas las posibilidades que nos ofrece la Facultad, pude realizar un año de Erasmus en Hungría, un año de SICUE en Gran Canaria, un Erasmus Prácticas en Berlín, un

voluntariado veterinario en Tailandia y un intercambio en el Parque Kruger de Sudáfrica. Y porque, pese a pasar una gran cantidad de tiempo estudiando fuera, siento que en esta Universidad tengo mis raíces y es donde surgen todas las oportunidades, otorgándome al final de mis estudios el máximo reconocimiento académico como estudiante, con el Premio Extraordinario de la Universidad Complutense al mejor expediente académico. Mi especial agradecimiento al Departamento de Farmacología y Toxicología Veterinaria, que es conocido en la Facultad por la cercanía y el cariño de todos los profesores, y en el que desde el primer día me han hecho sentir como en casa: Antonio, Casilda, Fernandos, Juanan, Julio, Luis, Manolo, Mariano, Mariló, Marina, Mariví, Sonia, Teresa, muchas gracias por todo vuestro apoyo.

También mi gratitud va dirigida a mis compañeros de carrera, que han sido una fuente inagotable de alegrías, fuerza y confianza: Carlos, Javi, Silvia, María, Miguel, Bárbara, Pablo, Nacho, Noemí, Cris, Clara… y una lista interminable de personas con las que he compartido los años de carrera, muchas gracias. Gracias a Leire, por tu cariño y por enseñarme cada día a crecer y ser mejor persona. Agradecer también a mis amigos de Tres Cantos, con los que llevo ya más de veinte años compartidos.

Por último, gracias de todo corazón a mi familia, especialmente a mis padres, Marta y Fernando; a mi hermano Álvaro, a María y a mis abuelos. Me siento tremendamente afortunado por teneros y poder contar con vosotros. Gracias por todo vuestro cariño, paciencia, apoyo y consejo. Habéis sabido inculcar en mí el amor por la naturaleza, así como la satisfacción que trae consigo el esfuerzo y el trabajo. El saber que siempre puedo contar con vosotros me ha permitido crecer y dedicarme por completo a todo lo que hago, incluso durante los últimos años en los que he estado lejos de casa. Gracias por estar siempre ahí y por hacerme sentir tan afortunado y apoyado.

Gracias a todas las personas que me han ayudado y que no he podido llegar a mencionar en estos párrafos. He tenido la suerte de coincidir con personas extraordinarias y vivir momentos fascinantes desarrollando mi vocación, y que me han traído hasta donde estoy ahora. A todas esas personas que me han acompañado en este camino de superación y aprendizaje, mi más sincero agradecimiento.

PRESENTACIÓN

Esta Tesis Doctoral se presenta como un compendio de trabajos publicados, que trata de aumentar los conocimientos actuales en cuanto a manejo clínico y terapéutico de los elasmobranquios (tiburones y rayas), aportando información novedosa con el objetivo de mejorar los protocolos farmacoterapéuticos con el antiinflamatorio meloxicam, y la interpretación clínica de los parámetros hematológicos, bioquímicos y de electroforesis de proteínas en este grupo de animales.

Se incluyen en esta tesis los siguientes trabajos publicados:

Artículo 1. Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. (2022) Pharmacokinetic studies in elasmobranchs: Meloxicam administered at 0.5 mg/kg using intravenous, intramuscular and oral routes to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*). Front Vet Sci 9. [Q1 II=0.72 SJR Vet Sci 2021; Q1 (D1) II=3.47 JCR Vet.Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.845555

Artículo 2. Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. (2022). Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry. J Zoo Wild Med 53(2):393-401 [Q2 II=0.34 SJR Vet Sci 2021; Q4 II=0.806 JCR Vet Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2021-0144

Artículo 3. Morón-Elorza P, Cañizares-Cooz D, Rojo-Solis C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. (2022) Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*). Vet Sci, 9, 216. [Q1 II=0.52 SJR Vet Sci 2021; Q2 II=2.518 JCR Vet Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.3390/vetsci9050216

Artículo 4. Morón-Elorza P, Rojo-Solis C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. (2022). Pharmacokinetics meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*). [En revision para su publicación en VAA Q1 II=0.58 SJR 2021 Vet Sci; Q2 II=1.763 JCR Vet Sci 2021].

Artículo 5. Morón-Elorza P, Steyrer C, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D. (2022). Hematology and Plasma Biochemistry Reference Values of Juvenile Undulate Rays (*Raja undulata*) Under Human Care. J Zoo Wild Med 53(3):504-514 [Q2 0.34 SJR 2021 Vet Sci; Q4 II=0.806 JCR Vet Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2021-0140

Artículo 6. Morón-Elorza P, Rojo-Solis C, Steyrer C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D. (2022). Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care. Frontiers Vet Sci [Q1 II=0.72 SJR 2021 Vet Sci; Q1 (D1) II=3.47 JCR Vet.Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.3389/fvets.2022.909834

Artículo 7. Morón-Elorza P, Rojo-Solis C, Steyrer C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D. (2022). Increasing the Data on Elasmobranch Plasma Protein Capillary Zone Electrophoresis: Electrophoretogram Description and Reference Values in the Undulate Skate (*Raja undulata*) and the Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care. BMC Vet Res 18, 380 [Q1 II=0.61 SJR Vet Sci 2021; Q1 II=2.792 JCR Vet Sci 2021]. Disponible en: https://doi.org/10.1186/s12917-022-03478-z

Todo el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral está plasmado en las publicaciones mencionadas y adjuntas en el apartado “V Resultados: Trabajos publicados”. Dado que las publicaciones cubren todos los experimentos realizados, esta memoria no incluye apartados de metodología y resultados clásicos, ya que se basa en los datos aportados en cada manuscrito. Del mismo modo, no se ha incluido una discusión independiente para cada experimento, sino una discusión integrada de los resultados obtenidos de todos los trabajos.



ÍNDICE

ÍNDICE

I RESUMEN 1

II INTRODUCCIÓN 21

A Elasmobranquios y su situación actual 22

A.1 Situación global de los elasmobranquios *in situ* 22

A.2 Situación global de los elasmobranquios mantenidos *ex situ* 23

A.3 Interés de las especies utilizadas en esta tesis 25

B Características anatómicas, fisiológicas y del entorno en elasmobranquios y cómo afectan a su manejo farmacoterapéutico 27

B.1 Sistema digestivo 28

B.2 Sistema cardiovascular 30

B.3 Sistema excretor 34

B.4 Metabolismo 36

B.5 Factores medioambientales 38

C Analítica sanguínea y valores de referencia en elasmobranquios 39

C.1 Hematología 41

C.2 Bioquímica 46

C.3 Electroforesis de proteínas 51

D Patología en elasmobranquios 54

E Farmacoterapéutica en elasmobranquios 57

E.1 Vías de administración en elasmobranquios 58

E.2 Dosificación de fármacos y efectos adversos en elasmobranquios 63

E.3 Tratamiento del dolor y la inflamación en teleósteos y elasmobranquios 64

F Farmacocinética en elasmobranquios 68

F.1 Historia y evolución de la farmacocinética en elasmobranquios 68

F.2 Principales desafíos y situación actual de la farmacocinética en elasmobranquios 70

G Meloxicam 72

G.1 Propiedades fisicoquímicas 72

G.2 Mecanismos de acción y actividad farmacológica 73

G.3 Farmacocinética 75

G.4 Efectos adversos e interacciones farmacológicas 79

G.5 Uso clínico del meloxicam en teleósteos y elasmobranquios 86

III OBJETIVOS 89

A Objetivo general 90

B Objetivos específicos, por capítulos 90

B.1 Primer capítulo 90

B.2 Segundo capítulo 91

IV DISEÑO EXPERIMENTAL 93

A Declaración ética 94

B Esquema del diseño experimental 95

C Breve descripción de la metodología general utilizada en el primer capítulo 96

D Breve descripción de la metodología general utilizada en el segundo capítulo 99

V RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS 103

Artículo 1. Pharmacokinetic studies in elasmobranchs: Meloxicam administered at 0.5 mg/kg using intravenous, intramuscular and oral routes to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) 105

Artículo 2. Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry. 115

Artículo 3. Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*). 125

Artículo 4. Pharmacokinetics of meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*). 137

Artículo 5. Hematology and Plasma Biochemistry Reference Values of Juvenile Undulate Rays (*Raja undulata*) Under Human Care. 161

Artículo 6. Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care..... 173

Artículo 7. Increasing the Data on Elasmobranch Plasma Protein Capillary Zone Electrophoresis: Electrophoretogram Description and Reference Values in the Undulate Skate (*Raja undulata*) and the Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care. 185

VI DISCUSIÓN INTEGRADORA 199

Aportaciones terapéuticas 201

Aportaciones al diagnóstico clínico..... 211

Perspectivas de futuro..... 227

VII CONCLUSIONES 230

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....235

IX ANEXOS 281

Anexo I. Índice de abreviaturas..... 282

Anexo II. Índice de figuras 285

Anexo III. Índice de tablas y esquemas..... 289

Anexo V. Lista de reconocimientos otorgados al trabajo de esta Tesis..... 291

Anexo IV. Lista de otros trabajos derivados de la tesis..... 293

RESUMEN / ABSTRACT

I RESUMEN

Esta Tesis Doctoral aporta nuevos conocimientos en cuanto al manejo clínico y terapéutico de los elasmobranquios (tiburones y rayas) con el fin de apoyar, basándose en trabajos científicos, las actuaciones clínicas de los veterinarios que trabajan con este grupo taxonómico. Por una parte, se mejora la capacidad diagnóstica mediante el análisis de datos poblacionales con el objetivo de facilitar la interpretación clínica de las analíticas sanguíneas. Por otra parte, se consigue avanzar en la capacidad terapéutica mediante la propuesta de protocolos farmacoterapéuticos basados en el comportamiento cinético de uno de los fármacos más utilizados en clínica de estas especies, el meloxicam. En el desarrollo de esta tesis se han utilizado dos especies de elasmobranquio que han servido como modelo: el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*), por ser especies presentes en las costas españolas, mantenidas con frecuencia en acuarios europeos, de tamaño medio y de fácil manejo.

Los protocolos experimentales, análisis de muestras y toma de datos necesarios para desarrollar esta Tesis Doctoral se han llevado a cabo en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia, el laboratorio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria UCM y el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia. Además, se han establecido colaboraciones y realizado muestreos en diferentes acuarios: Acuario Finisterrae (Coruña, España), Acuario Bioparc Gijón (Gijón, España), Museo Marítimo del Cantábrico (Santander, España), Acuario de Sevilla (Sevilla, España), Oceanario de Lisboa (Lisboa, Portugal) y Poema del Mar (Gran Canaria, España).

La tesis se compone de dos partes o capítulos:

Primer capítulo

El primer capítulo estudia las propiedades farmacocinéticas del antiinflamatorio meloxicam en tiburones y rayas. Se eligió el meloxicam como objeto de estudio por ser uno de los antiinflamatorios más utilizados en elasmobranquios y por ser las patologías inflamatorias e infecciosas las más frecuentemente diagnosticadas en este grupo taxonómico.

Primero se estudió la farmacocinética del meloxicam administrado por diferentes vías (intravenosa, intramuscular y oral) en ocho ejemplares adultos y clínicamente sanos de tiburón alitán a dosis de 0.5 mg/kg, dejando un tiempo de lavado mínimo de cuatro semanas entre estudios. Se obtuvieron muestras de 0.4 ml de sangre antes y en tiempos predeterminados después de cada administración (10, 20, y 40 min, 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h tras la administración IV; 15 y 30 min, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 h tras la administración IM y 15 y 30 min, 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h tras la administración PO). Las concentraciones plasmáticas de meloxicam se determinaron utilizando un método de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) previamente validado para detección de meloxicam en plasma de tiburón, y se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos utilizando un modelo no compartimental. El meloxicam administrado por vía oral no produjo concentraciones detectables en el plasma, mientras que la concentración plasmática máxima media (C_{max}) fue de 0.38 ± 0.08 μg/ml después de la administración IM, alcanzada en un tiempo medio (T_{max}) de 2.68 ± 1.81 h. La semivida de eliminación media ($t_{1/2\beta}$) fue de 10.71 ± 2.77 h y de 11.27 ± 3.96 h para las administraciones IV e IM, respectivamente. La biodisponibilidad media del meloxicam fue de 56.22 ± 13.29% tras la administración IM, siendo muy similar a la descrita en peces óseos. Los resultados de este primer estudio respaldan al meloxicam como un fármaco prometedor para usarse por vía IM en el tiburón alitán y motivaron la continuación de esta línea de investigación dentro de esta tesis. Estos resultados también cuestionan la eficacia del uso del meloxicam por vía oral en elasmobranquios y sugieren la necesidad de regímenes posológicos con dosis más elevadas para este fármaco, evidenciando que los regímenes posológicos actualmente indicados para el meloxicam en elasmobranquios podrían no ser adecuados, y mostrando la necesidad de realizar más estudios farmacocinéticos en estas especies.

Tras estos primeros estudios, debido a los buenos parámetros cinéticos observados tras la administración intramuscular y a la ausencia de efectos adversos, y considerando ante las concentraciones plasmáticas relativamente bajas detectadas, se decidió aumentar la dosis de meloxicam a 1.5 mg/kg al administrarlo por vía intramuscular en alitanes. Se evaluaron a su vez los posibles efectos no deseados consecuentes de su administración, mediante el estudio de las modificaciones en los parámetros hematológicos y bioquímicos. Para esta segunda parte experimental, se administró meloxicam por vía IM a una dosis de 1.5 mg/kg a un grupo de seis tiburones alitán, mientras que a dos ejemplares se les administró una solución salina fisiológica de elasmobranquios, también por vía IM, como grupo de

control negativo. Se obtuvieron muestras de sangre antes y en 12 momentos predeterminados dentro de las primeras 36 h tras la administración (15, 30, 45, 60 y 90 min, 2, 4, 6, 9, 12, 24 y 36 h). Los efectos sobre la hematología y la bioquímica plasmática se compararon antes y 24 h tras la administración. No se detectaron efectos adversos durante el estudio y no hubo diferencias significativas en la analítica sanguínea asociadas a la administración de meloxicam. El T_{max} fue de 2.58 ± 0.47 h y la C_{max} fue de 0.81 ± 0.07 µg/ml; se obtuvo un $t_{1/2\beta}$ de 15.97 ± 1.20 h y un tiempo medio de residencia (MRT) de 23.40 ± 2.25 h. Estos resultados sugieren que el meloxicam administrado IM a dosis de 1.5 mg/kg en el tiburón alitán, puede producir niveles plasmáticos clínicamente relevantes durante periodos de 24 h sin ocasionar alteraciones significativas en los análisis de sangre.

Los buenos resultados obtenidos en la segunda parte experimental nos llevaron a estudiar la cinética del meloxicam administrado por vía intramuscular a dosis múltiple de 1.5 mg/kg cada 24 h en un grupo de ocho ejemplares de tiburón alitán durante un periodo de siete días (siete dosis consecutivas). Se tomaron muestras a las 2.5 h (tiempo medio previamente determinado hasta la obtención de la concentración máxima en plasma a la dosis estudiada) y 24 h (concentración mínima) después de cada una de las administraciones del fármaco. Además, tras un periodo de lavado de cuatro semanas, realizamos un estudio complementario en el que administramos el meloxicam oral a 1.5 mg/kg cada 12 h durante tres dosis consecutivas, y tomamos muestras antes y en nueve tiempos predeterminados dentro de las 48 h tras la primera administración (1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 h). Bajo el conocimiento de los autores, este fue el primer estudio farmacocinético de dosis múltiple con meloxicam en peces, y no se apreciaron signos clínicos o efectos adversos asociados a la administración del meloxicam o al manejo requerido para el estudio. El meloxicam administrado por vía oral a dosis múltiple tampoco produjo concentraciones detectables en el plasma de los alitanes. Tras la administración intramuscular, el estado estacionario se alcanzó tras cinco dosis consecutivas, obteniendo unas concentraciones plasmáticas medias de 1.76 ± 0.21 µg/ml en valle (24 h tras la administración) y de 3.02 ± 0.23 µg/ml en pico (2.5 h tras cada administración). Estos resultados sugieren que un periodo interdosis de 24 h resulta en un régimen posológico eficiente y seguro para la administración del meloxicam a dosis de 1.5 mg/kg por vía IM en el tiburón alitán.

Para completar este primer capítulo de tesis, y tras los buenos resultados obtenidos en el alitán, se realizó un estudio en la raya mosaico, en condiciones similares a las de los ensayos realizados en el tiburón alitán. Se administró meloxicam a dosis de 1.5 mg/kg por vía IM (la posología que mejores resultados había producido en el alitán) en siete ejemplares adultos y clínicamente sanos de raya mosaico. Se tomaron muestras de sangre antes y durante diez tiempos de muestreo predeterminados dentro de las 48 h tras la administración (15, 30, 60 y 90 min, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 h). Se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: C_{max} resultó 1.84 ± 0.31 μg/ml, T_{max} 1.5 ± 0.24 h, $t_{1/2\beta}$ 3.55 ± 0.65 h, y 5.37 ± 0.94 h para el MRT. Al igual que en el tiburón alitán, no se detectaron reacciones adversas en esta especie y las concentraciones plasmáticas obtenidas fueron relativamente altas, resultando superiores a las establecidas como mínimas eficaces en otras especies. Sin embargo, se encontraron importantes diferencias interespecíficas en cuanto la $t_{1/2\beta}$ y el tiempo medio de residencia, que sugieren una eliminación del meloxicam significativamente más rápida en la raya mosaico, comparada con el tiburón alitán.

Este primer capítulo de la tesis aporta resultados importantes que deben ser considerados para la optimización de la posología del antiinflamatorio meloxicam en tiburones y rayas, además de evidenciar las importantes diferencias interespecíficas en cuanto a la disposición de fármaco en elasmobranquios y la necesidad de realizar futuros estudios fármacocinéticos y farmacodinámicos, de toxicidad y de eficacia con meloxicam en este grupo de animales.

Segundo capítulo

El segundo capítulo de esta tesis trata de describir la analítica sanguínea y establecer valores de referencia para los principales parámetros hematológicos, bioquímicos y de electroforesis de proteínas en las dos especies de elasmobranquio estudiadas: el tiburón alitán y la raya mosaico. Los valores de referencia se han determinado siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP, por sus siglas en inglés). Este capítulo surge de la necesidad de aportar valores de referencia específicos en este grupo de animales, debido a que los elasmobranquios presentan diferencias interespecíficas muy marcadas en cuanto a su analítica sanguínea, unida a la dificultad de conseguir poblaciones grandes y homogéneas de tiburones y rayas para determinar valores de referencia fiables.

Para determinar los valores de referencia para hematología y bioquímica plasmática en la raya mosaico, se utilizó una población homogénea y estable de 43 rayas mosaico juveniles mantenidas bajo cuidado humano en el Oceanogràfic de Valencia (23 machos y 20 hembras, clasificadas en dos grupos: 28 rayas de un año y 15 rayas de dos años de edad). Todos los animales incluidos en el estudio habían sido previamente clasificados como clínicamente sanos, tras la evaluación detallada del historial médico de cada individuo y la realización de un examen físico individual completo. Para el estudio, se capturó a los animales individualmente, utilizando un salabre de plástico, y se extrajo una muestra de 1 ml de sangre de cada individuo, que fue directamente transferida a un tubo de 1 ml con heparina de litio como anticoagulante.

Las muestras se procesaron directamente tras la extracción, en el laboratorio de la clínica veterinaria del Oceanogràfic, adyacente a las instalaciones donde se mantenían los animales. El análisis hematológico se realizó de manera manual. Se detectaron cuatro tipos de glóbulos blancos en la raya mosaico, siendo el linfocito el leucocito predominante en sangre periférica con una mediana (intervalo de referencia) de 59 (42-76) %, seguido de los granulocitos de gránulos eosinófilos finos con 27 (11-44) %, los granulocitos de gránulos eosinófilos gruesos con 11 (4-18) % y de un bajo número de monocitos con 2 (0-6) %. La mediana (intervalo de referencia) para el hematocrito fue de 0.15 (0.10-0.20) l/l, los sólidos totales en plasma fueron 70.0 (56.0-80.0) g/l y los recuentos totales de eritrocitos y de leucocitos, 250.0 (171.0-339.0) x 10^9 células/l y 4.25 (1.65-10.52) x 10^9 células/l, respectivamente.

Los resultados de los principales parámetros bioquímicos resultaron: 88.9 (50.2-170.4) U/l para la fosfatasa alcalina, 0.9 (0.0-2.6) U/l para la alanina aminotransferasa, 16.1 (6.1-40.8) U/l para la aspartato aminotransferasa, 423.2 (401.0-444.9) mmol/l de nitrógeno ureico en sangre, 4.12 (3.82-4.42) mmol/l para el calcio, 8.04 (3.69-12.22) mmol/l de colesterol, 261.7 (248.5-274.9) mmol/l para el cloro, 5.08 (0.97-9.47) µmol/l para el hierro, 1.32 (0.57-2.01) mmol/l para la glucosa, 2.4 (2.0-2.9) mmol/l para el potasio, 269.0 (258.6-278.6) mmol/l de sodio, 2.32 (1.48-3.06) mmol/l para el fósforo, 29.0 (22.0-36.0) g/l de proteína total y 5.72 (2.67-9.21) mmol/l de triglicéridos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los valores bioquímicos entre sexos, ni para los valores hematológicos o bioquímicos entre los subgrupos de 1 *vs* 2 años en las rayas juveniles. Los valores obtenidos en las 43 rayas fueron comparados con los

valores analíticos obtenidos de siete rayas mosaico adultas clínicamente sanas (tres hembras y cuatro machos), encontrando diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sólidos totales en plasma, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico sanguíneo, cloro y sodio. Este estudio realiza una discusión detallada sobre la posible influencia de los distintos factores intrínsecos y extrínsecos en los parámetros de la analítica sanguínea en elasmobranquios. Además, muestra las limitaciones de la mayoría de los estudios que determinan valores de referencia sanguíneos en elasmobranquios, al utilizar poblaciones de referencia pequeñas y existir importantes variaciones interindividuales e interespecíficas en las especies de elasmobranquio estudiadas.

En el siguiente estudio, los valores de referencia hematológicos y bioquímicos se determinaron en el tiburón alitán utilizando una población de 94 ejemplares (47 machos y 47 hembras), formada por 54 adultos (29 machos y 25 hembras) y 40 subadultos (18 machos y 22 hembras). La población de referencia de ejemplares de tiburón alitán utilizada para este estudio se consiguió gracias a la colaboración de cinco acuarios españoles: Ocenaogràfic de Valencia, Finisterrae Aquarium, Bioparc Acuario de Gijón, Museo Martítimo del Cantábrico y Acuario de Sevilla. Se preparó un equipo de muestreo portátil y se procedió a la toma de muestras en cada uno de los acuarios, realizando la captura individual de los tiburones con un salabre de plástico, seguido de la extracción de 1 ml de sangre y la toma de medidas morfométricas, con la ayuda del equipo técnico de cada acuario. El análisis hematológico manual se realizó en el laboratorio de la clínica veterinaria de cada uno de los acuarios directamente tras la extracción. Se extrajo el plasma mediante centrifugación, que fue congelado y transportado al laboratorio de la clínica veterinaria del Oceanogràfic, donde se realizó su análisis bioquímico utilizando un analizador de bioquímica automático.

Los valores de los principales tipos de leucocitos fueron similares a los previamente descritos en otros tiburones carcharínidos, siendo los linfocitos las células blancas predominantes con una mediana (intervalo de referencia) de 38 (28-53) %, seguidos de los granulocitos de gránulos eosinófilos gruesos con 20 (12-32) %, los granulocitos de gránulos eosinófilos finos con 6 (1-13) %, monocitos con 2 (0-6) %, y neutrófilos con 2 (0-6) %. Este estudio muestra que el tiburón alitán produce trombocitos granulados, que fueron clasificados como granulocitos y representaban el 28 (12-40) % de todos los

leucocitos. La mediana (intervalo de referencia) del hematocrito fue de 0.17 (0.15-0.20) l/l, los sólidos totales en plasma resultaron 58.0 (50.0-66.0) g/l, los recuentos manuales totales de eritrocitos y leucocitos fueron 177.50 (132.50-210.00) x 10^9 células/l y 8.26 (5.24-14.23) x 10^9 células/l, respectivamente.

La mediana de los principales parámetros de bioquímica plasmática fue de 7.7 (4.2-13.0) U/l para la fosfatasa alcalina, 7.6 (3.3-17.1) U/l para la aspartato aminotransferasa, 281.6 (261.2-305.0) mmol/l de nitrógeno ureico en sangre, 3.97 (3.59-4.47) mmol/l para el calcio, 2.04 (1.02-3.91) mmol/l de colesterol, 233.0 (215.2-259.0) mmol/l para el cloro, 3.79 (1.74-6.93) µmol/l para el hierro, 0.87 (0.47-1.44) mmol/l para la glucosa, 3.8 (2.9-4.6) mmol/l para el potasio, 243.0 (227.7-271.0) mmol/l de sodio, 1.58 (1.13-2.10) mmol/l para el fósforo, 24.0 (20.0-35.0) g/l de proteína total y 0.97 (0.49-3.35) mmol/l de triglicéridos. Los niveles de creatina quinasa, gamma-glutamiltransferasa y lactato deshidrogenasa se mantuvieron por debajo del rango de lectura del aparataje científico utilizado. Al igual que en otros estudios previos en elasmobranquios, en este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores hematológicos entre sexos o estadios de desarrollo para el tiburón alitán. En los parámetros bioquímicos, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los niveles de colesterol, que fueron mayores en alitanes machos comparados con las hembras.

La obtención de valores de referencia en raya mosaico y en tiburón alitán, utilizando poblaciones grandes y homogéneas, mantenidas en condiciones ambientales equivalentes, y obtenidos siguiendo el mismo protocolo de muestreo y procesado de las muestras, permitió la comparación interespecífica detallada de los principales parámetros hematológicos y bioquímicos. Esta comparación es de interés, ya que se trata de dos especies de elasmobranquio que pertenecen a órdenes distintos (orden *Rajiformes*, en el caso de la raya mosaico, y orden *Carcharhiniformes* en el tiburón alitán), pero que presentan una distribución, dieta y modo de vida semejante (al ser ambas especies bentónicas, ovíparas y de metabolismo similar). En la comparación de valores hematológicos entre ambas especies, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todos los parámetros estudiados en ambas especies, siendo los recuentos totales de eritrocitos similares a los obtenidos previamente en otras especies bentónicas, e inferiores a los previamente determinados en elasmobranquios pelágicos. Los recuentos totales de glóbulos blancos fueron significativamente superiores en el

tiburón alitán en comparación con la raya mosaico, posiblemente influenciados por la presencia de trombocitos granulados en el primero, y estando los valores de ambas especies comprendidos entre los números previamente descritos en otras especies de elasmobranquio. Las diferencias en los recuentos diferenciales entre ambas especies fueron especialmente notables en los recuentos de granulocitos, ya que en el tiburón alitán se detectaron cuatro tipos de granulocitos, mientras que en la raya mosaico se detectaron únicamente dos. Ambas especies producen altos porcentajes de linfocitos, con un bajo porcentaje de monocitos. Los valores para los principales parámetros bioquímicos también mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies para todos los analitos estudiados, siendo un claro ejemplo de las importantes diferencias interespecíficas existentes en elasmobranquios y cómo estas pueden limitar la extrapolación de los intervalos de referencia entre especies.

Tras la determinación de los valores de referencia para hematología y bioquímica plasmática en las dos especies estudiadas, se realizó un tercer estudio para ampliar los conocimientos en cuanto a electroforesis de proteínas en elasmobranquios. En este tercer estudio del segundo capítulo, se describieron los electroforetogramas de las dos especies de elasmobranquio estudiadas en esta tesis, comparándolas y determinando valores de referencia a nivel especie. El estudio se realizó con las muestras de 48 ejemplares de raya mosaico (27 machos y 21 hembras) y 62 ejemplares de tiburón alitán (32 machos y 30 hembras), utilizando las muestras de plasma que habían sido tomadas en los estudios anteriores, y descartando las muestras que producían curvas aberrantes en el electroforetograma. Las muestras de plasma se analizaron mediante electroforesis de zona capilar (CZE). Los electroforetogramas de la raya mosaico mostraron siete fracciones consistentes y que se repitieron en todos los animales, mientras que los del tiburón alitán presentaron ocho fracciones consistentes y repetidas en todos los ejemplares del estudio. Las fracciones del electroforetograma en la raya mosaico presentaron los siguientes intervalos de referencia (%; g/l): fracción 1 (0.1-1.0 %; 0.0-0.3 g/l), fracción 2 (4.5-24.0 %; 1.3-7.6 g/l), fracción 3 (36.2-48.7 %; 8.9-17.0 g/l), fracción 4 (24.8-42.0 %; 6.1-14.6 g/l), fracción 5 (2.3-8.4 %; 0.7-2.4 g/l), fracción 6 (1.5-8.2 %; 0.4-2.7 g/l), fracción 7 (0.8-3.1 %; 0.2-0.9 g/l). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos ni etapas de desarrollo. En el tiburón alitán, los intervalos de referencia fueron: fracción 1 (0.3-1.5 %; 0.1-0.4 g/l), fracción 2 (0.8-3.7 %; 0.2-1.0 g/l), fracción 3 (6.2-13.8 %; 1.2- 3.7 g/l, fracción 4 (17.6-33.6 %; 4.3-9.9 g/l), fracción 5 (20.0-34.8 %; 4.7-10.9

g/l), fracción 6 (8.1-19.6 %; 1.4-5.1 g/ l), fracción 7 (5.6-24.0 %; 1.3-6.3 g/l), fracción 8 (2.2-8.6 %; 0.3-2.4 g/l). El porcentaje de la fracción 5 resultó significativamente mayor en los tiburones juveniles en comparación con los adultos, mientras que la concentración y el porcentaje de la fracción 6 resultó significativamente mayor en adultos comparada con juveniles. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, siendo el porcentaje correspondiente a la fracción 4 significativamente superior en machos. Como ya se había descrito anteriormente en un gran número de especies de elasmobranquios, no se detectó una banda en el electroforetograma que migrara en la región correspondiente a la albúmina. Las proteínas migrando en la región correspondiente a las globulinas alfa predominaron en la raya mosaico, mientras que las globulinas beta fueron las predominantes en el tiburón alitán. La fracción correspondiente a las gamma globulinas fue fácilmente identificable en ambas especies y conservada en todos los animales muestreados. Se detectaron diferencias interespecíficas estadísticamente significativas para los porcentajes y concentraciones de todas las fracciones del electroforetograma entre las dos especies estudiadas.

Este trabajo es el primero en determinar valores de referencia para hematología, bioquímica plasmática y electroforesis de proteínas en el tiburón alitán y la raya mosaico, además de ser el primero en aportar valores de electroforesis de proteínas utilizando electroforesis de zona capilar en elasmobranquios. Estos resultados contribuyen a aumentar el conocimiento clínico sobre el análisis de sangre en tiburones y rayas. Los intervalos de referencia definidos en esta tesis con unas poblaciones de 43 rayas mosaico y 94 tiburones alitán suponen una importante aportación a la todavía limitada lista de especies de elasmobranquio de la que existen valores de referencia. Se espera que estos datos sirvan como una valiosa herramienta de diagnóstico e investigación para los profesionales que trabajan con alitanes y con rayas mosaico, tanto en individuos mantenidos en acuarios como en poblaciones de vida silvestre. La determinación de valores de referencia específicos y fiables también será de utilidad en la evaluación de efectos no deseados tras la administración de tratamientos medicamentosos. Las importantes variaciones interespecíficas observadas en cuanto a hematología, bioquímica y electroforesis de proteínas en estos animales muestran la necesidad de realizar más estudios que utilicen mayores poblaciones de referencia de diferentes especies, para así determinar intervalos de referencia específicos que sean precisos y fiables.

I ABSTRACT

This Doctoral Thesis provides new knowledge regarding the clinical and therapeutic management of elasmobranchs (sharks, rays, and skates) in order to support, on a scientific basis, the daily clinical procedures developed by veterinarians working with this taxonomic group. On the one hand, our work increases the diagnostic capacity in elasmobranchs by analyzing and determining species-specific blood values with the aim of facilitating the clinical interpretation of their blood tests. On the other hand, our work increases the therapeutic capacity by proposing pharmacotherapeutic protocols based on the kinetic behavior study of one of the most clinically used drugs in these species, the anti-inflammatory drug meloxicam. In the development of this thesis, two species of elasmobranch have been used that have served as a model: the nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*) and the undulate skate (*Raja undulata*), as they are found in Spanish coastal waters, they are frequently maintained in European aquariums; they are medium sized, and have an easy handling and husbandry.

The experimental protocols, sample analysis and data collection necessary to develop this Doctoral Thesis have been carried out at the facilities of Oceanogràfic of Valencia, the laboratory of the Department of Pharmacology and Toxicology of the Faculty of Veterinary Medicine of the Complutense University of Madrid, and the Department of Pharmacology of the Faculty of Medicine of the University of Valencia. In addition, collaborations have been established and samplings have been carried out in different aquariums: Oceanogràfic (Valencia, Spain), Finisterrae Aquarium (Coruña, Spain), Bioparc Gijón Aquarium (Gijón, Spain), Museo Marítimo del Cantábrico (Santander, Spain), Seville Aquarium (Seville, Spain), Oceanario de Lisboa (Lisbon, Portugal), and Poema del Mar (Gran Canaria, Spain).

The thesis consists of two parts or chapters:

First chapter

The first chapter studies the pharmacokinetic properties of the anti-inflammatory drug meloxicam in sharks and skates. Meloxicam was chosen as the object of study because it is one of the most widely used anti-inflammatory drugs in elasmobranchs and because

inflammatory and infectious pathologies are the most frequently diagnosed in this taxonomic group.

First, the pharmacokinetics of meloxicam administered via different routes (intravenous, intramuscular and oral) were studied in eight adult and clinically healthy nursehound shark individuals at a dosage of 0.5 mg/kg, leaving a minimum washout time of four weeks between studies. Blood samples of 0.4 ml were obtained before and at predetermined times after each administration (10, 20 and 40 min, 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36 and 48 h after IV administration; 15 and 30 min, 1, 3, 6, 9, 12 and 24 h after IM administration; and 15 and 30 min, 1, 3, 6, 9, 12, 24 and 48 h after PO administration). Plasma concentrations of meloxicam were determined using a previously validated high performance liquid chromatography (HPLC) method for the detection of meloxicam in shark plasma, and pharmacokinetic parameters were obtained using a non-compartmental model. Orally administered meloxicam did not produce detectable concentrations in plasma, while the mean maximum plasma concentration (C_{max}) was 0.38 ± 0.08 μg/ml after IM administration, reached at a mean time (T_{max}) of 2.68 ± 1.81 h. The mean elimination half-life ($t_{1/2\beta}$) was 10.71 ± 2.77 h and 11.27 ± 3.96 h for IV and IM administration, respectively. The mean bioavailability of meloxicam was 56.22 ± 13.29 % after IM administration, being very similar to that described in bony fish. The results of this first study support meloxicam as a promising drug to be used IM in the nursehound shark and motivated the continuation of this research line within this thesis. These results also call into question the efficacy of oral meloxicam use in elasmobranchs and suggest the need for higher dosage regimens for this drug, evidencing that the currently indicated posology regimens for meloxicam in elasmobranchs may not be adequate, and showing the need further pharmacokinetic studies in elasmobranchs.

After these first studies, due to the good kinetic parameters observed after IM administration and the absence of adverse effects, but the relatively low plasma concentrations detected, it was decided to increase the dose of meloxicam to 1.5 mg/kg and administer it IM in nursehound shark, evaluating the possible adverse effects that could result from its administration. For this second experimental part, meloxicam was administered IM at a dose of 1.5 mg/kg to a group of six nursehound sharks, while an elasmobranch physiological saline solution was administered to two individuals, also IM, as a negative control group. Blood samples were obtained before and at 12 predetermined

times within the first 36 h after administration (15, 30, 45, 60 and 90 min, 2, 4, 6, 9, 12, 24 and 36 h). Effects on hematology and plasma biochemistry were compared before and 24 h after administration. No externally observable adverse effects were detected during the study and there were no significant differences in blood tests associated with the administration of meloxicam. The T_{max} was 2.58 ± 0.47 h, the C_{max} was 0.81 ± 0.07 µg/ml, $t_{1/2\beta}$ was 15.97 ± 1.20 h, and mean residence time was 23.40 ± 2.25 h. These results suggest that meloxicam administered IM at a dose of 1.5 mg/kg in nursehound shark could produce clinically relevant plasma levels over 24 h periods without causing significant alterations in blood tests.

The good results obtained in the second experimental part led us to study the kinetics of meloxicam administered intramuscularly following a multiple dose protocol, consisting in the administration of 1.5 mg/kg IM every 24 h in a group of eight nursehound shark over a period of seven days (seven consecutive doses). Samples were collected at 2.5 h (previously determined T_{max}) and 24 h (minimum concentration) after each of the drug administrations. In addition, after a four-week washout period, we conducted a complementary study in which we administered meloxicam orally at 1.5 mg/kg every 12 h for three consecutive doses, taking samples before and at predetermined times within 48 h after first administration. To the authors' knowledge, this was the first multiple-dose pharmacokinetic study with meloxicam in fish, and no clinical signs or adverse effects associated with meloxicam administration or handling required for the study were noted. Orally administered meloxicam did not produce detectable concentrations in nursehound shark plasma. After IM administration, steady state was reached after five consecutive doses, obtaining a mean plasma concentration of 1.76 ± 0.21 µg/ml at trough (24 h after administration) and 3.02 ± 0.23 µg/ml at peak (2.5 h after administration). These results suggest that an inter-dose period of 24 h could result in an efficient and safe dosing regimen for the administration of meloxicam at a dose of 1.5 mg/kg IM in the nursehound shark.

To complete this first chapter of the thesis, and after the good results obtained in the nursehound shark, a study was carried out in undulate skates maintained under equivalent conditions to those of the tests carried out in the nursehound shark. Meloxicam was administered at a dose of 1.5 mg/kg IM (the dosage that had produced the best results in the nursehound) in seven clinically healthy adult undulate skates. Blood samples were

collected before and at ten predetermined sampling times within 48 h after administration (15, 30, 60 and 90 min, 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h). The following pharmacokinetic parameters were obtained: C_{max} was 1.84 ± 0.31 μg/ml, T_{max} was 1.5 ± 0.24 h, $t_{1/2\beta}$ was 3.55 ± 0.65 h, and mean residency time resulted 5.37 ± 0.94 h. As in the nursehound shark, no adverse reactions were detected in this species and the plasma concentrations were higher than those established as minimum effective in other species. However, significant interspecific differences were found in $t_{1/2\beta}$ and mean residence time, suggesting a significantly faster elimination of meloxicam in undulate skates compared to nursehound shark.

This first chapter of the thesis provides important results that should be considered for the optimization of the dosage regimes of the anti-inflammatory drug meloxicam in sharks and skates. In addition, this chapter shows the important interspecific differences in terms of drug kinetics in elasmobranchs, and the need to carry out future kinetic, efficacy, pharmacodynamic, and toxicity studies with meloxicam in this group of animals.

Second chapter

The second chapter of this thesis tries to describe elasmobranch blood analysis and establishes reference values for the main hematological, biochemical, and plasma protein electrophoresis parameters in the two elasmobranch species studied: the nursehound shark and the undulate skate. The reference values were determined following the recommendations of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP). This chapter arises from the need to provide specific and reliable reference values in this group of animals, since elasmobranchs present very marked interspecific differences in their blood tests, together with the difficulty of obtaining large and homogeneous populations of sharks and skates to allow the determination of reliable reference values.

To determine the reference values for hematology and plasma biochemistry in the undulate skate, a homogeneous and stable population of 43 juvenile undulate skates maintained at the Oceanogràfic of Valencia (23 males and 20 females, classified into two groups: 28 one-year-old and 15 two-year-old individuals) was used. All the animals included in the study have been previously classified as clinically healthy after a detailed evaluation of their individual medical history and a thorough physical examination. For this study, the animals were captured individually using a plastic net,

and a sample of 1 ml of blood was extracted from each individual, which was directly transferred to a 1 ml tube with lithium heparin as anticoagulant.

Blood samples were processed directly after extraction in the laboratory of the veterinary clinic of the Oceanogràfic, adjacent to the facilities where the animals were housed. Hematological analysis was performed manually. Four types of white blood cells were detected in the undulate skate. Lymphocyte resulted the predominant leukocyte in peripheral blood, with a median (reference interval) of 59 (42-76) %, followed by fine eosinophilic granulocyte with 27 (11-44) %, coarse eosinophilic granulocyte with 11 (4-18) %, and of a low number of monocytes with 2 (0-6) %. Median (reference interval) for hematocrit was 0.15 (0.10-0.20) l/l, plasma total solids resulted 70.0 (56.0-80.0) g/l, total erythrocyte and leukocyte counts were 250.0 (171.0-339.0) x 10^9 cells/l and 4.25 (1.65-10.52) x 10^9 cells/l, respectively.

The results of the main biochemical parameters were: 88.9 (50.2-170.4) U/l for alkaline phosphatase, 0.9 (0.0-2.6) U/l for alanine aminotransferase, 16.1 (6.1-40.8) U/l for aspartate aminotransferase , 423.2 (401.0-444.9) mmol/l for blood urea nitrogen, 4.12 (3.82-4.42) mmol/l for calcium, 8.04 (3.69-12.22) mmol/l cholesterol, 261.7 (248.5-274.9) mmol/l for chlorine, 5.08 (0.97-9.47) µmol/l for iron, 1.32 (0.57-2.01) mmol/l for glucose, 2.4 (2.0-2.9) mmol/l for potassium, 269.0 (258.6- 278.6) mmol/l for sodium, 2.32 (1.48-3.06) mmol/l for phosphorus, 29.0 (22.0-36.0) g/l for total protein and 5.72 (2.67-9.21) mmol/l for triglycerides. No statistically significant differences were detected in any of the evaluated biochemical values between the sexes, nor in the hematological or biochemical values between the subgroups of 1 *vs* 2 years in the juvenile skates. The values obtained in the 43 skates were compared with the analytical values obtained from seven clinically healthy adult undulate skates (three females and four males), finding statistically significant differences in the levels of total solids in plasma, cholesterol, triglycerides, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, chloride, and sodium. This study carries out a detailed discussion on the possible influence of the different intrinsic and extrinsic factors in elasmobranch blood analysis. In addition, it shows some important limitations present in most studies determining blood reference values in elasmobranchs, as they frequently use small reference populations and there are important interindividual and interspecific variations in the elasmobranch species studied.

In the second study included in this chapter, hematological and biochemical reference values were determined in the nursehound shark using a population of 94 (47 males and 47 females), consisting of 54 adults (29 males and 25 females) and 40 subadults (18 males and 22 females). The nursehound shark reference population was achieved thanks to the collaborations arranged between five different Spanish aquariums: Ocenaogràfic de Valencia, Finisterrae Aquarium, Bioparc Acuario de Gijón, Museo Martítimo del Cantábrico and Acuario de Sevilla. A portable sampling and blood processing kit was prepared, and samples were collected in each of the aquariums. Sample collection consisted of capturing individual sharks with a plastic net, followed by the extraction of 1 ml of blood, and collection of morphometric measurements with the help of the professional team of each aquarium. Manual hematological analysis was carried out in the laboratory of the veterinary clinic of each one of the aquariums directly after blood extraction. Plasma was extracted by centrifugation, which was then frozen and transported to the laboratory of the veterinary clinic of the Oceanogràfic in Valencia, where biochemical analysis was carried out using an automatic biochemical analyzer.

The median values for the main types of leukocytes were similar to those previously described in other carcharhinid sharks, with lymphocytes being the predominant white blood cells with 38 (28-53) %, followed by coarse eosinophilic granulocytes with 20 (12-32) %, fine eosinophilic granulocytes with 6 (1-13) %, monocytes with 2 (0-6) % and neutrophils with 2 (0-6) %. This study shows that the nursehound shark produces granulated thrombocytes, which were classified as granulocytes and represented 28 (12-40) % of all leukocytes. Median (reference interval) hematocrit was 0.17 (0.15-0.20) l/l, plasma total solids were 58.0 (50.0-66.0) g/l, total manual erythrocyte and leukocyte counts were 177.50 (132.50-210.00) x 10^9 cells/l and 8.26 (5.24-14.23) x 10^9 cells/l, respectively.

The median (reference interval) of the main plasma biochemistry parameters resulted 7.7 (4.2-13.0) U/l alkaline phosphatase, 7.6 (3.3-17.1) U/l aspartate aminotransferase, 281.6 (261.2-305.0) mmol/l nitrogen blood urea, 3.97 (3.59-4.47) mmol/l calcium, 2.04 (1.02-3.91) mmol/l cholesterol, 233.0 (215.2-259.0) mmol/l chloride, 3.79 (1.74- 6.93) µmol/ l iron, 0.87 (0.47-1.44) mmol/l glucose, 3.8 (2.9-4.6) mmol/l potassium, 243.0 (227.7-271.0) mmol/l sodium, 1.58 (1.13- 2.10) mmol/l phosphorus, 24.0 (20.0-35.0) g/l total protein and 0.97 (0.49-3.35) mmol/l triglycerides.

Creatine kinase, gamma-glutamyl transferase, and lactate dehydrogenase levels were below the reading range of the scientific biochemistry apparatus used. As in other previous studies with elasmobranch, in this study no statistically significant differences were found for hematological values between sexes nor developmental stages in the nursehound shark. In plasma chemistry parameters, statistically significant differences were only found for cholesterol levels, which were higher in male nursehound compared to female.

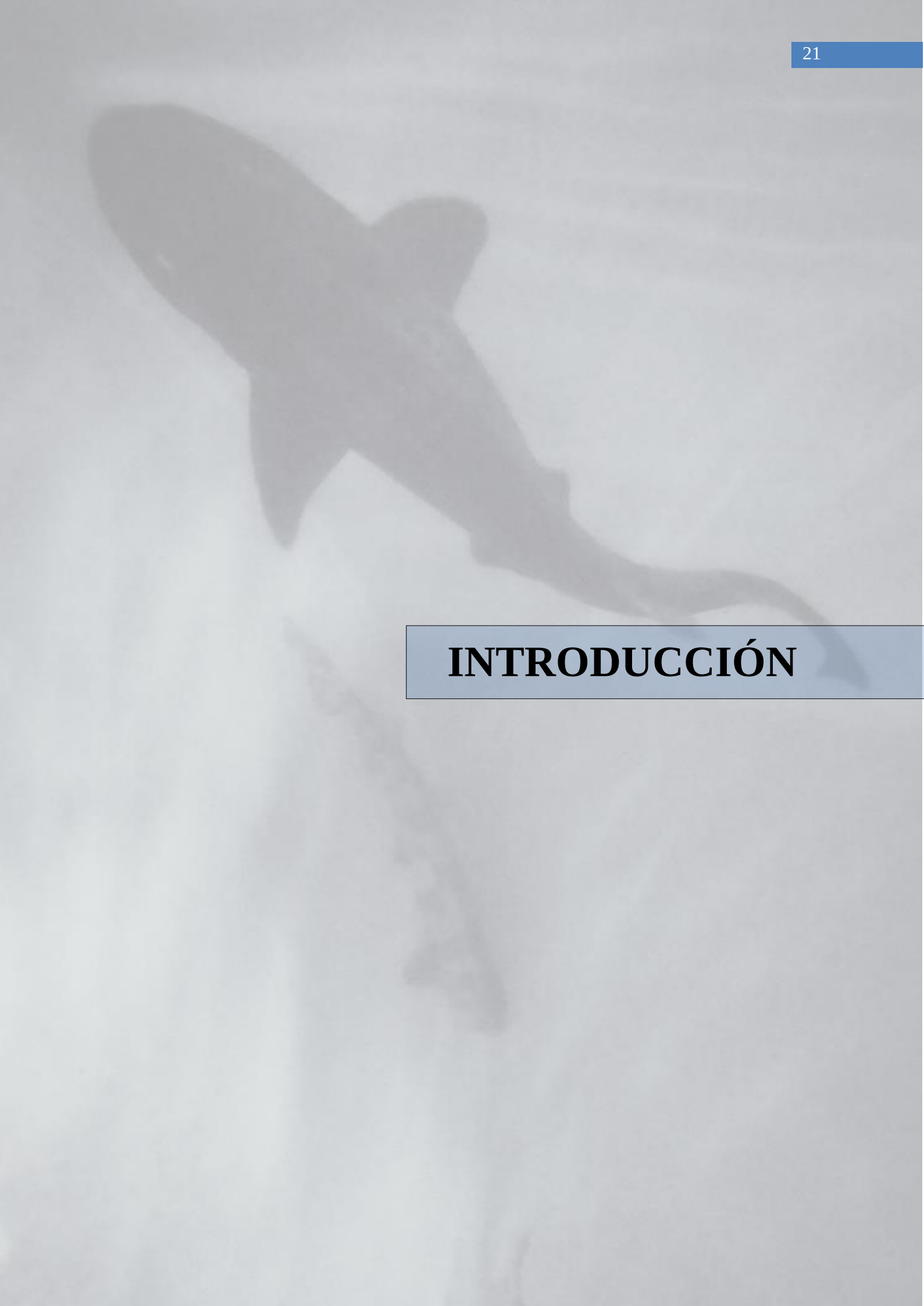
The obtention of reference values in the undulate skate and the nursehound shark using large and homogeneous populations maintained in equivalent environmental conditions and determined following the same sampling and sample processing protocol, allowed for a detailed interspecific comparison of the main hematological and biochemical parameters. This comparison is of interest, since the studied species belong to different orders (order *Rajiformes*, in the case of the undulate skate, and order *Carcharhiniformes* in the nursehound shark), but that present a similar distribution, diet, physiology and lifestyle (as both species are benthic, oviparous, and with a similar metabolism). When comparing hematology values between both species, important differences were found in all the parameters studied, with similar total erythrocyte counts to those previously obtained in other benthic species, and lower than those previously determined in pelagic elasmobranchs. Total white blood cell counts were significantly higher in the nursehound shark compared to the undulate skates, probably influenced by the presence of granulated thrombocytes in the first. The values determined for both species were kept between the numbers previously described in other elasmobranch species. The variations detected in the leukocyte differential counts between both species were especially notable in the granulocyte counts, since four types of granulocytes were detected in the nursehound shark, while only two were detected in the undulate skate. Both species produced high percentages of lymphocytes and a low percentage of monocytes. Main biochemical parameters also showed important differences between both species for all the analytes studied, being a clear example of the important interspecific differences existing in elasmobranchs and how these differences can limit blood baseline values and reference interval extrapolation between species.

After determining the reference values for hematology and plasma biochemistry in the two species studied, we conducted a third study in which we sought to expand the

knowledge regarding plasma protein electrophoresis in elasmobranchs. In this last study, we described the electrophoretograms of the two elasmobranch species studied, compared them and determined species-specific reference values. The study was carried out with a reference population of 48 undulate skate (27 males and 21 females) and 62 nursehound shark (32 males and 30 females), using the plasma samples that have been collected in previous studies, and discarding the samples that produced aberrant curves in the electrophoretogram. Plasma samples were analyzed by capillary zone electrophoresis (CZE), representing the first published study using this electrophoresis technique in elasmobranch plasma. Undulate skate electrophoretograms showed seven consistent fractions that occurred in all animals, while those of the nursehound shark showed eight consistent fractions. Undulate skate electrophoretogram fractions presented the following reference intervals (%; g/l): fraction 1 (0.1-1.0 %; 0.0-0.3 g/l), fraction 2 (4.5-24.0%; 1.3-7.6 g /l), fraction 3 (36.2-48.7 %; 8.9-17.0 g/l), fraction 4 (24.8-42.0 %; 6.1-14.6 g/l), fraction 5 (2.3-8.4 %; 0.7-2.4 g/l), fraction 6 (1.5-8.2 %; 0.4-2.7 g/l), fraction 7 (0.8-3.1 %; 0.2-0.9 g/l). No statistically significant differences were detected between sexes or developmental stages. In the nursehound shark, the reference intervals were: fraction 1 (0.3-1.5 %; 0.1-0.4 g/l), fraction 2 (0.8-3.7 %; 0.2-1.0 g/l), fraction 3 (6.2-13.8 % 1.2- 3.7 g/l, fraction 4 (17.6-33.6 %; 4.3-9.9 g/l), fraction 5 (20.0-34.8 %; 4.7-10.9 g/l), fraction 6 (8.1-19.6 %; 1.4- 5.1 g/l), fraction 7 (5.6-24.0 %; 1.3-6.3 g/l), fraction 8 (2.2-8.6 %; 0.3-2.4 g/l) The percentage of fraction 5 was significantly higher in juvenile sharks compared to adults, while the concentration and percentage of fraction 6 was significantly higher in adult sharks compared to juveniles. Statistically significant differences were also detected between sexes, with the percentage of fraction 4 being significantly higher in male sharks.

As previously described in a large number of elasmobranch species, no migrating electrophoretogram band was detected in the region corresponding to albumin. Proteins migrating in the region corresponding to alpha globulins were predominant in the undulate skate, while beta globulins prevailed in the nursehound shark. The fraction corresponding to gamma globulins was easily identifiable in both species and was preserved in all animals sampled. Statistically significant interspecific differences were detected for the percentages and concentrations of all electrophoretogram fractions between the two species studied.

This work is the first to determine reference values for hematology, plasma biochemistry and plasma protein electrophoresis in the two species studied, as well as being the first to provide protein electrophoresis values using capillary zone electrophoresis in elasmobranchs. All the data generated will contribute to increasing the clinical knowledge on blood analysis in sharks and skates. The reference intervals defined in this thesis using a population of 43 undulate skates and 94 nursehound sharks represent an important contribution to the still limited list of elasmobranch species for which reference values exist. These data are expected to serve as a valuable diagnostic and research tool for professionals working with these species, including individuals maintained in aquariums as well as free-ranging populations. The determination of specific and reliable reference values will also be useful in the evaluation of adverse effects after the administration of drug treatments. The important interspecific variations observed in terms of hematology, biochemistry and protein electrophoresis in these animals show the need for further studies using larger reference populations of different species to determine specific reference intervals that are accurate and reliable.



INTRODUCCIÓN

II INTRODUCCIÓN

A Elasmobranquios y su situación actual

A.1 Situación global de los elasmobranquios *in situ*

Los elasmobranquios (Subclase *Elasmobranchii*) comprenden más de 1100 especies de tiburones y rayas [1,2]. Se trata de peces condrictios (Clase *Chondrichthyes*), con un esqueleto compuesto por tejido cartilaginoso, que existen desde hace 400 millones de años (Periodo Devónico) [3,4]. Estudios paleontológicos sugieren que estos animales tuvieron un éxito temprano en su nicho ecológico, por lo que ha habido poca presión selectiva y escasas modificaciones desde su origen [5]. Se caracterizan por no presentar vejiga natatoria, lo que junto a su esqueleto cartilaginoso les diferencia de los peces teleósteos. Tampoco poseen pulmones, respirando a través de cinco a siete pares de branquias, con sus respectivas hendiduras branquiales. La piel de los tiburones, a diferencia de la mayoría de rayas, está formada por escamas placoideas o dentículos dérmicos, de origen ectodérmico y compuestos por dentina, que los protegen frente a depredadores y ectoparásitos, a la vez que mejoran sus características hidrodinámicas [6]. Algunas especies de raya del orden *Rajiformes*, también cuentan con placas dérmicas, cuya función es principalmente defensiva [7]. Incluso algunas especies como las pintarrojas (*Scyliorhinus canicula*) utilizan los dentículos dérmicos próximos a su aleta caudal para la alimentación, sujetando con ellos las piezas de alimento y así poder desgarrarlas [8].

Los tiburones (superorden *Selachimorpha*) comprenden unas 536 especies, mientras que las rayas y otras especies batoideas (superorden *Batoidea*) incluyen más de 633 especies [2]. Las hendiduras branquiales se sitúan en los tiburones en una posición lateral, craneal a las aletas pectorales. En los batoideos, las hendiduras branquiales ocupan una posición ventral. Los elasmobranquios poseen además unas aberturas superficiales denominadas espiráculos, que se encuentran en la cabeza próximas a los ojos y que comunican el exterior con la cavidad bucal y las branquias. Estos espiráculos, que están más desarrollados en las especies bentónicas, permiten la ventilación forzada mediante el bombeo bucal, en el que el agua entra a través de los espiráculos y es expulsada a través de las branquias. Este tipo de ventilación forzada permite la respiración cuando el animal no está en movimiento, e incluso cuando está enterrado parcialmente en el sedimento del

fondo [9]. La reproducción de estos animales es muy variada, existiendo especies ovíparas, vivíparas y ovovivíparas, siendo en todos los casos la fecundación interna [10]. Se caracterizan además por poseer un sistema sensorial electrorreceptor, compuesto por unos órganos especializados llamados ampollas de Lorenzini, que se localizan principalmente en la cabeza y que utilizan para detectar los campos electromagnéticos de sus potenciales presas en entornos de poca visibilidad, además de tener una gran sensibilidad a cambios de temperatura [11].

La Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN Red List) considera a fecha de noviembre de 2021, 167 especies de tiburón y 220 especies de raya como "amenazadas" [12]. La sobrepesca, unida a la destrucción de los hábitats y ecosistemas marinos, ligadas a las bajas tasas reproductivas de este grupo de animales, convierte a los elasmobranquios en animales especialmente vulnerables [13]. Por otro lado, el desconocimiento de los elasmobranquios, junto con la falta de literatura clínica y terapéutica, también contribuyen a reducir la viabilidad de sus poblaciones [14,15]. El 45 % de todas las especies de elasmobranquios conocidos se consideran como "datos deficientes" por la IUCN; este porcentaje de falta de información sobre su estatus de conservación es el mayor entre vertebrados. Dado que los tiburones desempeñan un rol imprescindible en la parte superior de la cadena alimenticia manteniendo los ecosistemas marinos sanos, la pérdida de tiburones supone una pérdida muy importante de biodiversidad, ya que lleva a un desequilibrio del resto de especies [13]. La conservación *in situ* de estos animales está fuertemente ligada al aumento en el conocimiento a través de la investigación de estas especies, la regulación de la pesca excesiva de estos animales y la conservación de sus hábitats [12,13].

A.2 Situación global de los elasmobranquios mantenidos *ex situ*

Los elasmobranquios, aunque todavía enigmáticos, continúan ganando popularidad en los acuarios públicos como exhibición educativa carismática y en el mundo de la investigación [16,17]. Con los avances en la clínica, el manejo y la cría, las instalaciones se están volviendo más eficaces para mantener a estos animales [18]. Esto no siempre ha sido así. Los primeros acuarios construidos antes de 1860, que eran bastante estáticos y donde el agua aún se renovaba con poca frecuencia y de forma manual, únicamente

conseguían mantener los animales vivos durante unas pocas semanas, siendo estos reemplazados por nuevos animales capturados del medio natural [19]. Más tarde, los elasmobranquios comenzaron a exhibirse en acuarios públicos y centros marinos de investigación; algunos de estos centros demostraron gran habilidad para mantener estas especies, y consiguieron mantener con éxito diversos especímenes durante años [19].

Los primeros acuarios públicos en mantener elasmobranquios fueron el Acuario de Hamburgo, Alemania (1864), el Acuario Boulevard Montarte de París, Francia (1867), el Aquario de Berlín, Alemania (1867) y los Acuarios de Blackpool y Brighton, en Reino Unido (1873), iniciando una etapa en la que el interés en las exhibiciones de vida marina abiertas al público aumentó rápidamente [19,20]. Con el crecimiento que experimentaron estos centros en finales del siglo XIX, se implementaron nuevas técnicas de tratamiento de aguas, mejoras en los procedimientos de captura y mantenimiento de estos animales, protocolos de alimentación, las técnicas divulgativas y de exhibición. Además de esto, la gran posibilidad que supuso el mantenimiento de estos animales en acuarios permitió el aprendizaje de la biología de estas especies, sus pautas alimenticias e incluso reproductivas. Así, en 1873, el naturalista Henry Lee documentó en el acuario de Brighton por primera vez a un alitán (*Scyliorhinus stellaris*) realizando la puesta de huevos. Hasta entonces, aunque se había documentado la presencia de huevos de tiburón y raya en las algas, playas y rocas en el medio natural, se desconocía cómo se realizaba este proceso [19]. Este evento lejano es un claro ejemplo del potencial de los acuarios como centros de investigación y de educación.

Actualmente, los acuarios siguen siendo aliados indispensables para la conservación *ex situ* de los elasmobranquios, actuando como una herramienta de exhibición educativa y de concienciación, además de desempeñar una importante función en el mantenimiento de un *pool* genético al que poder recurrir en un momento dado y con fines de investigación [21]. Además, el mantenimiento de elasmobranquios *ex situ*, permite la realización de proyectos de conservación y reintroducción en el hábitat natural, como el desarrollado por el Oceanogràfic de Valencia que, mediante la incubación controlada de los huevos de tiburón y raya y la posterior suelta en el Mediterráneo, constituye una de las principales iniciativas en este ámbito a nivel nacional e internacional [22]. En este contexto, es necesario seguir avanzando en el conocimiento en cuanto a la patología de estos animales y su manejo clínico y terapéutico.

A.3 Interés de las especies utilizadas en esta tesis

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizaron como especies modelo el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*), por ser especies presentes en las costas españolas, mantenidas con frecuencia en acuarios europeos y que por su tamaño medio y su fácil manejo son ideales para la realización de los estudios requeridos para desarrollar este doctorado [19,23–25]. Los alitanes pertenecen a la familia de tiburones escilorrínidos (*Scyliorhinidae*), una familia de elasmobranquios del orden *Carcharhiniforme*s, también conocidos como peces gato por sus grandes ojos [26]. Esta familia incluye más de 110 especies de tiburones, entre los que hemos seleccionado al tiburón alitán como especie modelo por su popularidad en los acuarios de cara al público, gracias a su llamativo aspecto físico y coloración con un patrón moteado. Además, tiene un tamaño medio y resulta de fácil manejo y mantenimiento bajo cuidado humano [19,27].

Si nos centramos en las especies estudiadas en detalle, el tiburón alitán es uno de los miembros más grandes de la familia *Scyliorhinidae*, que llega a alcanzar los 150 cm de longitud [27]. Su distribución geográfica se muestra en la Figura 1. La especie habita las aguas costeras del Atlántico Este, distribuyéndose por la plataforma continental desde Escandinavia hasta Senegal, pudiendo encontrarlo también a lo largo del Mediterráneo. Suele habitar en aguas poco profundas de 1 metro y hasta profundidades de 125 metros. Es una especie que se captura con frecuencia de manera accidental en la pesca de arrastre de fondo y la pesca con redes de enmalle, lo que supone uno de los principales riesgos para su población. Debido al aislamiento de sus poblaciones en focos o localizaciones específicas, la capacidad de recuperación se ve afectada por el nivel de interconectividad entre estas poblaciones aisladas, principalmente entre las que se encuentran en aguas costeras de las diferentes islas y las del continente [23]. Actualmente, se dispone de muy poca documentación en cuanto a su biología, procediendo esta información principalmente de observaciones realizadas en acuarios [28]. Debido a la escasez de datos *in situ* de esta especie y la evidencia de una disminución de sus poblaciones en algunas

áreas del Mediterráneo, la Lista Roja de la IUCN sitúa a esta especie como "casi amenazada" y hace hincapié en la necesidad de aumentar su conocimiento [23].



Figura 1. Distribución del tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris). Fuente: IUCN [23].

Con el fin de ampliar el espectro de especies estudiadas, se utilizaron especies de género *Raja* sp. (rayas verdaderas), en concreto la raya mosaico [7]. Pertenece al orden *Rajiformes*, que es el orden más grande de elasmobranquios de todos los existentes y comprende casi 300 especies [29]. Como puede apreciarse en la Figura 2, su distribución geográfica incluye el Océano Atlántico nororiental, desde el suroeste de Irlanda y el sur de Inglaterra hasta la costa occidental de África, así como las aguas del Mediterráneo. Aunque, al igual que el alitán, es mantenida con frecuencia en acuarios y se reporta como una captura accidental importante en algunas regiones de su distribución, sigue siendo una de las rayas menos estudiadas en esta zona geográfica [30,31]. La especie se encuentra en zonas costeras y de profundidad inferior a los 100 metros, aunque puede habitar hasta profundidades de 200 metros. Como muchas otras rayas verdaderas (*Raja spp.*), la raya mosaico es una especie ovípara y con fecundación interna, depositando las hembras un número aproximado de 30 huevos entre los meses de marzo y septiembre. Como la mayoría de elasmobranquios, esta especie posee unas características que la hacen más vulnerable a su explotación, reducen su tasa de recuperación y aumentan el riesgo de extinción. Estas son: su distribución parcheada e irregular, su madurez sexual tardía (las hembras maduran aproximadamente a los 9 años y los machos a los 8 años, con una

esperanza de vida de 13 años), su crecimiento lento y gran tamaño requerido para la reproducción (longitud total de 84 cm), su baja fecundidad y, en consecuencia, el lento crecimiento de la población [12,27]. Por todas estas razones, la especie figura como "en peligro" en la Lista Roja de la IUCN (www.iucnredlist.org; consultada en octubre de 2022), donde se solicita la realización de futuras investigaciones que aumenten el conocimiento de esta especie [24,32].



Figura 2. Distribución de la raya mosaico (Raja undulata). Fuente: IUCN [32].

B Características anatómicas, fisiológicas y del entorno en elasmobranquios y cómo afectan a su manejo farmacoterapéutico

La respuesta a un fármaco depende de muchos factores, como su absorción, la temperatura corporal, la biotransformación hepática, la función renal, el tipo y distribución del receptor del fármaco y la vía y lugar de administración [33,34]. Las peculiaridades anatómicas, fisiológicas y medioambientales de las distintas especies de elasmobranquios pueden condicionar enormemente el comportamiento y la eficacia de los fármacos administrados [35]. Por ello, cobra especial importancia determinar los perfiles farmacocinéticos en cada especie, y valorar la posibilidad o no de extrapolar los regímenes terapéuticos a partir de los utilizados en otras especies [35,36].

B.1 Sistema digestivo

El aparato digestivo de los tiburones se muestra en la Figura 3, y consiste en diferentes estructuras aisladas y órganos asociados, algunos genuinos de los elasmobranquios, que no aparecen en otras especies animales. Cada órgano cumple funciones específicas en la digestión. Los tiburones y rayas poseen un esófago corto, en muchos casos prácticamente inexistente, que comunica la cavidad oral con el estómago, el cual es muy voluminoso y tiene forma de "J". La combinación de un esófago corto y un estómago grande y expansible permite a los elasmobranquios el almacenamiento de grandes presas o cantidades de alimento [37]. Estas características anatómicas les permiten regurgitar con facilidad elementos que no puedan digerir, lo que supone una complicación a la hora de administrar fármacos o marcas de seguimiento por vía oral, siendo necesaria la observación detallada del animal tras la administración, para evitar la regurgitación voluntaria tras la administración ligada o no a manejo [35]. El tiempo que pasa el alimento en el estómago depende de varios factores incluyendo la especie, la tipología del alimento consumido, la temperatura del agua y la capacidad del individuo para regular su temperatura corporal. En algunas especies la temperatura intragástrica puede verse incrementada con respecto al medio aumentando la velocidad de digestión como en el caso del marrajo o del tiburón blanco [38]. El estómago está comunicado con el duodeno a través de un píloro o anillo muscular de pequeño diámetro, y el duodeno está a su vez conectado con la vesícula biliar y con el páncreas, que en tiburones es bilobulado. El intestino es corto y voluminoso, y cuenta con un sistema casi exclusivo y muy desarrollado: la válvula espiral, que permite aumentar la superficie de absorción de nutrientes sin necesidad de alargar el intestino como en el caso de los mamíferos. El número de vueltas que presenta la válvula espiral varía de una especie a otra; pudiendo afectar estas variaciones a la absorción de los fármacos administrados por vía oral [35,39]. El recto desemboca en la cloaca, una cámara donde en la mayoría de las especies también desembocan los aparatos urinario y genital. La cloaca se abre al exterior a través del poro anal, abertura situada entre las aletas pélvicas [40].

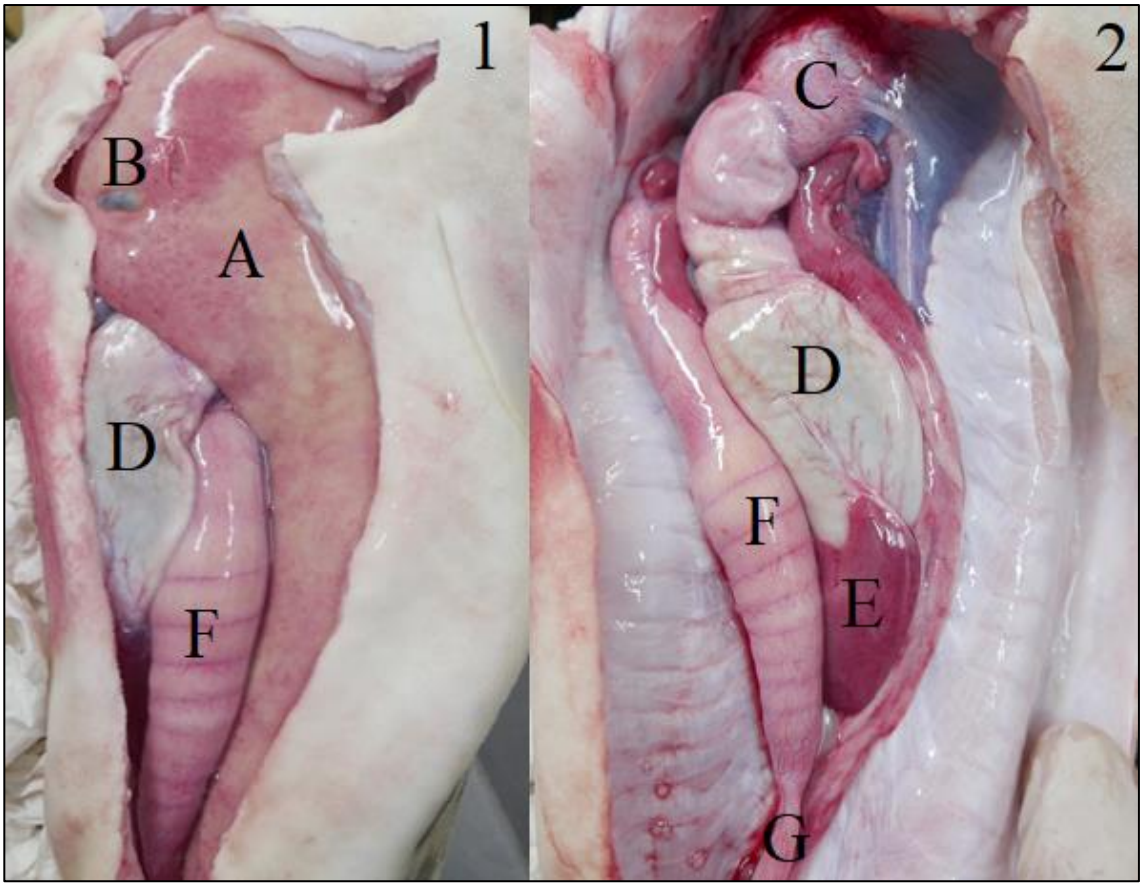


Figura 3. Cavidad celómica de un alitán (Scyliorhinus stellaris) macho, antes (1) y después (2) de retirar el hígado, vista ventro-dorsal. Nótese el gran tamaño del hígado (A), con vesícula biliar (B). Como en otras especies de elasmobranquio, el esófago (C) es muy corto. Se aprecia el gran estómago en forma de "J" (D), rodeado por el bazo (E) y la válvula espiral (F), que discurre cráneo-caudal a lo largo de la cavidad celómica, desembocando en el recto (G).

El tamaño y la composición del hígado en elasmobranquios dependen de la especie, y puede representar hasta el 23 % del peso corporal, pudiendo estar la mayor parte (hasta el 80 %) compuesta de lípidos [41]. Los elasmobranquios carecen de tejido adiposo cavitario perivisceral o subcutáneo, almacenando los lípidos fundamentalmente en los hepatocitos [6]. La proporción de pigmentos biliares en elasmobranquios varía entre las diferentes especies, predominando en algunas de ellas como el torpedo del pacífico (*Torpedo californicus*) la biliverdina, un pigmento producido a partir de la hemoglobina por la hemoglobin-oxigenasa, que es soluble en agua y fácilmente eliminado a través de la orina [42,43]. Dentro de los elasmobranquios, la cantidad de exposición celular hepática, así como la cantidad y proporción de lípidos, pueden influir en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los medicamentos [36]. Además, el metabolismo energético de los elasmobranquios es inusual entre los vertebrados, al caracterizarse por la ausencia de oxidación de ácidos grasos en el músculo esquelético o

cardiaco, y la alta dependencia de cuerpos cetónicos y aminoácidos como fuentes oxidativas en estos tejidos. La organización de este metabolismo energético se refleja con niveles plasmáticos bajos de ácidos grasos no esterificados y niveles de cuerpos cetónicos como el ß-hidroxibutirato, que son tan altos como los encontrados en mamíferos o teleósteos sometidos a ayuno, por lo que la preferencia por la oxidación de cuerpos cetónicos en los elasmobranquios frente a ácidos grasos parece ser opuesta a la situación encontrada en teleósteos y otros vertebrados [44]. El hígado actúa además como depósito de lípidos en los elasmobranquios, teniendo también funciones relacionadas con la regulación de la flotación del animal [40,41].

B.2 Sistema cardiovascular

La circulación de los elasmobranquios no es doble, sino sencilla. Su corazón se encuentra en la cavidad pericárdica y consta de cuatro cámaras. La sangre venosa procedente del cuerpo pasa al seno venoso, una estructura en forma de saco, y con paredes finas, que está unida al septo transverso y que comunica directamente con la segunda cámara, el atrio. El atrio es la segunda mayor cámara, es de paredes musculares, aunque no tan gruesas como las del ventrículo y comunica directamente con éste. El ventrículo es la mayor cámara muscular, y conecta cranealmente con el cono arterioso, una estructura muscular tubular y de gran elasticidad, a través de la cual la sangre abandona el corazón y entra en la aorta ventral [38]. (Figura 4).

Una vez que la sangre abandona el corazón, pasa por la aorta ventral hacia las arterias branquiales aferentes, ocurriendo el intercambio gaseoso en las laminillas branquiales, y recogiendo la sangre oxigenada posteriormente a través de cuatro pares de arterias branquiales eferentes [45]. La sangre procedente de las arterias branquiales eferentes desemboca en la aorta dorsal, que discurre caudalmente y suministra sangre oxigenada a la mayor parte del cuerpo a través de diferentes ramas. La rama más caudal de la aorta dorsal es la arteria caudal, que es la continuación de la aorta hasta la aleta caudal del animal [45].

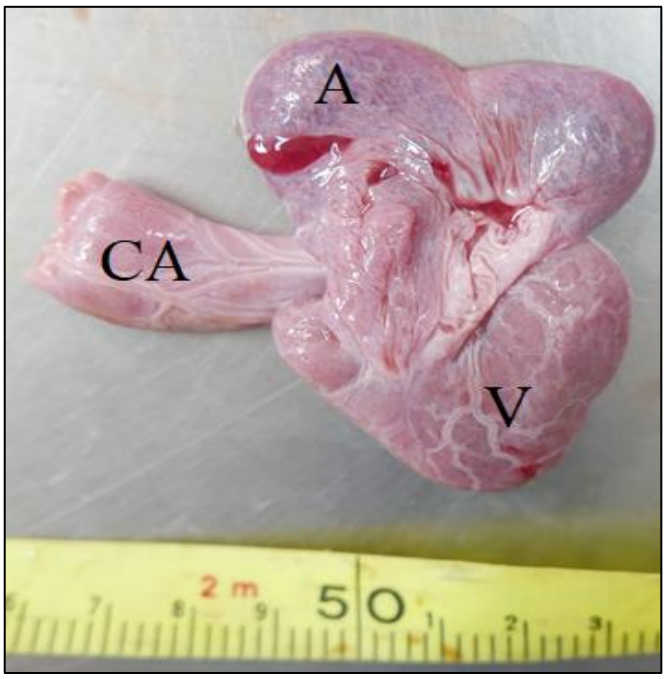


Figura 4. Corazón de un tiburón ángel (Squatina squatina), vista dorso-ventral, craneal hacia la izquierda. El animal (no incluido en el presente estudio) murió en el Oceanogràfic de Valencia donde se procedió a la realización del estudio post mortem. Nótese el atrio (A), el ventrículo (V), y el cono arterioso (CA).

El retorno venoso en elasmobranquios incluye un sistema portal hepático y sistema portal renal. El sistema portal hepático devuelve la sangre procedente del sistema digestivo al bazo y al hígado, donde los nutrientes presentes en la sangre son procesados antes de que esta ingrese en el corazón. El vaso principal del sistema portal hepático es la vena portal hepática, que discurre junto al ligamento gastrohepatoduodenal, pegado a la arteria hepática y a la sección anterior del conducto biliar [38,45].

El sistema portal renal recoge la sangre procedente de la aleta caudal, que pasa por los riñones a través del sistema portal renal, antes de regresar al corazón a través de las venas y senos posteriores cardinales. Las principales venas del sistema portal renal son la vena caudal y las venas renales portales, que son una bifurcación de la primera [45]. Además de los dos sistemas portales, existen venas sistémicas, que recogen la sangre del resto del cuerpo (la sangre que no procede de las vísceras). El sistema venoso de los elasmobranquios desemboca en el seno venoso del corazón, estructura en la que también desemboca la vena hepática. Desde el seno venoso, el circuito se cierra y la sangre pasará al atrio para volver a ser bombeada [45,46].

Es importante mencionar en este apartado que la arteria caudal, junto con la vena caudal, que discurre ventral a la primera, forman el arco hemal caudal, que constituye el punto de venopunción más comúnmente utilizado para la extracción de sangre, de acceso más sencillo e indicado en elasmobranquios de pequeño y mediano tamaño [47,48] Se puede acceder a este vaso sanguíneo en los peces a través de un abordaje ventral (el más común e intuitivo ya que es simétrico y bastará con entrar de manera perpendicular con la aguja hasta alcanzar el vaso) o un abordaje lateral (más difícil, ya que es asimétrico y requiere de más experiencia). Como se muestra en la Figura 5, el muestreo lateral puede resultar en una menor cantidad de tejido muscular traumatizado y permitir el uso de agujas más cortas en muchas especies de elasmobranquios. El abordaje lateral del arco hemal caudal puede ser útil para reducir el trauma tisular durante los procedimientos que requieren muestras de sangre frecuentes, como los estudios de farmacocinética (Figuras 6-8). Otros sitios de flebotomía en elasmobranquios incluyen las venas de la aleta pectoral, indicado en rayas águila, móbulas y tiburones de gran tamaño como el tiburón ballena (*Rhyncodon typus*). Se pueden usar otros sitios de flebotomía como son los senos venosos generalmente de las aletas dorsales; sin embargo, los valores hematológicos de diferentes sitios varían y pueden no ser comparables, por lo que es muy importante especificar el punto de extracción en estos animales [49].

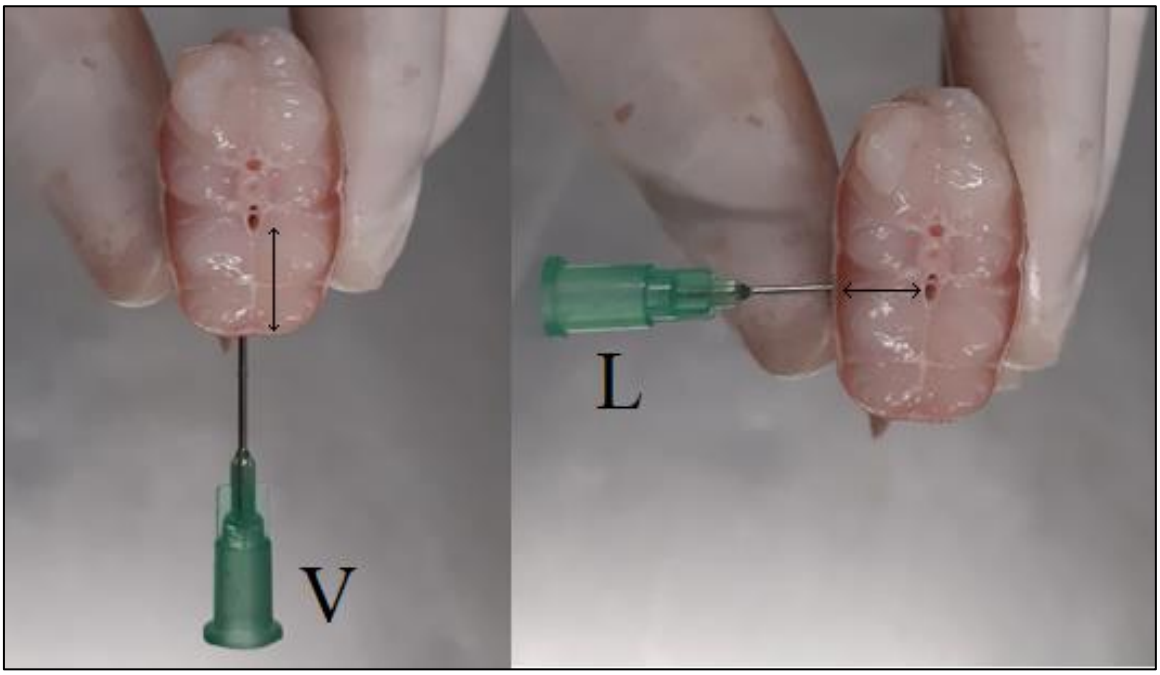


Figura 5. Corte transversal caudal en alitán (Scyliorhinus stellaris), dorsal está arriba y ventral abajo. Detalle del lugar indicado para la venopunción en elasmobranquios: accesos ventral (V) y lateral (L).. Nótese que al realizar el acceso lateral del vaso para la venopunción, la cantidad de tejido muscular a traumatizar para acceder al vaso es menor que en el acceso ventral.



Figura 6. Punto indicado de venopunción en tiburón de puntas negras de arrecife (Carcharhinus melanopterus). El animal pereció en las instalaciones del Oceanográfic durante el periodo de estancia de doctorado, por lo que durante el examen post mortem en fresco se procedió a poner en práctica y optimizar las técnicas de venopunción en estos animales.



Figura 7. Detalle de la venopunción y extracción de sangre post mortem de un alitán (Scyliorhinus stellaris) no perteneciente al grupo de animales utilizados en el estudio de esta tesis. El animal murió en el Oceanogràfic durante el periodo de estudios predoctorales, por lo que se utilizó la oportunidad para mejorar el protocolo de extracción de sangre.



Figura 8. Manejo y extracción de sangre en tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) macho adulto en las instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic. Nótese que el animal es colocado en decúbito dorsal para inducir la inmovilidad tónica y es mantenido con la cabeza y las branquias sumergidas mientras se realiza la extracción mediante un acceso lateral a la vasculatura caudal.

B.3 Sistema excretor

El riñón de los peces es muy diferente al de los mamíferos: tiene una tasa de filtración más alta y una selectividad de filtración, secreción y reabsorción diferentes [50]. Estas importantes diferencias pueden afectar a las tasas de eliminación de los fármacos que son excretados en menor o mayor medida en orina [60]. El riñón de los elasmobranquios no produce una orina hipertónica como en aves y mamíferos, sino que, como una adaptación para mantener la homeostasis osmótica e iónica, los elasmobranquios son capaces de mantener altas concentraciones de urea y óxido de trimetilamina en su plasma y tejidos, con el objetivo de mantener una osmolaridad similar o ligeramente superior a la del agua que les rodea [51]. Estas diferencias pueden influir en las tasas de eliminación de los fármacos, así como en la ausencia de eficacia de otros que ejercen su acción de forma directa o indirecta sobre este órgano. Además, el sistema porta-renal de los elasmobranquios permite que la sangre de la mitad caudal del animal drene directamente

a los riñones; esto puede aumentar la nefrotoxicidad o la excreción renal presistémica de fármacos y modificar su distribución y, por tanto, las características cinéticas y dinámicas del fármaco [35,36]. Dado que el lugar indicado para la administración intravenosa en elasmobranquios son los vasos caudales (situados en la mitad posterior del animal) y para la administración intramuscular es la musculatura epaxial, lateral a la aleta dorsal (también en la mitad caudal del animal), esta administración puede estar afectada por el sistema porta-renal y su efecto debe ser tenido en cuenta [35]. Actualmente no hay estudios que evalúen las diferencias entre administraciones de fármacos en la mitad craneal y caudal de tiburones y rayas, por lo que serían necesarios futuros ensayos para descartar una posible interacción del sistema porta-renal en la distribución y eliminación de ciertos fármacos en este grupo de animales.

Al analizar el sistema excretor y cómo puede afectar al manejo terapéutico de los elasmobranquios, también se debe tener en cuenta el sistema porta-hepático, descrito en el apartado de sistema cardiovascular, que recoge la sangre del tracto digestivo para ser procesada en el hígado antes de pasar a circulación sistémica [38]. Este sistema porta hepático puede producir la degradación de parte o la totalidad del fármaco administrado por vía oral, produciendo una eliminación pre sistémica o fenómeno del primer paso. El fenómeno del primer paso hepático puede anular la biodisponibilidad oral aunque el fármaco se haya absorbido bien, y debe ser tenido en cuenta en los estudios farmacocinéticos que impliquen la vía oral [52].

Mientras que la osmolaridad en elasmobranquios es superior a la del medio, las concentraciones de NaCl en plasma son inferiores a las del agua salada, por lo que los elasmobranquios marinos se ven expuestos a una absorción de sodio y cloro, que sucede principalmente a través de las branquias [53]. El exceso de NaCl es excretado a través de un órgano especializado: la glándula rectal. La glándula rectal de los elasmobranquios es un importante órgano osmoregulador, está implicada en la excreción activa de sales desde la sangre al recto, en la porción terminal del tracto digestivo, y ha demostrado realizar también una excreción activa y específica de muchos xenobióticos [53,54].

B.4 Metabolismo

Los procesos bioquímicos y metabólicos en los elasmobranquios presentan también diferencias muy notables frente al resto de vertebrados, muchas de ellas relacionadas con el inusual sistema de solutos que utiliza urea y metilaminas, y que afecta al metabolismo de los lípidos, los cuerpos cetónicos y los aminoácidos. Además de la peculiar organización metabólica, las variaciones en la estructura de las proteínas, la presencia de menos isoformas en algunas de sus enzimas, unidas a la estructura y funcionalidad única de sus membranas biológicas, pueden interferir decisivamente en el comportamiento cinético de múltiples sustancias y dar lugar a importantes diferencias entre los elasmobranquios y otras especies de vertebrados [55]. En elasmobranquios, los aminoácidos (especialmente la glutamina y el aspartato), donan nitrógeno para la síntesis de urea, que ocurre en el hígado y posiblemente también en el músculo. Los aminoácidos son también de gran importancia para la síntesis de cuerpos cetónicos en el hígado, dependiendo el músculo esquelético y cardiaco en gran medida de los cuerpos cetónicos y los aminoácidos como combustibles oxidativos [55]. Esto se refleja en unos altos niveles plasmáticos del cuerpo cetónico ß-hidroxibutirato en elasmobranquios sanos y bien nutridos, con concentraciones tan altas como las detectadas en mamíferos emaciados. Actualmente se cree que los elasmobranquios utilizan el metabolito β-hidroxibutirato en vez de los ácidos grasos como fuente de combustible predominante en los tejidos extrahepáticos [56]. Además, estudios previos han demostrado que la mayoría de las especies de elasmobranquios no tienen niveles detectables de ácidos grasos no esterificados (ni de sus respectivas proteínas de unión), encontrando que la albúmina está ausente en una gran variedad de especies de condrictios, incluidos tiburones y rayas [57,58]. Los altos niveles de urea que acompañan a la osmorregulación basada en urea en los elasmobranquios posiblemente hayan limitado la unión de ácidos grasos por parte de la albúmina, lo que conduce a un transporte deficiente y a la pérdida evolutiva de albúmina y oxidación de ácidos grasos extrahepáticos. En cambio, los altos niveles de urea favorecen el uso de los cuerpos cetónicos altamente solubles y los aminoácidos, cuyo transporte no requiere portadores como la albúmina [44]. La ausencia de albúmina también puede influir en el transporte de xenobióticos, aumentando el porcentaje de sustancias libres y potencialmente activas en plasma.

Empíricamente, se han utilizado los niveles de urea para evaluar el estado nutricional de los elasmobranquios, ya que sus niveles parecen disminuir en animales emaciados [59]. Sin embargo, estudios realizados con elasmobranquios mantenidos en ayunas muestran resultados dudosos, con niveles de urea relativamente estables en la mielga (*Squalus acanthias*) [60]. En elasmobranquios marinos, ocurre una pérdida continua de urea al entorno con fines de osmorregulación, principalmente a través de las branquias y en menor medida a través del riñón [61]. Los riñones regulan las concentraciones plasmáticas, al ser la mayor parte de la urea reabsorbida en los túbulos renales [62]. Los elasmobranquios marinos son capaces de sintetizar urea en el hígado mediante el ciclo de la ornitina a través del catabolismo de las proteínas, con niveles de nitrógeno producidos que superan los niveles de nitrógeno perdidos incluso tras 25 días de ayuno [44,62]. Al contrario que en teleósteos en ayunas, en los que se utilizan inicialmente los lípidos, seguidos de los carbohidratos y por último las proteínas, los elasmobranquios utilizan el catabolismo de proteínas y la oxidación de aminoácidos, no sólo como fuentes de energía, sino también para contribuir a la síntesis de urea y compensar su pérdida [44]. Unas concentraciones bajas de urea podrían indicar daño renal o una reducción en la síntesis asociada a disfunción hepática, más allá de un pobre estado nutricional. Por todo esto, la interpretación de los niveles de urea en elasmobranquios debe realizarse con cautela, siendo necesarios futuros estudios que evalúen en detalle el impacto de diferentes estados fisiológicos, patológicos, nutricionales y el efecto de las condiciones ambientales en las variaciones en los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo en elasmobranquios.

Si nos centramos en la actividad metabólica, aunque comparar las tasas metabólicas entre diferentes especies animales es muy difícil debido a las importantes variaciones en las técnicas experimentales, condiciones ambientales y los requisitos individuales, existen estudios que han examinado cualitativa y cuantitativamente las tendencias metabólicas y los requisitos energéticos en los elasmobranquios [63]. En estos individuos, el consumo de oxígeno se utiliza como medida de la actividad metabólica, mediante el cual se han reportado grandes variaciones en las tasas metabólicas estándar entre distintas especies [63]. Se ha observado un metabolismo más alto en las especies pelágicas que son nadadores continuos y de ventilación forzada (“ventiladores ram”); por ejemplo, el marrajo (*Isurus oxyrhinchus*) tiene un consumo de oxígeno de 240 mgO_2/kgh) en comparación con especies bentónicas y menos activas como el pez guitarra menor (*Rhinobatus annulatus*) con un consumo de oxígeno de 61 mgO_2/kgh [63]. Las

mencionadas variaciones interespecíficas en las tasas metabólicas también deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los diferentes fármacos en elasmobranquios.

B.5 Factores medioambientales

Además de los factores biológicos y fisiológicos mencionados, los factores medioambientales también pueden originar diferencias intra e interespecíficas en la eficacia de los tratamientos farmacológicos y en la disposición cinética de los principios activos. Es necesario por tanto tener en cuenta otro grupo de factores medioambientales que pueden alterar en gran medida la eficacia de los fármacos en los elasmobranquios. Entre estos factores ambientales se encuentran las características del agua (temperatura, pH, salinidad y contenido mineral total) así como la composición y calidad de la dieta [64]. Estudios realizados administrando ciprofloxacino en peces gato africanos (*Clarias gariepinus*) muestran que las características químicas del agua, tales como la cantidad de calcio disuelto, la alcalinidad y el pH, son factores que pueden reducir la eficacia o incrementar los efectos tóxicos de algunos fármacos administrados, ya que estos factores pueden afectar a la absorción, distribución, metabolismo y modo de excreción (es decir, hepático, branquial y/o o renal) de cada principio activo de manera diferente [65].

Otro factor ambiental importante a tener en cuenta es la temperatura del agua, dado que la mayoría de los elasmobranquios son poiquilotermos; es decir, que carecen de los mecanismos necesarios para regular su temperatura corporal, por lo que esta depende íntegramente de la temperatura ambiente [63]. Se ha documentado la termorregulación conductual en los tiburones de puntas negras de arrecife (*Carcharhinus melanopterus*), siendo la temperatura del agua uno de los principales determinantes físicos de su comportamiento, por lo que estos tiburones se desplazan y modifican su ubicación según la temperatura del agua [66]. Debido a que la temperatura del agua disminuye a medida que se gana profundidad, esto podría explicar que algunas especies de tiburones poiquilotérmicos como el tiburón ballena (*Rhincodon typus*), requieren la realización de ascensos frecuentes a aguas de poca profundidad y mayor temperatura, que podrían estar relacionadas con la recuperación de la temperatura corporal perdida durante las inmersiones a gran profundidad [67]. Sin embargo, algunas especies como el marrajo

(*Isurus oxyrinchus*); y el tiburón blanco, (*Carcharodon carcharias*) tienen capacidades endotérmicas, que les permiten aumentar su temperatura corporal con respecto a la del medio [63]. En estos animales, las temperaturas cerebrales se encuentran casi a 6° C por encima de la temperatura ambiente; este incremento de temperatura también se mide en el ojo, el músculo rojo y partes del hígado, el estómago (hasta 7.4 ºC superior al medio) y la válvula espiral [38,68]. El sistema circulatorio de estos tiburones con capacidades endotérmicas, contiene una *rete mirabile* (del latín "red maravillosa") situada en las vísceras y en la musculatura dorso-lateral, que actúa como intercambiador de calor; las arterias en esta red vascular transportan sangre fría y alta en oxígeno, que proviene de las branquias, mientras que las venas transportan sangre caliente pero baja en oxígeno debido a la actividad metabólica; al pasar los capilares arteriosos y venosos muy cerca, ocurre la transferencia de calor, que puede ser devuelta al músculo y vísceras [68]. Este mecanismo permite a estas especies retener el calor generado durante la natación y por la actividad metabólica, y así elevar la temperatura de sus músculos y vísceras, lo que permite aumentar su metabolismo [69]. La temperatura corporal determina la actividad enzimática y, por lo tanto, influye en la eliminación del fármaco y la duración del efecto, por lo que es importante conocer la temperatura a la que se encuentran los animales, además de la capacidad termorreguladora de la especie a tratar y cómo puede afectar a la farmacocinética y farmacodinamia de los principios activos administrados [35,36].

Por los motivos mencionados, el manejo terapéutico de la enfermedad en elasmobranquios tendrá un componente farmacológico y un componente de manejo y control de las condiciones ambientales; la combinación de ambos enfoques es necesaria para la efectividad del tratamiento y resolución favorable de la enfermedad [35].

C Analítica sanguínea y valores de referencia en elasmobranquios

Las crecientes expectativas en el mantenimiento de animales acuáticos (incluidos los elasmobranquios) bajo cuidado humano, unidas a las necesidades de una atención médica veterinaria de alta calidad, han requerido que más profesionales se involucren en el manejo clínico de los elasmobranquios y se optimicen las técnicas de diagnóstico y tratamiento de sus enfermedades [18]. Gracias a los conocimientos médicos y la tecnología veterinaria moderna, está mejorando nuestra capacidad para comprender y

monitorizar la salud de los elasmobranquios y así mejorar su manejo médico [58,70]. Cada vez son más frecuentes los programas de medicina preventiva en elasmobranquios mantenidos *ex situ* en acuarios públicos, y también se están realizando estudios de salud poblacional *in situ* [76,84,86,87,96]. Como parte de estos programas, los exámenes de rutina, que incluyen exámenes físicos detallados y análisis de sangre, están cobrando cada vez más importancia [71].

La extracción de sangre y la realización de una analítica sanguínea lo más completa posible debe incluirse en los chequeos veterinarios de rutina de este grupo de animales, ya que el diagnóstico de enfermedades en los peces puede ser un desafío y el análisis de sangre aporta información importante y que puede ser clave para la correcta evaluación del estado de salud de estos animales [17,47,72]. Para este propósito, la determinación de valores de referencia en sangre proporciona una herramienta importante para los veterinarios, biólogos y profesionales que trabajan con elasmobranquios mantenidos en acuarios y en el medio natural [47]. Actualmente, los valores de referencia representan la herramienta más utilizada para la interpretación de los resultados analíticos individuales, y, por lo general, se expresan como intervalos que comprenden el 90-95 % de una población de referencia sana [73,74]. Después de la introducción del concepto en la medicina humana (1969), se determinaron rápidamente valores de referencia para los seres humanos y la mayoría de las especies de animales de compañía [75–78]. Sin embargo, todavía se carece de valores de referencia fiables para muchas de las especies acuáticas y exóticas [79].

A pesar del uso universalmente aceptado de los valores de referencia basados en poblaciones homogéneas sanas, a menudo se discute el método óptimo para su determinación [74]. Aunque con frecuencia se recomienda una población de referencia de 120 individuos para el establecimiento de valores de referencia a nivel de especie, el uso de un número menor de individuos se acepta en aquellas especies en las que resulta muy difícil conseguir un gran número de especímenes que puedan actuar como población de referencia, siendo muchas de estas especies de animales no domésticos [72,73]. Debido a los desafíos de trabajar con elasmobranquios y las dificultades para tener acceso a una población grande y homogénea de tiburones y rayas, la mayoría de los estudios que determinan intervalos de referencia para los principales parámetros sanguíneos en estos animales a menudo se basan en poblaciones de estudio pequeñas (con frecuencia inferior

a 30 individuos) [62,80–83]. Además, se han descrito diferencias hematológicas, bioquímicas y de electroforesis de proteínas significativas entre las especies estudiadas, lo que evidencia la necesidad de obtener intervalos de referencia específicos para garantizar una interpretación precisa de las analíticas sanguíneas en estos animales, y de realizar estudios con poblaciones más grandes [82]. Las colaboraciones entre acuarios que mantienen la misma especie de elasmobranquio en condiciones ambientales similares facilitan la obtención de mayores tamaños muestrales y que puedan ser utilizados como poblaciones en este tipo de estudios, permitiendo así la determinación de valores de referencia más precisos y fiables.

C.1 Hematología

Los elasmobranquios comparten los mismos grupos de células sanguíneas con los mamíferos y otros vertebrados, las cuales se diferencian en eritrocitos, trombocitos y leucocitos. Carecen de médula ósea y la hematopoyesis ocurre en los órganos hematopoyéticos que incluyen el bazo y el timo como en otros vertebrados, además de un conjunto de órganos epigonales únicos asociados con las gónadas y el órgano de Leydig asociado al esófago [6,49,84].

Presentan eritrocitos nucleados, de morfología comparable a la de las aves y los reptiles, excepto porque tienen un tamaño mucho mayor (≥20 μm de longitud). Los glóbulos rojos maduros tienen una forma elipsoide, un citoplasma liso uniformemente lleno de hemoglobina y un núcleo central ovalado de cromatina condensada. También son un hallazgo frecuente en los frotis sanguíneos los eritrocitos inmaduros, “eritroblastos” o “células policromatófilas”, así como los glóbulos rojos en mitosis [49]. Se han descrito variaciones en los recuentos totales de eritrocitos en elasmobranquios relacionados con diferencias en la actividad fisiológica, siendo los recuentos más altos en especies pelágicas y de natación continua, en comparación con las especies bentónicas y de natación menos frecuente [47,80,85,86]. También se han descrito aumentos en el hematocrito y en el recuento total de eritrocitos en diferentes especies de tiburones durante el ejercicio y después de la exposición a condiciones anóxicas, asociadas a la liberación de glóbulos rojos de los órganos hematopoyéticos a la sangre periférica [49].

Los trombocitos producidos por los elasmobranquios son de tamaño y morfología similar a los que se encuentran en las especies de aves y reptiles, siendo células ovales, con citoplasma claro y un núcleo central ovalado de cromatina condensada. A veces se observan formas redondeadas y fusiformes. Se ha descrito también un segundo tipo de trombocito granulado que puede encontrarse en algunas especies de elasmobranquios. Esta célula se parece al trombocito típico en tamaño y forma; sin embargo, el citoplasma está lleno de abundantes gránulos eosinofílicos. Estudios previos han descrito trombocitos granulados en diferentes especies de tiburones carcharínidos como la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), el tiburón gris (*Carcharhinus plumbeus*), y la musola pintada (*Mustelus canis*), pero también en especies fuera del orden *Carcharhiniformes*, como la raya torpedo (*Torpedo spp*.) y el tiburón de Port Jackson (*Heterodontus portusjacksoni*) [87–90]. Sin embargo, los trombocitos granulados parecen estar ausentes en otras especies de elasmobranquios no carcharínidos, como la raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*) y el tiburón ballena (*Rhyncodon typus*) [91,92]. Los trombocitos granulados no tienen un equivalente claro en las células de los mamíferos y todavía se desconoce su función específica en los elasmobranquios, por lo que se requieren futuros estudios que determinen la funcionalidad de esta célula [90].

En cuanto a los leucocitos, los elasmobranquios producen linfocitos y monocitos que se asemejan a sus homónimos respectivos en mamíferos en cuanto a morfología (Figura 9). Sin embargo, hay algunas diferencias claras en los granulocitos producidos por los elasmobranquios, que actualmente son clasificados como: granulocitos de gránulos eosinofílicos finos o “fine eosinophilic granulocytes” (FEG, por sus siglas en inglés), granulocitos de gránulos eosinofílicos gruesos o “coarse eosinophilic granulocytes” (CEG, por sus siglas en inglés), neutrófilos, que son similares a los de la mayoría de los mamíferos, con un citoplasma claro e incoloro, y basófilos, que son extremadamente raros en elasmobranquios, pero que han sido descritos en algunas especies de rayas. El núcleo de los granulocitos es grande e irregular, y puede ser lobulado o no lobulado, encontrándose ambas morfologías comúnmente en el mismo frotis de sangre de animales aparentemente sanos [49]. Los gránulos son todos homogéneos, electrodensos y eosinofílicos en preparaciones Giemsa, y se diferencian entre gránulos finos y gruesos; los finos suelen ser de menor tamaño y forma más alargada, mientras que los gruesos presentan una forma circular a ovalada. Los gránulos de los neutrófilos son más pequeños, también electrodensos, pero no se tiñen en preparaciones Giemsa [87].

Estudios hematológicos anteriores también mostraron importantes variaciones interespecíficas en los recuentos diferenciales de leucocitos entre las distintas especies de elasmobranquios [47,82]. Los linfocitos, monocitos, FEG y CEG parecen estar presentes en todas las especies de elasmobranquios estudiadas, aunque sus proporciones en los recuentos diferenciales de leucocitos varían mucho entre las especies de tiburones y rayas [80,91,92]. Los elasmobranquios, al igual que los peces óseos y los reptiles, muestran diferencias entre especies en la morfología de los heterófilos y los neutrófilos, incluida la inconsistencia en la segmentación nuclear y la maduración o retención de los gránulos, que ha sido recientemente estudiada por Stacy y colaboradores en 2022 [84].

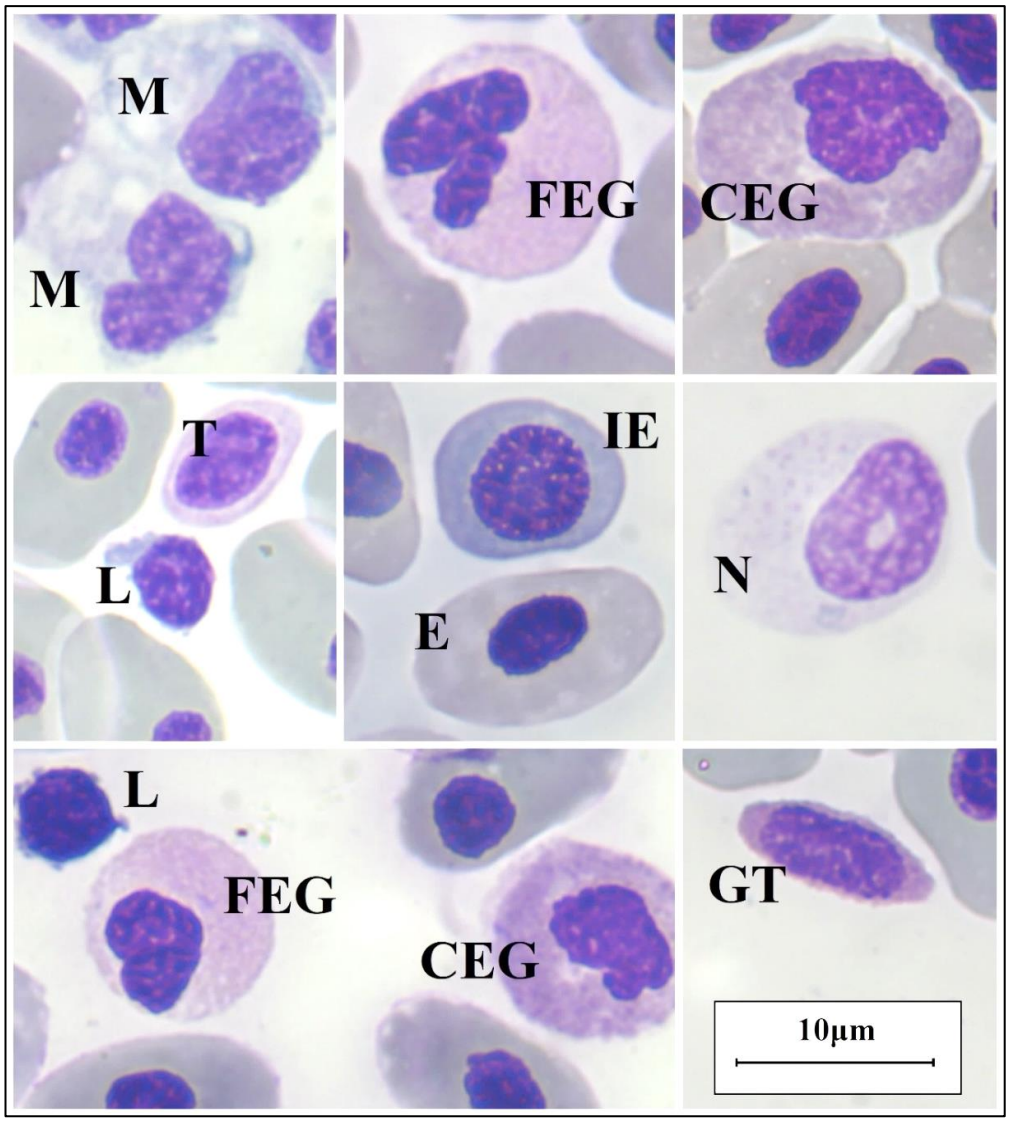


Figura 9. Células sanguíneas de la serie blanca del tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) presentes en sangre periférica. L, linfocito; FEG, granulocito de gránulos eosinófilos finos "fine eosinophilic granulocyte"; CEG, granulocito de gránulos eosinófilos gruesos "coarse eosinophilic granulocyte"; N, neutrófilo; M, monocito; GT, trombocito granulado "granulated thrombocyte". Fuente: Morón-Elorza et al. 2022 [93].

Además de las variaciones morfológicas descritas entre los leucocitos de las diferentes especies de elasmobranquios, se han descrito importantes diferencias interespecíficas cuantitativas en los valores obtenidos para los principales parámetros hematológicos. Los recuentos de eritrocitos, leucocitos totales y diferenciales en este grupo de animales muestran importantes variaciones interindividuales e interespecie, siendo normalmente el linfocito el leucocito predominante (con porcentajes entre el 30 y el 70% de los leucocitos en sangre periférica); los porcentajes de FEG y CEG varían enormemente entre las distintas especies, siendo los FEG superiores en número a los CEG en algunas especies de tiburones Carcharínidos, pero siendo los CEG más numerosos en el resto de especies de tiburones y rayas estudiadas [47,80,90]. De manera similar a como ocurre en mamíferos, aves y reptiles sanos, los monocitos parecen estar presentes sólo en bajas proporciones (< 5 %) en la sangre periférica de los elasmobranquios. La presencia y porcentaje de neutrófilos varía enormemente entre las diferentes especies de elasmobranquios, no habiéndose detectado neutrófilos en diversas especies de tiburones y rayas, mientras que en algunas especies, como el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*), alcanzan altos porcentajes en sangre periférica, representando el 17.5 % de los leucocitos [82]. Los basófilos, descritos como extremadamente raros o ausentes en algunas especies de elasmobranquios, tampoco se incluyen en los recuentos diferenciales de varias especies de tiburones (principalmente del orden *Carcharhiniformes*) [47,80,90]. Estas diferencias interespecíficas pueden apreciarse en la Tabla 1, y muestran las limitaciones en la extrapolación de valores de referencia entre especies, junto con la necesidad de realización de estudios que determinen los principales parámetros hematológicos en las diferentes familias de elasmobranquios, para garantizar la adecuada interpretación de los valores analíticos obtenidos.

Tabla 1. Recopilación de principales parámetros hematológicos en diferentes especies de elasmobranquio estudiadas.

Especie (individuos)	*Aetobatus narinari* (17)	*Dasyatis sabina* (10)	*Gingiyostoma cirratum* (13)	*Carcharhinus plúmbeus* (5)	*Carcharhinus melanopterus*(10)	*Cacharhinus taurus* (16)	*Mustelus canis* (20)	*Rhincodon typus* (2)	*Rhizoprionodon terranovae* (30)	*Sphyrna tiburo* (31)	*Squalus acanthias* (30)
EST	$\overline{X}$	$\overline{X}$	$\overline{X}$	Me	$\overline{X}$	$\overline{X}$	$\overline{X}$	$\overline{X}$	Me	Me	Me
Htc (%)	28	-	24.7	-	28.5	21.1	24	21	22	25	20
ST (g/dl)	5.7	-	-	-	-	-	-	-	5.5	6.2	4.8
GR (10^3/µl)	-	219.0	-	402.0	-	-	-	-	-	-	-
GB (10^3/µl)	18.1	55	-	22.1	14.5	15.7	20.8	5.1	57.2	50.7	40.2
L (%)	67.3	69.1	73.3	49.9	49.0	42.0	28.9	46.0	36.0	36.0	35.0
FEG(%)	15.4	29.3	24.5	7.0	33.6	37.6	17.7	39.5	25.0	20.0	11.5
CEG (%)	10.2			11.0	12.6	10.1	3.1	6.5	11.0	5.0	11.0
N (%)	-			6.5	-	-	17.3	0.9	0.0	7.0	17.5
B (%)	1.2			-	-	0.3	-	1.8	0.0	0.0	0.0
GT (%)	-			21.3	-	-	27.3	0.0	20.5	27.0	18.0
M (%)	1.9	1.6	2.2	3.5	4.8	1.7	5.6	6.3	4.0	3.0	5.0
L (10^3/µl)	11.80	-	-	11.00	7.40	12.00	6.13	2.40	19.80	20.50	13.20
FEG (10^3/µl)	2.64	-	-	1.55	5.70	6.80	3.67	2.00	16.30	10.60	4.40
CEG (10^3/µl)	1.76	-	-	2.43	1.83	2.47	0.65	0.30	6.20	2.20	4.30
N (10^3/µl)	-	-	-	1.43	-	-	3.52	0.10	0.00	3.80	6.60
B (10^3/µl)	0.2	-	-	0.00	-	0.05	-	0.10	0.00	0.00	0.00
GT (10^3/µl)	-	-	-	4.70	-	-	5.69	0.00	12.60	13.90	6.50
M (10^3/µl)	0.29	-	-	0.77	0.69	0.39	0.13	0.30	2.20	1.80	1.70
REF	[86]	[47]		[80]	[94]	[95]	[90]	[92]	[82]		

*EST, estadística; $\overline{X}$, media; Me, mediana; Htc, hematocrito; ST, sólidos totales; GR, glóbulos rojos; GB, glóbulos blancos; L, linfoctios; FEG, grnulocitos eosinófilos de gránulos finos "fine eosinophilic granulocyte"; CEG, "coarse eosinophilic granulocyte" ; M, monocitos; N, neutrófilos; B, basófilos; GT, trombocitos granulados; Ref, referencia. *Nótese que en algunas especies los granulocitos están combinados porque el artículo no hace distinción.*

C.2 Bioquímica

Los procesos bioquímicos en los elasmobranquios presentan también diferencias muy notables frente al resto de vertebrados, muchas de ellas relacionadas con su elevado índice de retención de urea, que ha modificado su fisiología, la estructura de sus membranas y la organización metabólica [55]. Pese a que los altos niveles de urea en elasmobranquios fueron descritos por primera vez en 1859, más de 150 años más tarde todavía no se comprende adecuadamente por qué esta molécula constituye el principal osmolito orgánico en este grupo de animales, dado que es una molécula difícil de producir y mantener [96]. Se especula que la retención de urea a niveles osmóticamente significativos podría haber tenido su origen en los primeros gnatostomados marinos, debido a la posible capacidad de adaptarse más rápidamente a los cambios osmóticos producidos por la difusión más rápida de la urea frente a los aminoácidos, que son utilizados en la regulación osmótica de invertebrados marinos y en peces anteriores a los elasmobranquios como son los mixinos. La urea, una molécula pequeña, sin carga, y de difusión rápida, es una de las pocas moléculas que podrían participar en la regulación osmótica, afectando de la menor manera posible al equilibrio iónico. Tanto los invertebrados marinos como los mixinos presentan altos niveles de metilaminas, que parecen haber sido mantenidas en los elasmobranquios para contrarrestar algunos de los efectos tóxicos de esta molécula a altas concentraciones [97].

El mantenimiento de niveles relativamente constantes en los iones inorgánicos es esencial para el funcionamiento de los gradientes iónicos necesarios para el transporte y comunicación celular. Los elasmobranquios absorben el cloro y el sodio en el intestino, contribuyendo también ambos electrolitos al mantenimiento de la osmolaridad, y eliminándose ambos principalmente a través de la glándula rectal [98]. La regulación de estos electrolitos junto con los niveles de urea sanguínea en los elasmobranquios a través de cambios de volumen y homeostasis les permite adaptarse a las variaciones en la salinidad ambiental, ya sea aumentando o disminuyendo la osmolaridad del plasma, pero manteniendo siempre una alta osmolaridad sistémica, que es superior a la del agua de mar, lo que permite la absorción pasiva de agua y protege a los elasmobranquios de la deshidratación [64]. Por todos estos motivos, se deben tener en cuenta las condiciones ambientales (especialmente la salinidad del agua) a la hora de interpretar los niveles plasmáticos de estos animales, para realizar una adecuada valoración de la bioquímica

sanguínea [97,98]. Además, a la hora de realizar estudios farmacológicos en elasmobranquios, como es el caso de esta Tesis Doctoral, se ha tener en cuenta que la peculiar organización metabólica y la singular funcionalidad de las membranas biológicas de este grupo de animales pueden interferir de forma decisiva en el comportamiento cinético de múltiples sustancias [55].

En los elasmobranquios, los sólidos disueltos totales son aproximadamente el doble de proteínas totales. Las concentraciones de cloruro de sodio y de urea y la osmolaridad son altas en elasmobranquios adaptados al medio marino, por lo que el análisis de su suero o plasma puede requerir dilución, dependiendo del rango lineal del analizador de química sanguínea utilizado [82]. Debido a la inexperiencia de algunos laboratorios para procesar muestras procedentes de elasmobranquios, en caso de enviar las muestras a laboratorios externos, puede ocurrir que se pierda información de algunos parámetros analíticos, por lo que estas características especiales de la bioquímica plasmática de estas especies deben ser tenidas en cuenta a la hora de organizar el procesamiento de muestras [62,83].

El análisis de los parámetros bioquímicos permite identificar y en algunos estudios cuantificar la respuesta fisiológica al estrés en elasmobranquios [6]. Estudios realizados con individuos sometidos a situaciones estresantes durante capturas y transportes prolongados, y estudios fisiológicos que sometían a los animales a periodos de hipoxia al extraerlos del agua, mostraron aumentos en los niveles de potasio (un catión hallado principalmente dentro de las células), magnesio y calcio ionizado, que normalmente vuelven a niveles normales a las 24 h del estímulo estresante [81,99]. También se han descrito aumentos significativos en la enzima creatina kinasa, que se mantiene por encima de los niveles normales durante periodos prolongados tras un estímulo estresante, aumentando también el lactato, la glucosa sanguínea y la osmolaridad plasmática, mientras que el pH disminuye [99–104]. A diferenciad e lo que ocurre en la mayoría de los vertebrados, en los que la hormona glucocorticoide dominante es o bien el cortisol (como ocurre en peces óseos) o bien la corticosterona, estudios relativamente recientes realizados en elasmobranquios han demostrado que la hormona corticosteroide dominante en este grupo de animales es la 1-α-hydroxycorticosterona, que aumenta rápidamente en situaciones de estrés agudo induciendo la movilización de energía en estas especies [105,106]. A pesar de la aparente utilización de la glucosa como combustible metabólico, los niveles de glucosa circulante parecen mantenerse relativamente

constantes en elasmobranquios, incluso durante el ayuno a largo plazo [44]. Estudios previos han mostrado que los niveles bajos de glucosa son un hallazgo normal en elasmobranquios sanos, mientras que un aumento en los niveles de glucosa podría ser indicativo de estrés, como sucede durante la captura [81].

Los estudios realizados hasta la fecha con elasmobranquios muestran además importantes diferencias en los niveles de creatina kinasa, estando en muchos casos por debajo de los límites de detección de los analizadores de bioquímica (<4 U/l), pero aumentando de manera considerable en algunos estudios y especies, que varían por ejemplo entre 18 y 735 U/l en tiburones cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) o niveles medios de 1455 U/l en el tiburón de puntas negras de arrecife (*Carcharhinus melanopterus*) [72,83,86,90,94]. También se han descrito variaciones importantes interespecíficas e interestudio para los niveles de la enzima aspartato aminotransferasa, con niveles desde los 7.0 U/l en la mielga (*Squalus acanthias*) y hasta 39.0 U/l en el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) [82,90]. Algo similar ocurre con la enzima lactado deshidrogenasa, que muestra niveles por debajo de los límites de detección en diversas especies de elasmobranquio, tales como la raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*) (< 4 U/l), el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) y la musola pintada (*Mustelus canis*) (<5 U/l); pero con niveles relativamente altos en otras especies, como el tiburón de puntas negras de arrecife (*Carcharhinus melanopterus*) (382 U/l) o la raya tiburón (*Rhina ancylostoma*) (102 U/l) [83,86,90,94,107]. Estudios previos han demostrado que las enzimas creatina kinasa, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa, que normalmente se encuentran en el interior de las células, aumentan significativamente en el plasma después de la captura y el transporte de elasmobranquios, siendo indicadores de lesión celular y potencial necrosis, y sugieren que la presencia de estas enzimas en niveles elevados en plasma esté relaciona con la presencia de daño muscular en elasmobranquios [100]. Las variaciones detectadas muestran la importancia de describir con detalle los protocolos de captura y tiempos de muestreo utilizados en los estudios que implican la extracción de sangre y determinación de parámetros bioquímicos, para reducir en la medida de lo posible los efectos relacionados con el estrés y los posibles traumatismos de captura en los valores analíticos [62].

En cuanto al resto de enzimas, la fosfatasa alcalina, encargada de regular la absorción de fosfatos en el intestino y la mineralización de los tejidos de manera similar a como ocurre en otros vertebrados como las aves o los mamíferos, ha demostrado sufrir variaciones en

elasmobranquios relacionadas con la dieta, el crecimiento y el desarrollo esquelético [62,108–111]. Las variaciones en la dieta, los parámetros ambientales (principalmente la salinidad), la edad y estado de desarrollo y la enfermedad también pueden afectar a los niveles de calcio y fósforo [72,91,109]. Los niveles de la enzima gamma glutamil transferasa, presente en la membrana de los hepatocitos y responsable de mantener la homeostasis intracelular y proteger frente al estrés oxidativo, suelen ser muy bajos en elasmobranquios, estando por debajo de los límites de detección de bastantes analizadores bioquímicos [86]. Sin embargo, su determinación es importante, ya que se han observado alteraciones en esta enzima relacionadas con procesos patológicos como la acumulación biliar o la lesión hepática, así como variaciones relacionadas con la edad, que han sido descritas en el tiburón toro (*Carcharias taurus*), con niveles inferiores en juveniles (0-4 U/l) en comparación con adultos (1-8 U/l) [108,112,113].

Se han descrito importantes variaciones en los niveles de colesterol, lipoproteínas y triglicéridos en elasmobranquios, que han sido relacionadas con variaciones en la estación y estado reproductivo de los animales [62,114]. Estudios previos han demostrado una correlación positiva y estadísticamente significativa entre los niveles de triglicéridos en plasma y la condición corporal de elasmobranquios, sugiriendo que los niveles de triglicéridos en plasma pueden ser un buen indicador del estado nutricional, muy útil para la evaluación del estado de salud y la práctica de medicina preventiva en estos animales [115].

En la Tabla 2, se encuentran reflejados los principales parámetros bioquímicos determinados en las diferentes especies de elasmobranquios estudiadas, observándose importantes diferencias interespecíficas para la mayoría de los parámetros. Como se ha demostrado en este apartado, se pone en evidencia una vez más la necesidad de ampliar el conocimiento en cuanto a fisiología y bioquímica de los elasmobranquios y cómo afectan tanto los distintos factores intrínsecos (edad, desarrollo, estado reproductivo, enfermedad…) como extrínsecos (nutrición, parámetros ambientales del entorno, variaciones en el entorno…) en los distintos parámetros bioquímicos, para el mantenimiento de estos animales de manera exitosa bajo cuidado humano y la adecuada interpretación de su analítica tanto en acuarios como en medio natural [81].

Tabla 2. Recopilación de los principales parámetros bioquímicos en diferentes especies de elasmobranquio estudiadas.

Especie (individuos)	*Rhinoptera bonasus* (18)	*Daasyais americana* (28)	*Carcharhinus melanopterus* (10)	*Cacharhinus taurus* (16)	*Rhina ancylostoma* (7)	*Aetobatus narinari* (15)	*Mustelus canis* (20)	*Rhincodon typus* (2)	*Rhizoprionodon terranovae* (30)	*Sphysna tiburo* (31)	*Squalus acanthias* (30)
EST	Me	Me	Me	Me	$\overline{X}$	$\overline{X}$	Me	$\overline{X}$	Me	Me	Me
ALP (U/l)	34.0	-	-	-	71.6	18.0	-	20.5	-	-	-
ALT (U/l)	BLD	-	-	-	3.2	-	-	9.0	6.5	BLD	13.0
AST (U/l)	33.0	14.5	47.0	22.0	21.5	8.47	11.3	13.6	25.5	39.0	7.0
GGT (U/l)	BLD	-	-	-	14.6	-	-	-	-	-	-
LDH (U/l)	BLD	BLD	382	-	102	-	BLD	-	-	-	-
PT (g/l)	28	26	34	27	32	-	30	24	23	28	21
BUN (mmol/l)	412	444	-	333	349	391	353	-	SLD		
AU (µmol/l)	-	-	17.8	18.0	-	-	-	53.5	35.7	47.6	BLD
Col (mmol/l)	3.72	-	3.33	1.74	2.62	2.69	-	-	2.22	2.82	2.53
Trig (mmol/l)	1.77	-	-	0.37	-	-	-	-	BLD	0.32	0.34
CK (U/l)	BLD	80	1455	233	545	99	7	88	258	172	BLD
Glu (mmol/l)	2.61	1.69	3.66	2.50	2.46	2.15	5.76	3.55	9.27	9.71	2.33
Ca (mmol/l)	4.2	4.1	4.0	3.7	3.7	4.1	4.2	3.4	4.6	4.7	3.4
Cl (mmol/l)	270	342	-	249.0	251.7	277.5	253.7	257.9	SLD		
K (mmol/l)	1.5	4.9	3.6	4.0	4.24	4.47	4.1	5.5	5.9	6.0	4.0
Na (mmol/l)	294.0	315.0	280.0	257.0	242.5	287.5	255.3	284.0	SLD		
P (mmol/l)	1.87	1.50	1.87	1.62	1.46	1.21	1.59	1.32	2.31	2.35	1.42
REF	[86]	[80]	[94]	[95]	[107]	[116]	[90]	[92]	[82]		

EST, estadísitca; Me, mediana; $\overline{X}$, media aritmética; SLD, valores sobre el límite de detección; BLD, valores por debajo del límite de detección; ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma-guamil transferasa; LDH, lactado deshidrogenasa; PT, proteínas totales en plasma; BUN, nitrógeno ureico en sangre; AU, ácido úrico; Col, colesterol total; Trig; triglicéridos; CK, creatina kinasa; Glu, glucosa; Ca, calcio; Cl, cloro; K, potasio; Na, sodio; P, fósforo; REF, referencia.

C.3 Electroforesis de proteínas

Aunque los estudios que determinan intervalos de referencia para los principales parámetros de hematología y bioquímica plasmática están aumentando tanto en elasmobranquios mantenidos en libertad como en animales capturados del medio, los valores de referencia para electroforesis de proteínas plasmáticas sólo se han determinado en unas pocas especies de elasmobranquios. Esto posiblemente es debido al menor acceso a los equipos necesarios para realizar estos análisis, pero también al desconocimiento por gran parte de clínicos del potencial de esta herramienta para el diagnóstico precoz de patologías en animales no domésticos [58,71,82,117].

El análisis de las fracciones proteicas plasmáticas mediante electroforesis debería incluirse idealmente en los chequeos veterinarios de rutina en elasmobranquios, ya que la técnica puede aportar mucha información en un contexto en el que el diagnóstico de enfermedades en este grupo de animales puede ser un desafío debido a la dificultad de detección de las enfermedades subclínicas. Previamente se ha demostrado la aplicación clínica de esta técnica analítica para el diagnóstico de enfermedades, no solo en especies de mamíferos y aves, sino también en elasmobranquios, ya que las variaciones en los valores de proteínas plasmáticas pueden indicar una enfermedad subclínica antes de que el animal muestre síntomas clínicos [17,58,117,118]. Además, junto con los cambios en las proteínas séricas que se pueden observar en el análisis bioquímico del plasma, se ha demostrado que la electroforesis de proteínas plasmáticas es un método eficaz para evaluar las variaciones en las tendencias de las proteínas plasmáticas sin necesidad de reactivos específicos de especie, y que permite cuantificar con precisión las lipoproteínas, proporcionando información valiosa para evaluar los procesos inflamatorios en curso y su respuesta al tratamiento [58,119,120].

Los estudios de evaluación de electroforesis de proteínas realizados hasta la fecha en tiburones y rayas han podido dividir los electroforetogramas de estas especies en cinco fracciones consistentes, estableciendo equivalencias con la prealbúmina, albúmina, alfa, beta y gamma-globulinas [58,71,82,117,121]. Es necesario mencionar en este punto que la presencia de albúmina en los elasmobranquios está siendo cuestionada actualmente, con estudios previos de electroforesis de proteínas plasmáticas que muestran porcentajes y concentraciones de proteína insignificantes en la banda de albúmina en tiburones bambú de puntos blancos (*Chiloscyllium plagiosum*), tiburones cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*)

y raya gavián (*Rhinoptera bonasus*) [58,71,117]. Además, un estudio que examinó muestras de plasma de ocho especies de condrictios (incluyendo tanto tiburones como rayas), utilizando electroforesis en gel de agarosa y electroforesis en acetato de celulosa mostró que la albúmina estaba ausente en todas las especies estudiadas, y sugirió que la mayoría de las especies de elasmobranquio no producen niveles detectables de ácidos grasos no esterificados, uniéndose las proteínas a ácidos grasos de cadena larga [57].

Hasta el inicio de esta tesis, todos los estudios de electroforesis de proteínas realizados en elasmobranquios utilizaron electroforesis en gel de agarosa, que sigue siendo el método más empleado en entornos veterinarios. Sin embargo, este método está siendo reemplazado por la electroforesis de zona capilar debido a su mayor eficiencia en el procesamiento de las muestras y a su mayor precisión, ya demostrada en otras especies marinas [122]. Conocidas las ventajas de la electroforesis de zona capilar en la identificación consistente de fracciones de proteínas del electroforetograma que con frecuencia no se diferencian mediante técnicas clásicas, parece adecuado utilizarla también en elasmobranquios para evaluar su potencial y utilidad clínica [123]. La posibilidad de clasificar las proteínas que migran en las regiones correspondientes a las diferentes fracciones del electroforetograma en subfracciones más pequeñas y consistentes posiblemente permitirá una interpretación más precisa de las variaciones e implicaciones fisiológicas y patológicas que ocurren en el electroforetograma de estos animales [122–124].

Al igual que ocurría con la hematología y la bioquímica plasmática, una gran limitación para la determinación de valores de referencia fiables para la interpretación precisa de la electroforesis de proteínas en elasmobranquios está directamente relacionada con la dificultad técnica de conseguir tamaños muestrales grandes de una misma especie de tiburón o raya, por lo que los estudios previos que determinaron los intervalos de referencia de electroforesis de proteínas utilizaron también tamaños muestrales relativamente pequeños (menores a 30-40 individuos). Pese a que la electroforesis de proteínas ha demostrado poseer utilidad clínica para la detección de patologías en elasmobranquios, ésta presenta otra importante limitación: los estudios previos realizados muestran una alta variabilidad interespecífica en las curvas electroforéticas, lo que limita la extrapolación de valores de referencia entre especies y su utilidad clínica, reflejando de nuevo la necesidad de realizar estudios específicos en los distintos órdenes de

elasmobranquios para evaluar con precisión las variaciones en las fracciones del electroforetograma [58,71,117]. La Tabla 3 representa los resultados obtenidos para las diferentes fracciones del electroforetograma en las especies de elasmobranquios estudiadas hasta la fecha, mostrando las mencionadas diferencias interespecíficas e incluso entre distintos autores para una misma especie, como es el caso del tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*).

Tabla 3. Recopilación de los valores de electroforesis de proteínas en las diferentes especies de elasmobranquio estudiadas.

Especie (n)	*Rhinoptera bonasus* (35)	*Cacharhinus taurus* (16)	*Chiloscyllium plagiosum* (20)	*Sphyrna tiburo* (23)	*Sphyrna tiburo* (31)	*Rhizoprio-nodon terranovae* (30)	*Squalus acanthias* (30)
EST	Me	Me	Me	Me	Me	Me	Me
PT (g/l)	54*	30	70	62	28	23	21
A/G	0.03	0.15	0.02	0.05	0.05	0.14	0.2
F1 (%)	5.60	0.0	0.0	4.82	0.71	1.30	6.67
F2 (%)	2.90	1.33	1.86	4.37	3.57	10.87	9.52
F3 (%)	12.90	2.00	1.42	36.02	2.50	3.91	2.38
		27.00			38.57	30.00	9.52
F4 (%)	68.40	62.67	21.71	47.82	46.78	44.00	68.57
F5 (%)	8.90	8.00	59.86	6.38	3.57	4.35	4.76
F1 (g/l)	2.9	0.0	0.0	3.2	0.2	0.3	1.4
F2 (g/l)	1.6	0.4	1.3	2.8	1.0	2.5	2.0
F3 (g/l)	7.2	0.6	1.0	22.3	0.7	0.9	0.5
		8.1	15.2		10.8	6.9	2.0
F4 (g/l)	38.3	18.8	41.9	29.4	13.1	12.0	14.4
F5 (g/l)	4.8	2.4	8.5	4.1	1.0	1.0	1.0
REF	[58]	[95]	[117]	[71]	[82]		

*EST, método estadístico; Me, mediana; n, número de individuos; SD, desviación estándar; PT, proteínas totales; A/G ratio; ratio Albúmina/Globulinas ó "ratio fracción 1: fracciones 2-5"; F1, fracción 1 – equivalente a prealbúmina; F2, fracción 2 – equivalente a albúmina; F3, fracción 3 – equivalente a alfa-globulinas; F4, fracción 4 – equivalente a beta-globulinas; F5, fracción 5 – equivalente a gamma-globulinas. *significa que en vez de proteínas totales se midieron los sólidos totales en plasma y se calcularon las fracciones a partir de estos. Nótese que la fracción 3 está dividida en dos subfracciones en algunas especies, que equivalen a alfa-1- y alfa-2-globulinas.*

D Patología en elasmobranquios

Hay pocos estudios retrospectivos completos de enfermedad en elasmobranquios mantenidos bajo cuidado humano, siendo el artículo publicado por Garner y colaboradores en 2013 el más significativo [125]. Este artículo, que estudió 1546 casos descritos de patologías en elasmobranquios comprendidos entre 1994 y 2010, muestra que las enfermedades infecciosas/inflamatorias son las más diagnosticadas (33.5 % del total), seguidas de las enfermedades nutricionales (11.9 %). Dentro de las enfermedades no infecciosas, además de las enfermedades nutricionales que cursan con emaciación, se han diagnosticado también casos de enfermedades cardiovasculares, renales, del sistema reproductor, neoplasias, enfermedades traumáticas, degenerativas del sistema nervioso y del músculo esquelético, melanosis y depósitos patológicos de minerales, y toxicosis (principalmente por fenbendazol, amoniaco y aminas) [29]. De las enfermedades infecciosas e inflamatorias diagnosticadas, las más frecuentes fueron las bacterianas (15 %), incluyendo sepsis en el 26 % de los casos descritos. Las infecciones de origen parasitario son las más frecuentes tras las bacterianas (9 %), siendo los nematodos los principales agentes etiológicos (26 %), aunque también se han descrito infecciones parasitarias causadas por trematodos, cestodos y múltiples especies de protozoos. Pese a la alta casuística, el tratamiento de las infecciones parasitarias es bastante efectivo en elasmobranquios y su incidencia puede ser reducida con una correcta cuarentena y profilaxis [14]. Las infecciones víricas suponen un 1 % de las patologías diagnosticadas, habiéndose registrado casos de infecciones por adenovirus, herpesvirus y papilomavirus, siendo el tratamiento de estas infecciones víricas principalmente sintomático. Las infecciones fúngicas son mucho menos frecuentes, representando el 0.6 % de las patologías diagnosticadas.

Al estudiar los principales órganos en los que se describieron los hallazgos patológicos, las branquias fueron el principal órgano afectado (19.2 % de todos los casos patológicos descritos), seguido de la piel (8.8 % de todos los hallazgos patológicos) [125].

La mayoría de las infecciones o infestaciones que afectan a los elasmobranquios mantenidos en acuarios se han reportado también en elasmobranquios de vida silvestre. Por un lado, el aumento de la capacidad de los acuarios para el mantenimiento de distintas especies, ligado a una mayor densidad de individuos comparada con el medio natural, ha favorecido la aparición de enfermedades emergentes en elasmobranquios. Por otro lado,

el aumento de la temperatura de los océanos a nivel global y la modificación de los ecosistemas marinos también han contribuido al incremento en la incidencia de enfermedades infecciosas en estos animales [70,126].

Como hemos visto, las enfermedades infecciosas están principalmente ocasionadas por bacterias, sin embargo, raramente se realizan cultivos bacterianos en elasmobranquios, y no se han encontrado tendencias específicas de un agente bacteriano para causar infecciones fatales en estos animales [125]. A diferencia de otras especies, los elasmobranquios (específicamente los tiburones) mantienen una relación única con las bacterias. Si bien es común encontrar bacterias comensales en la piel o dentro del tracto gastrointestinal de diferentes especies de animales, los tiburones son los únicos que presentan bacterias comúnmente en órganos internos como el hígado y los músculos sin evidencia de enfermedad. Esto podría deberse a que estas bacterias son beneficiosas para los tiburones ayudando en el metabolismo de la urea [127]. Los brotes de enfermedades bacterianas son relativamente poco frecuentes en elasmobranquios, existiendo informes de enfermedades causadas por *Vibrio spp.*, principalmente *Vibrio carchariae*, implicado en casos de meningitis en el tiburón toro (*Carcharias taurus*), el tiburón gris (*Carcharinus plumbeus*), la mielga (*Squalus acanthias*) y el tiburón limón (*Negaprion brevirostris*) [128]. También hay casos documentados de infección por *Aeromona salmonicida* en tiburón de puntas negras de arrecife (*Carcharinus melanopterus)* [129], además de distintos brotes de infección por *Fusobacterium spp.* y *Mycobacterium spp.* en diferentes especies de elasmobranquios [130]. La mayoría de los agentes bacterianos patógenos en elasmobranquios son Gram-negativos, hecho que debe ser tenido en cuenta a la hora del manejo clínico y terapéutico de estas patologías [70].

Las infecciones fúngicas son mucho menos frecuentes en general, aunque afectan de forma significativa a algunos grupos de interés como es la familia de los tiburones martillo (Familia *Sphyrnidae*) y a algunas rayas. Suelen presentarse ligadas a cambios en el entorno o a un acontecimiento estresante y el diagnóstico definitivo del agente fúngico implicado es generalmente difícil [131]. Pese a que los cultivos definitivos en infecciones fúngicas para identificar al organismo causante no suelen ser llevados a cabo, los agentes etiológicos que se aíslan con mayor frecuencia pertenecen al género *Fusarium spp*. [132]. *Fusarium solani* ha sido aislado en el tiburón alitán, la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), el tiburón de morro negro (*Carcharhinus acronotus*) y la raya de puntos negros (*Taeniura*

melanopsila) [132]. Algunas de las especies más afectadas por este hongo, con una alta tasa de mortalidad son el tiburón bonete o cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) y el tiburón martillo (*Sphyrna lewini*), en las que *Fusarium spp*. causa infecciones fúngicas necrotizantes que penetran desde la piel hasta el cartílago y el músculo, causando condritis y miositis del músculo circundante, especialmente en la cabeza [133] y en la línea lateral [134,135]. Otra enfermedad emergente fúngica es la producida por el complejo Phaeohyphomycosis, un grupo heterogéneo de hongos denominados comúnmente como "levaduras negras" y que produce una infección fúngica sistémica que afecta a numerosas especies de peces en todas las etapas de su desarrollo, en ambientes de agua dulce y marinos, habiéndose descrito micosis fatales en la musola pintada (*Mustela canis*) y el tiburón cebra (*Stegostoma fasciatum*) por *Exophiala pisciphila* [130,136]. El tratamiento de las infecciones fúngicas es difícil, habiéndose reportado casos anecdóticos de éxito para *Fusarium* sp. al utilizar tratamientos multimodales que combinaron el aumento en la salinidad, aumento en la temperatura del agua, aumento en la saturación de oxígeno en el agua, suplementación nutricional mediante vitaminas, minerales, antioxidantes e inmunoestimulantes, junto con el uso combinado de los antifúngicos terbinafina y voriconazol [130,137].

Debido a la dificultad del tratamiento de estas patologías, actualmente, la prevención es la mejor herramienta para su manejo, que puede disminuir la incidencia de enfermedades fúngicas manteniendo los animales susceptibles en condiciones ambientales óptimas y reduciendo el estrés asociado con la captura y el manejo [130,135]. Dado que las lesiones cutáneas son la principal vía de entrada para los hongos, estas deben evitarse en la medida de lo posible y ser controladas rápidamente en caso de que ocurran [134,136].

Tanto en el caso de las enfermedades bacterianas como en las fúngicas, la cuarentena es una herramienta de gran utilidad, que debe ser utilizada para la prevención de enfermedades infecciosas cada vez que un animal vaya a introducirse a un sistema nuevo [59]. Este periodo de cuarentena permitirá la detección de agentes infecciosos, además de proporcionar al animal un periodo de aclimatación junto con una recuperación del sistema inmune. Además de un examen físico completo y detallado, se debe realizar en la medida de lo posible un control hematológico y bioquímico junto con un examen fecal durante la cuarentena [14,59].

E Farmacoterapéutica en elasmobranquios

Actualmente se dispone de muy poca información sobre terapéutica medicamentosa en elasmobranquios, siendo anecdótica para determinados fármacos o especies, y se basa principalmente en la experiencia clínica. A la hora de generar protocolos farmacoterapéuticos y dosificar la mayoría de los fármacos en elasmobranquios, se han utilizado como referencia los datos disponibles en otros grupos taxonómicos (principalmente teleósteos). Por ello, y de forma similar a lo que ocurre en otras especies de animales exóticos, muchos de los regímenes posológicos que se utilizan actualmente en elasmobranquios no tiene una base científica consistente: no se conocen los niveles alcanzados de los fármacos en sus lugares de acción y no se dispone de estudios de eficacia y seguridad que avalen la práctica clínica [35,133,138]. Se hace muy necesario por tanto seguir avanzando en este campo del conocimiento.

El uso en elasmobranquios de medicamentos testados para mamíferos, aves o reptiles puede generar situaciones farmacoterapéuticas diversas: por un lado, pueden unirse a la misma diana farmacológica, en el mismo sitio de unión activa y producir el efecto deseado; pero también puede que el sitio de unión sea ligeramente diferente o que la densidad de los sitios de unión en el tejido diana sea inferior, originando como resultado una respuesta debilitada. Una tercera opción es que no haya sitios de unión, por lo que el fármaco no tendría efecto. La última opción consiste en la presencia de un sitio de unión químicamente similar pero que desencadene una función fisiológica diferente. Además, los fármacos pueden unirse con otros sitios de unión que no constituyan dianas farmacológicas, lo que puede alterar la disponibilidad del fármaco y su efecto [36].

Como hemos visto en el apartado B de la introducción de esta tesis, hay múltiples factores biológicos, con importantes diferencias fisiológicas y anatómicas en los elasmobranquios, que deben ser tenidas en cuenta antes de administrar un tratamiento farmacológico. Entre ellos se encuentran la tasa de filtración glomerular, la homeostasis osmótica, el estado nutricional, el contenido graso del hígado, el estado reproductivo y la presencia de determinados estados patológicos. Además, el ambiente y sus variaciones tienen una gran influencia en la fisiología de los elasmobranquios, pudiendo afectar a los tratamientos farmacológicos empleados.

E.1 Vías de administración en elasmobranquios

En la práctica clínica diaria, las vías de administración más usadas en peces óseos se extrapolan para los elasmobranquios, ya que sus características de manejo son similares, siendo el medio de ambos el agua. La vía de administración más efectiva es frecuentemente un factor de gran importancia a la hora de elegir un tratamiento farmacológico, utilizando más comúnmente las siguientes vías: inmersión, oral voluntaria con la alimentación o forzada con sondaje, inyección (bien intramuscular-IM, intravenosa-IV o intracelómica-IC). La elección entre una vía de administración u otra también dependerá de la patología a tratar, las opciones de manejo y las instalaciones de las que se disponga [15].

La administración de un medicamento por inmersión es un método muy fiable, y que puede llevarse a cabo bien en la totalidad del tanque para producir un tratamiento grupal, o bien aislando al animal en un tanque separado y tratando individualmente [15]. Debe tenerse en cuenta que esta vía de administración puede incrementar considerablemente los costes del tratamiento y generar gran cantidad de residuos en el agua de vertido cuando se aplica en animales mantenidos en tanques de gran volumen, al requerirse grandes cantidades de fármaco para alcanzar las concentraciones terapéuticas. La administración por inmersión es utilizada frecuentemente en el tratamiento de infecciones parasitarias externas [139].

La administración oral voluntaria es la vía de elección si se quiere evitar el manejo del animal, y es la vía de administración más sencilla si el animal está comiendo normalmente. Es necesario vigilar que el animal ingiera el alimento y no lo regurgite; algunas especies de tiburones y rayas puede que cojan el alimento, pero no lo lleguen a tragar o bien lo regurgiten tras una situación estresante o si se sienten incómodos, debido a la facilidad anatómica para la regurgitación que tienen estos animales [40,140]. También hay que tener en cuenta que la absorción de los medicamentos administrados vía oral puede variar con respecto a la administrada por otras vías y que, en algunos fármacos, como algunos antifúngicos, la composición de la dieta puede influir en su absorción [141]. Como puede apreciarse en la Figura 10, se puede acostumbrar a los animales a la alimentación voluntaria controlada utilizando una pértiga de plástico a la que se sujeta el alimento mediante el uso de una brida.

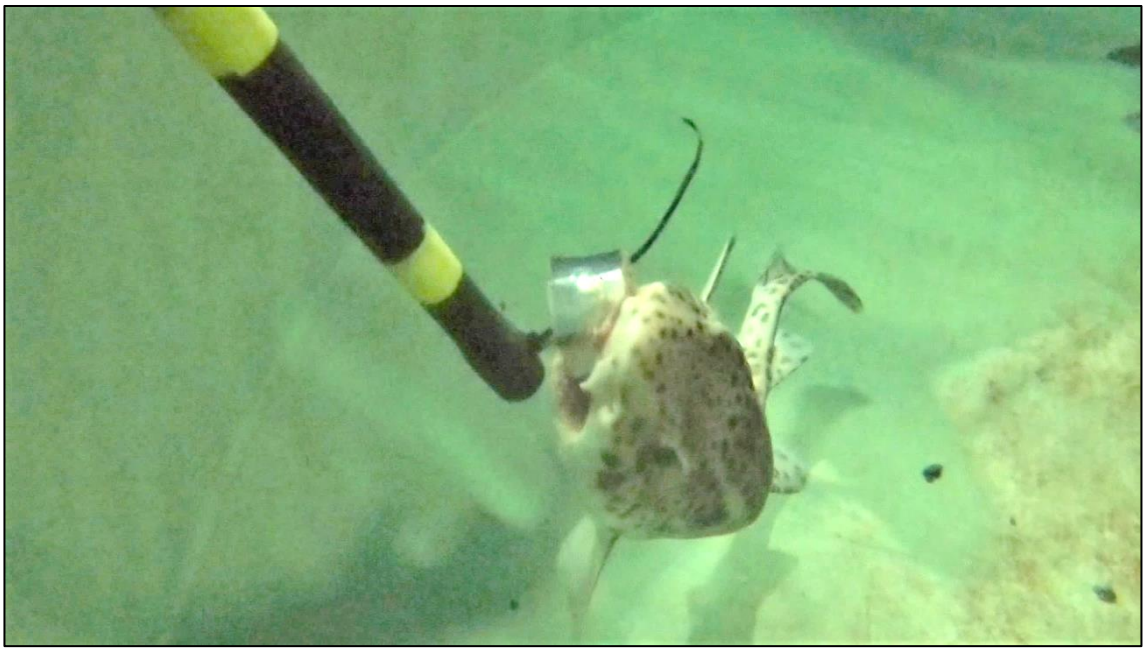


Figura 10. Administración oral voluntaria en alitán (Scyliorhinus stellaris) utilizando un tubo de plástico con una brida en su extremo en la que se sujeta el trozo de pescado con la medicación. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia.

En algunas ocasiones se requiere el manejo del animal para su tratamiento, lo que supone una situación más estresante del individuo. Sin embargo, esta administración permite al clínico aprovechar el manejo para realizar simultáneamente un examen detallado del animal. Todos los métodos de administración de medicación en elasmobranquios descritos a continuación requieren técnicas de captura e inmovilización seguras y eficaces [15]. El entrenamiento y desensibilización de los animales pueden ser herramientas de gran ayuda a la hora de reducir el estrés que suponen estos manejos y disminuir el tiempo requerido para la realización del tratamiento [15,35].

La administración de un fármaco por vía oral forzada mediante sondaje se utiliza en caso de que la vía oral sea la mejor opción disponible para administrar un medicamento y el animal no esté comiendo de manera voluntaria. Pueden utilizarse distintos tipos de sondas, bien mangueras de goma, tubos de vinilo reforzado, o bien tubos nasogástricos o catéteres en caso de individuos de menos tamaño [15]. En animales con una importante dentadura, que pueda dañar la sonda, conviene utilizar un tubo de plástico rígido como protección para que esta no se dañe o colapse (Figura 11).

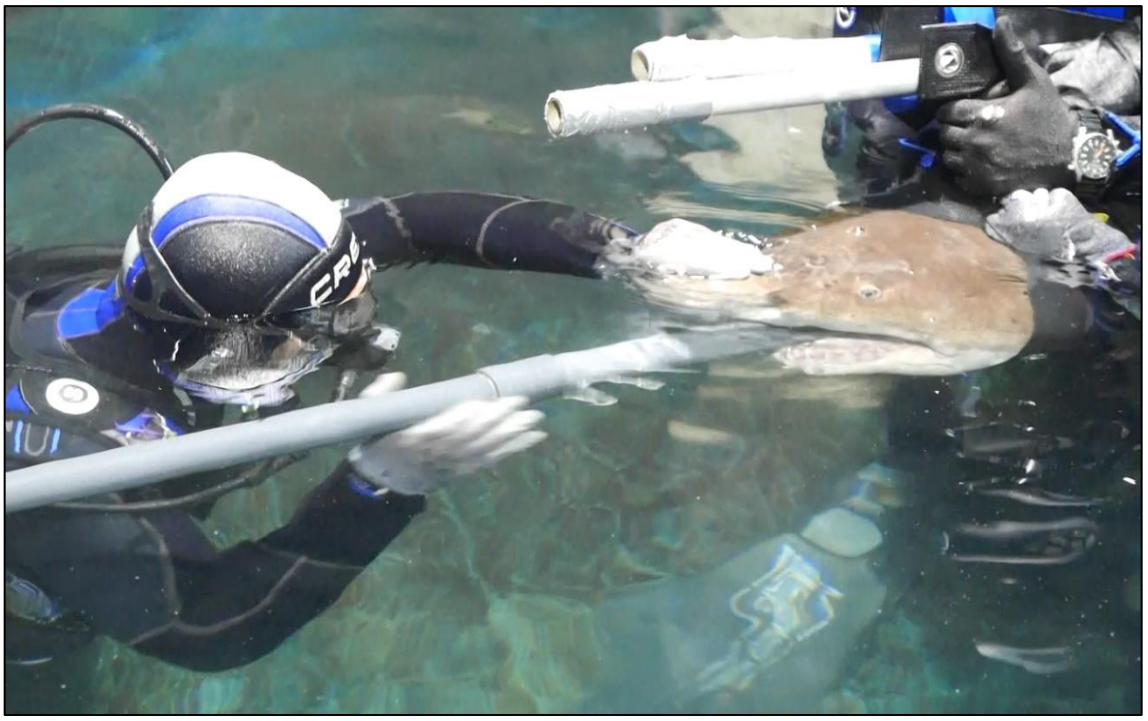


Figura 11. Inmovilización y sondaje de tiburón toro (Carcharias taurus) adulto en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia durante administración de medicamento por vía oral forzada. Nótese que el tubo de plástico que se observa en la imagen protege al tubo de sondaje que discurre en su interior de ser dañado por los dientes del tiburón.

La administración de fármacos mediante inyección es la vía utilizada más frecuentemente si se desea garantizar una disposición sistémica del fármaco. Para la dosificación IM, el lugar indicado para la administración es en la musculatura epaxial dorsal, ligeramente lateral, caudal a la primera aleta dorsal y craneal a la segunda dorsal en tiburones, y en la musculatura dorsal de las alas en rayas (Figura 12). La administración IM puede realizarse mientras se mantiene al animal inmovilizado, o bien mientras el animal está nadando libremente, si se acopla un dardo de administración a distancia a un tubo largo de plástico o se utiliza una pica neumática para teleinyección [15,36].

Sin embargo, la administración intramuscular en elasmobranquios presenta una serie de desafíos: atravesar la piel del elasmobranquio no es sencillo y los dentículos dérmicos pueden hacer que o bien la aguja se doble o pierda filo rápidamente; el músculo de los elasmobranquios y su piel no son tan elásticos ni retienen el líquido tan fácilmente como en el caso de los mamíferos, por lo que puede ocurrir la salida de parte del fármaco a través del punto de administración. Para evitar esta pérdida de fármaco, se recomienda evitar en la medida de lo posible el movimiento del animal, utilizar agujas del calibre más pequeño posible para la administración, y aplicar compresión en la zona de inoculación

unos segundos tras retirar la aguja [35,36,142]. Además, no está demostrado ningún beneficio al limpiar la zona de punción con desinfectante antes de realizar la inyección, y se desaconseja la utilización de alcohol ya que ha demostrado causar una importante irritación en la piel [35]. En todo caso, la zona de punción se puede lavar con suero salino fisiológico estéril antes del procedimiento.



Figura 12. Administración intramuscular del meloxicam en un ejemplar adulto de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) (izquierda) y en un ejemplar adulto de raya mosaico (Raja undulata) (derecha). Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia.

La administración IV es otra opción, aunque es utilizada con menor frecuencia debido a que requiere la total inmovilización del animal y una mayor experiencia por parte del clínico. La localización más indicada para la administración IV es a través de la vena caudal que, como se ha explicado, es también el lugar indicado para la venopunción y extracción de sangre [47] (Figura 13). Otro lugar indicado para la administración IV es el seno dorsal en tiburones de gran tamaño. En rayas, los sitios indicados para administración IV son la vena caudal, al igual que en tiburones, junto con las venas en las alas, que también se utilizan para la extracción de sangre en estas especies [15,35].



Figura 13. Detalle de la administración intravenosa en un ejemplar de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris).

La administración intracardiaca (IC) (Figura 14) es utilizada raramente de forma terapéutica, aunque puede ser una opción utilizada durante la eutanasia o en la administración de fármacos de emergencia como la epinefrina [35]. La administración de medicamentos por vía intracelómica (IC) se puede realizar insertando una aguja en un ángulo agudo, en dirección caudo-craneal, en una localización cercana a la cintura pélvica en el lado derecho del abdomen, pudiendo ayudarnos de la ecografía [15].



Figura 14. Acceso intracardiaco en tiburón lechoso (Rhizoprionodon acutus) realizado post mortem en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia.

E.2 Dosificación de fármacos y efectos adversos en elasmobranquios

La dosificación de medicamentos y la aplicación de regímenes posológicos en elasmobranquios tienen los mismos problemas que la elección de los tratamientos: escasez de información, basada en antecedentes de uso empírico por otros profesionales y extrapolación de datos de otras especies [15,138].

Como en otros peces, además de las características anatómicas y fisiológicas que pueden ser distintas entre las diferentes especies de elasmobranquios, la dosis específica y la frecuencia de dosificación pueden variar debido a otros factores, como son la eficacia del compuesto específico utilizado, la estabilidad metabólica y la duración de su acción. Es necesario por tanto tener en cuenta las propiedades de los medicamentos; por ejemplo, si un fármaco es lipofílico o hidrofílico, su unión a proteínas u otras sustancias químicas, sus sitios de unión, el tamaño de sus moléculas, ya que son factores que también pueden influir en la eficacia del fármaco y en su dosificación [15]. Otros factores como el estado general de salud del animal, el sexo, la alimentación utilizada y las condiciones ambientales también pueden afectar a estos parámetros. Además, la vía y el momento de la administración también deberán ser tenidos en cuenta [33,35].

Prácticamente todos los fármacos o suplementos tienen el potencial de producir efectos adversos en los animales tratados, incluso en especies muy estudiadas. Dada la escasa información disponible respecto a las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas de los distintos grupos terapéuticos en elasmobranquios, la posibilidad de que ocurran efectos adversos es mayor. Estos efectos no deseados pueden variar desde reacciones locales, hasta producir shock anafiláctico y, en algunos casos, la muerte [138]. Un ejemplo relativamente frecuente es el efecto adverso producido por la enrofloxacina administrada IM a altas concentraciones, que tiene un efecto cáustico y puede dar lugar a reacciones locales con la formación de abscesos [15]. También se ha descrito una mortalidad de 95 % en tiburones martillo cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) juveniles tratados con sulfametoxazol y trimetroprim mediante baño, utilizando las dosis establecidas para el tratamiento de teleósteos (25 mg/l) y una severa dermatitis ulcerativa en raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*) al ser tratada con sulfadimetoxina IP a dosis de 50 mg/kg cada 24 h [15,138]. Los AINEs deben usarse con precaución, ya que tienen muchos efectos secundarios graves en los vertebrados superiores que incluyen hemorragia gastrointestinal, nefrotoxicidad y efectos específicos sobre la agregación

plaquetaria [143], aunque su uso no está limitado; en un estudio de toxicidad con meloxicam administrado a dosis única de 5 mg/kg IM en el carpín (*Carassius auratus auratus*) no se encontraron signos clínicos ni lesiones histopatológicas debidas a la administración del fármaco [144].

Cuando administramos un medicamento a un elasmobranquio tenemos que asumir los riesgos que supone la administración del fármaco frente al beneficio potencial del tratamiento. Estos animales, pese a la imagen general que tiene el público como animales muy resistentes, son muy delicados y sensibles a determinadas situaciones. Sin embargo, en el caso de los tratamientos medicamentosos, los posibles efectos adversos pueden verse reducidos si se administran las dosis apropiadas y se evita la sobredosificación. Se requieren unos conocimientos precisos de las dosis efectivas para poder predecir cuándo un fármaco puede ser tóxico o no apropiado para una determinada especie. Además, es necesario un control hematológico y bioquímico exhaustivo durante el tratamiento, dado que la administración de un fármaco puede suponer alteraciones en estos parámetros que adviertan de la aparición de un posible efecto adverso, como es el caso de la observación de alteraciones hematológicas y aumento del estrés oxidativo en pintarrojas (*Scyliorhinus canicula*) juveniles tras la administración de enrofloxacina IM [145].

E.3 Tratamiento del dolor y la inflamación en teleósteos y elasmobranquios

Aunque la percepción del dolor en los peces (incluidos los elasmobranquios) aún no se comprende por completo, diferentes estudios han demostrado el potencial de experimentar dolor en este grupo de animales [146]. Actualmente está científicamente aceptado que los peces tienen los componentes neurológicos necesarios para la nocicepción, y que demuestran cambios fisiológicos y conductuales después de un estímulo doloroso que pueden ser reducidos por analgésicos [147,148]. Algunos ejemplos son la aparición de comportamientos anormales, cambios en la tasa de alimentación y actividad, cambios en la tasa de ventilación y movimientos operculares, ritmo cardiaco, niveles de cortisol (en teleósteos) y de 1-alfa-hidroxicorticosterona (en elasmobranquios), o variaciones en los niveles de glucosa, electrolitos y gases sanguíneos [100,105,148–151]. Esto revela la necesidad de disponer de herramientas terapéuticas que puedan proporcionar analgesia y ayudar a controlar el dolor y la inflamación en este grupo de

animales. Debido a que las patologías inflamatorias/infecciosas son las más prevalentes en elasmobranquios, destacamos el uso de fármacos antiinflamatorios y analgésicos para el tratamiento de estas enfermedades [125].

El empleo de una analgesia correcta deberá implicar la elección de la molécula más adecuada para controlar el tipo de dolor, administrada por la vía más conveniente (especialmente para tratamientos prolongados) y a la dosis necesaria; todo seguido de la adecuada monitorización de la respuesta del paciente, así como de la intervención rápida en caso de que no se controle el dolor o se produzcan efectos adversos indeseados [152]. Por desgracia, mucha de esta información todavía no está disponible para el tratamiento del dolor en la mayoría de los animales acuáticos, por lo que frecuentemente se utilizan fármacos a dosis que han funcionado en otros taxones. Otra limitación para el uso de estos fármacos en peces es que, tanto en los escasos estudios científicos como en la práctica clínica, se han descrito importantes variaciones interespecíficas, que limitan la capacidad de evaluar la eficacia de estos fármacos en este amplio grupo de animales [151]. Así, aunque los fármacos analgésicos se utilizan de manera rutinaria en mamíferos, su uso en teleósteos y elasmobranquios es todavía muy limitado. La opinión general de los autores es que, al igual que en otras especies animales, el tratamiento del dolor en peces también debe ser multimodal; los anestésicos locales todavía han sido poco estudiados, habiéndose evaluado la lidocaína en diferentes especies de teleósteos tras tratamientos por infiltración local a dosis de 1-2 mg/kg y por inmersión a 2-5 mg/L, mostrando buenas propiedades analgésicas y utilizándose también de manera empírica en elasmobranquios sin efectos adversos aparentes [151,153,154].

Los peces cuentan con receptores opioides-μ, y algunas especies como el pez cebra (*Danio rerio*) pueden ser un excelente modelo para el estudio de fármacos opioides *in vivo* [155]. Los opioides son probablemente la clase analgésica más estudiada en peces, habiendo demostrado que la morfina produce una reducción en la expresión de genes proinflamatorios, reducción de los comportamientos aberrantes asociados con dolor en el carpín (*Carassius auratus auratus*), la carpa koi (*Cyprinus carpio koi*), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y el pez cebra [151]. La morfina ha mostrado algunos efectos adversos en peces, tales como la hiperactividad en pez cebra, carpín y carpa koi tras la administración de 5 mg/kg IM, además de bradicardia en la solla roja (*Pseudopleuronectes americanus*) tras la administración a 17 mg/kg IV; también se ha

descrito desarrollo de tolerancia tras su uso en el carpín [151]. El butorfanol ha sido estudiado en el pez cebra (0.2-0.5 mg/L en inmersión) y el alitán mallero (*Scyliorhinus retifer*) (0.25-5 mg/kg IM) sin mostrar un efecto analgésico, habiéndose reportado una muerte en tilapia (*Oreochromys spp.*) tras la administración a 1mg/kg IV [151,156]. La buprenorfina parece no producir analgesia en peces, además de mostrar importantes efectos adversos tales como una bradicardia y bradipnea prolongadas tras la administración de 0.05 mg/kg IM. El tramadol se ha utilizado de manera anecdótica en elasmobranquios con administraciones orales de 1-3 mg/kg, sin producir reacciones adversas; sin embargo, se ha descrito hipoactividad y natación en superficie en el pez cebra tras la administración de 10 µg/pez IM, ocurriendo mortalidad en la mayoría de los individuos 5 minutos tras la administración de 50 µg/pez IM [138,157]. Pese al gran número de estudios realizados, las propiedades analgésicas de los opioides en peces siguen sin estar claras y su uso es todavía muy poco frecuente en la clínica de animales acuáticos [15].

En cuanto a la terapéutica antiinflamatoria en elasmobranquios, cabe destacar que el uso de fármacos antiinflamatorios esteroides se ha limitado al tratamiento del shock y los traumas ocasionados por el transporte y la anorexia y la estimulación del apetito, mientras el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) es frecuente tanto para la reducción de la reacción inflamatoria como para la promoción de la analgesia. Estudios previos realizados en diferentes especies de teleósteos, muestran la existencia de una enzima análoga a la ciclooxigenasa (COX) de mamíferos y aves, habiéndose confirmado la producción de prostaglandinas y genes que codifican para esta enzima en este grupo de animales [158,159]. Se han realizado también estudios siguiendo esta línea de investigación en elasmobranquios, habiéndose descrito la expresión de genes que codifican para la COX en tejidos de riñón, hígado, bazo, cerebro, corazón y branquia [160]. Sin embargo, todavía existen muy pocos estudios farmacológicos con antiinflamatorios en ambos grupos de peces, y el uso clínico de AINEs con fines analgésicos en animales acuáticos no está científicamente establecido en este momento, aunque hasta la fecha se han estudiado de forma dispersa por lo menos nueve fármacos de este grupo en diversas especies de peces: meloxicam, ketoprofeno, ibuprofeno, robenacoxib, carprofeno, flunixin meglumine, ketorolaco, aspirina, diclofenaco y meloxicam [15,138,151,153].

El ketoprofeno es un inhibidor no selectivo de la COX, que ha sido evaluado en el carpín, la carpa koi, el alitán mallero, la trucha arcoíris y la tilapia, sin haberse reportado efectos adversos a las dosis ensayadas. Este fármaco ha demostrado capacidad para reducir los niveles postoperatorios de creatina quinasa en carpas koi a dosis de 2 mg/kg IM, mostrando altas concentraciones plasmáticas y concentraciones mantenidas en el plasma durante más de 24 h en la trucha arcoíris y la tilapia del Nilo (*Oreochromys niloticus*) [151,156]. En elasmobranquios se ha utilizado de manera anecdótica a dosis de 1-4 mg/kg IM en diferentes especies, sin producir una disminución de las concentraciones anestésicas mínimas requeridas para los procedimientos clínicos; su eficacia todavía es desconocida, aunque no parece producir efectos adversos en estos animales [138,156].

Se ha estudiado el ibuprofeno administrado por inmersión en ciprínidos y larvas de pez cebra, mostrando una disminución dosis dependiente de la producción de prostaglandina E, pero sin demostrar un efecto analgésico valorable [151,161]. El robenacoxib es un inhibidor selectivo COX-2 que ha demostrado buenos efectos analgésicos y parámetros farmacocinéticos apropiados para su uso en la trucha arcoíris tras administración de 2 mg/kg IM, produciendo una disminución del comportamiento de escondite en rocas en las truchas a las que se les había aplicado un estímulo nociceptivo, manteniendo niveles considerados terapéuticos en carnívoros domésticos durante 3-4 días y sin mostrar signos clínicos o histopatológicos asociados a efectos adversos producidos por el fármaco [162].

El carprofeno ha sido estudiado tras la administración a 4 mg/kg IM en raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*), encontrando niveles detectables del fármaco en plasma hasta 96 h tras la administración, aunque no pareció reducir los niveles de tromboxano-2 [155]. También se ha administrado de manera anecdótica en el águila marina moteada (*Aetobatus narinari*) por vía subcutánea a dosis de 2.2 mg/kg, produciendo una reacción cutánea como efecto adverso, y a dosis de 2-4 mg/kg PO cada 12-48 h en distintas especies de elasmobranquios sin producir efectos adversos, aunque con eficacia desconocida [138]. También se ha evaluado esté fármaco en la trucha arcoíris a dosis 2.5-5 mg/kg IM, pareciendo inducir un ligero efecto analgésico, pero con resultados dudosos por el pequeño tamaño muestral [163].

Se ha estudiado el flunixin meglumine a dosis de 0.5 mg/kg IM en la trucha arcoíris, sin mostrar signos de analgesia, y a dosis de 8-20 mg/L en tratamiento por inmersión en larvas de pez cebra, sin demostrar tampoco efecto analgésico [151,153]. Aunque su uso

no es frecuente en la clínica de elasmobranquios y se reserva para animales grandes con el objetivo de reducir los volúmenes de administración, está descrito su uso anecdótico a dosis de 0.3 mg/kg IM en diferentes especies de elasmobraquios, sin haber mostrado efecto analgésico, pero sin producir efectos adversos detectables [138].

También dentro de los AINEs no selectivos para la COX, el ketorolaco se ha evaluado como analgésico a dosis de 0.5 mg/kg IM en la trucha arcoíris, sin producir signos evidentes de analgesia; la aspirina ha sido estudiada en tratamientos por inmersión a dosis de 1.0-2.5 mg/L en el pez cebra, mostrando efectos analgésicos pese a no producir concentraciones detectables del fármaco en el organismo [151,153]. Por último, la exposición por inmersión al diclofenaco de la trucha arcoíris, en concentraciones superiores a 5 µg/L en el agua, mostró bioacumulación y lesiones histopatológicas en branquias y riñones [164].

Dentro de los AINEs utilizados en la cínica de teleósteos y elasmobranquios, destacamos además el uso extendido que tiene el meloxicam, dadas sus buenas propiedades cinéticas, alta tolerabilidad y seguridad en otras especies que lo convierten en un AINE muy frecuentemente prescrito en peces, como también sucede en la clínica de animales domésticos y de otras especies exóticas y silvestres. El uso de este fármaco en teleósteos y elasmobranquios se discute en detalle en el apartado G.6 de la presente Tesis Doctoral.

Como muestra este apartado, la prescripción de fármacos analgésicos y antiinflamatorios en peces precisa de la realización de estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y estudios de eficacia y seguridad que evalúen las diferencias interespecíficas. Estos estudios permitirán definir fármacos eficaces y protocolos terapéuticos efectivos para el tratamiento del dolor y la inflamación en este tipo de animales.

F Farmacocinética en elasmobranquios

F.1 Historia y evolución de la farmacocinética en elasmobranquios

La farmacoterapia es el estudio de los usos y efectos terapéuticos de los medicamentos en un organismo vivo. La farmacodinamia se refiere a lo que un medicamento causa en el organismo, mientras que la farmacocinética muestra cómo el organismo procesa los

medicamentos o cómo actúa el organismo sobre el medicamento [33,34]. Así, la farmacocinética pretende estudiar cómo evoluciona la concentración de un fármaco durante el tiempo, y las cantidades de ese fármaco y sus metabolitos en los tejidos de las diferentes especies, sus fluidos y excrementos. Los estudios conjuntos farmacocinético-dinámicos (PK/PD, del inglés pharmacokinetic-pharmacodynamic) evalúan también su respuesta farmacológica, construyendo modelos que permiten la interpretación clínica de los resultados obtenidos.

Estos modelos permiten al clínico ajustar las concentraciones de fármaco, sus cantidades y sus metabolitos para el paciente a tratar, bien en su totalidad o en una parte de este. Estos modelos, interpretados a través de ecuaciones matemáticas, nos permiten prever los resultados obtenidos en tratamientos farmacológicos, ya que su respuesta está determinada por la capacidad del fármaco para acceder a los lugares de acción y la concentración de fármaco en sangre, y sientan las bases de la farmacoterapia (estudio de los usos y efectos terapéuticos de los medicamentos en un organismo vivo). El comportamiento farmacocinético puede ser muy distinto entre las diversas especies, incluso si están muy próximas filogenéticamente [33,165].

Los tiburones y las rayas generalmente no se consideran animales de investigación de laboratorio, por lo que la mayor parte de la literatura farmacocinética clásica no hace referencia a estos animales. Los beneficios de mantener elasmobranquios como animales de laboratorio para estudios farmacocinéticos están todavía infravalorados. Mientras que, al referirnos a elasmobranquios, un gran grupo de personas piensa en grandes tiburones, animales de menor tamaño (1 metro de longitud total) son utilizados frecuentemente para estos estudios. Los individuos incorporados a estudios farmacocinéticos incluyen especies de tiburón y raya que poseen un tamaño pequeño cuando son adultos, o especies que mantienen un pequeño tamaño durante los primeros años de crecimiento, lo que garantiza un manejo sencillo.

Las primeras investigaciones sobre farmacocinética en elasmobranquios se establecieron utilizando rojo fenol en la mielga (*Squalus acanthias*), metotrexato en la raya látigo del atlántico (*Dasyatis sabina*), y el éter de clorodifenilo en la raya manchada americana (*Leucoraja ocellata*) [166–168]. En la década de 1970, se produjo un auge en el interés y en la realización de estudios farmacocinéticos en elasmobranquios, realizándose estudios con diferentes grupos de sustancias en la mielga [169,170]. Los primeros estudios de

cinética se centraban en la distribución y eliminación de los medicamentos administrados. Posteriormente, estudios más modernos mostraron que el metabolismo enzimático de algunas especies como la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*) era menor que el de peces teleósteos, lo que sugería una mayor susceptibilidad de los elasmobranquios al daño oxidativo por toxinas extensible a otros xenobióticos [171].

Por todo esto, actualmente todavía hay poca información sobre farmacoterapéutica en elasmobranquios, aunque se aplica en la práctica clínica veterinaria, basándose en la extrapolación de datos de otras especies y en la experiencia clínica como ya se ha comentado. Sin embargo, en la mayoría de los casos no hay conocimiento sobre los niveles reales de principio activo alcanzados en los lugares de acción que garanticen un correcto uso clínico, y que estén basados en estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y de seguridad [15,35].

F.2 Principales desafíos y situación actual de la farmacocinética en elasmobranquios

Actualmente no existe otro método *in vivo* disponible para evaluar las propiedades cinéticas de un fármaco en las diferentes especies animales que la realización de un estudio farmacocinético. Los fenómenos fisiológicos y bioquímicos que regulan el comportamiento cinético de los fármacos administrados a los animales no pueden ser simulados mediante métodos desarrollados *in vitro* ya que, en cualquier caso, estos procesos suceden en el animal vivo de forma simultánea y condicionados por infinidad de fenómenos biológicos. Existen algunos modelos que pueden simular *in silico* algunos procesos concretos (eliminación por vías concretas, fenómenos de absorción a través de membranas independientes), pero no permiten extrapolar el comportamiento global con los fenómenos de liberación, absorción, distribución, acumulación, metabolismo y excreción de fármacos.

Como hemos visto en el apartado anterior, todavía hay muy poca información sobre farmacoterapéutica en elasmobranquios, siendo importante comprender las propiedades farmacocinéticas de los principales medicamentos que utilizamos en los elasmobranquios, ya que esta información ayudará a comprender estas especies y será

una herramienta clave en los proyectos de cría, rehabilitación, conservación y reintroducción de elasmobranquios llevados a cabo en todo el mundo.

Una vez conocidos los parámetros farmacocinéticos de un fármaco estimados para una especie concreta y teniendo en cuenta la gran variabilidad entre especies, podemos simular los datos esperables de niveles plasmáticos que obedecen a los fenómenos de distribución y eliminación del fármaco. Si estos valores son óptimos, se requiere la realización de un estudio farmacocinético-farmacodinámico, tras el cual se podrán establecer regímenes terapéuticos con una buena relación dosis-eficacia [15,35,172]. Además, son necesarias investigaciones más profundas sobre la farmacodinamia en elasmobranquios para comprender mejor el mecanismo de acción que puede conducir a efectos tóxicos [145]. Esto también puede sugerir una reevaluación del protocolo de dosificación y tratamiento aplicado en tiburones y rayas. El aumento del conocimiento de un fármaco en animales sanos de una especie es el primer paso en la evaluación del uso potencial de ese compuesto en esa especie determinada.

Los estudios farmacocinéticos son necesarios debido a la gran importancia de los datos proporcionados. Sin embargo, se deben tomar precauciones durante la realización de los mismos para controlar el estado de salud de los animales incluidos en el protocolo experimental, durante y después del periodo de muestreo, para garantizar que todos los animales que participan en el estudio permanezcan clínicamente sanos. Se deben considerar además que los estudios de cinética plasmática, como los desarrollados dentro de este Trabajo de Tesis Doctoral, presentan una gran ventaja frente a los estudios de cinética tisular, en los que en la mayoría de las ocasiones es necesario el sacrificio de los animales, acción que no es posible en especies animales de gran valor genético o económico, y que dificulta la aceptación del estudio durante la evaluación por los comités éticos. Además, los estudios de cinética plasmática brindan una oportunidad interesante para estudios complementarios que evalúen cómo un manejo intensivo de los animales puede afectar a los parámetros básicos de la sangre periférica, ya que requieren la manipulación frecuente y la toma de muestras de sangre de los animales.

G Meloxicam

G.1 Propiedades fisicoquímicas

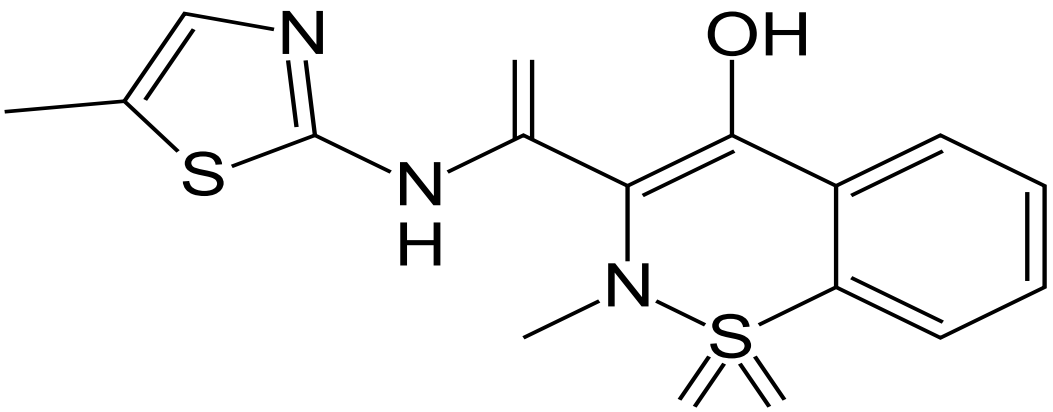


Figura 15. Estructura química semidesarrollada del meloxicam

El meloxicam es un AINE ampliamente utilizado en medicina veterinaria que ha demostrado una potente actividad analgésica y antiinflamatoria [173–178]. La estructura química del meloxicam es 4-hidroxi-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dióxido (Figura 15) y su fórmula molecular es $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$ [179]. Este compuesto se encuentra dentro de los AINEs clasificados como "oxicams" o derivados del ácido enólico (AINEs enolcarboxamínicos), ejerciendo una acción inhibidora preferencial sobre la COX-2 inducible, con un efecto mínimo sobre la COX-1 [173]. El meloxicam posee un peso molecular de 351.403 g/mol; en estado sólido forma un polvo de cristales de etileno de color amarillo claro con una baja solubilidad en agua (7.15 mg/l a 25ºC), que se incrementa en solución metanólica; tiene un pKa de 4.08 en solución acuosa y de 4.24 en la mezcla de agua:etanol (1:1) y se descompone a una temperatura de 254ºC [180]. El meloxicam es un anión dipolar o "zwitterion" en el rango de pH de 1 a 4 y un anión por encima de pH 4; es soluble en pH neutro, pero su solubilidad se reduce al acidificarse el pH, lo que puede contribuir a reducir los efectos adversos gastrointestinales, siendo el meloxicam más lipofílico a pH bajo que otros oxicams como el piroxicam y el tenoxicam [179]. El hecho de que en el anillo tiazólico del meloxicam esté presente un grupo metilo, hace que la formación de metabolitos sea más fácil, favoreciendo la eliminación más rápida del meloxicam en comparación con otros oxicams ya mencionados [181,182]. Las propiedades lipofílicas y anfifílicas de la molécula del

meloxicam favorecen el acceso intracelular del fármaco y pueden contribuir a su selectividad hacia la COX-2 [179,181].

G.2 Mecanismos de acción y actividad farmacológica

Conocer los mecanismos a través de los cuales el meloxicam ejerce su acción terapéutica, cómo se desarrolla su actividad farmacológica, así como su metabolización y eliminación es de gran importancia para poder generar protocolos farmacoterapéuticos con este fármaco que sean seguros y eficaces, evitando sus potenciales efectos adversos e interacciones con otros fármacos [179].

El meloxicam posee un mecanismo de acción similar al del resto de AINEs, que consiste en reducción en la biosíntesis de eicosanoides mediante la inhibición de la enzima COX [173]. Esta enzima posee dos isoformas principales, la COX-1 (predominantemente constitutiva) y la COX-2 (predominantemente inducible); siendo ambas constitutivas e inducibles (pese a que inicialmente se consideró a la COX-1 como una enzima exclusivamente constitutiva y a la COX-2 como una enzima exclusivamente inducible) [183–185]. Se han detectado también isoformas distintas de COX, habiéndose descrito una isoforma denominada COX-3 a nivel del sistema nervioso central en humanos, roedores y perros [186–188]. Aunque la COX-3 resulta sensible al paracetamol y parece expresarse de forma constitutiva en células del córtex cerebral, el efecto fisiológico y relevancia clínica de esta isoforma todavía no están bien definidos, debido en gran medida a sus bajas concentraciones y actividad [189]. En algunas especies de peces como la trucha arcoíris y el pez cebra, se han descrito además dos formas distintas de la COX-2, llamadas COX-2a y COX-2b, mientras que la mayoría de las especies estudiadas presentan una sola forma de COX-2 [159]. La COX-2, con sus prostaglandinas metabólicas, ha sido identificada y caracterizada como un moderador fisiológico importante en peces, estando relacionada con la inmunidad, la ovulación y la adipogénesis [159]. En elasmobranquios se ha conseguido clonar la COX en la mielga (*Squalus acanthias*), estando expresada en la glándula rectal, el riñón, el bazo, las branquias, el hígado, el cerebro y el corazón [160]. Además, se ha demostrado la actividad COX i*n vitro* en la raya del atlántico (*Dasyatis sabina*) [190].

La activación de la COX-1 induce la producción de eicosanoides, siendo el tromboxano A2 (TXA2) y la prostaglandina E2 (PGE2) algunos de los más relevantes a nivel clínico [191]. El TXA2 actúa principalmente en el proceso de coagulación, promoviendo la agregación de las plaquetas e induciendo vasoconstricción; la PGE2 está relacionada con la protección gastrointestinal [143,191,192]. La COX-2, al activarse, también inducirá la síntesis de gran cantidad de eicosanoides, siendo la PGE2, la prostaciclina o prostaglandina I2 (PGI2) y la 15-epi-lipoxina A4 o "lipoxina inducida por aspirina" (LXIA) los principales eicosanoides con efecto clínico [191]. La PGI2, al contrario que el TXA2, induce vasodilatación e inhibe la agregación plaquetaria, por lo que la inhibición selectiva COX-2 promoverá la coagulación [191]. Tanto la PGE2 como la PGI2 tienen efectos protectores similares a nivel gastrointestinal; ambos inducen la renovación celular, la secreción mucosa y de bicarbonato, así como la disminución de la secreción de ácido a nivel gastrointestinal. A nivel renal, ambas prostaglandinas ejercen un efecto protector al promover la reabsorción de sodio y estimular la liberación de renina, incrementando el flujo y la perfusión renal [191,193]. La LXIA es un eicosanoide que posee un importante efecto gastroprotector y antiinflamatorio, ejerciendo un efecto antagonista sobre la vasoconstricción, la broncoconstricción y produciendo un aumento de la tasa de filtración glomerular [194]. Este eicosanoide aumenta por la vía COX-2 tras el tratamiento con aspirina, por lo que la inhibición de la COX-2 producida por el meloxicam en animales tratados simultáneamente con aspirina podría bloquear la respuesta protectora adaptativa de la LXIA y debe evitarse [195]. Tanto la PGE2 como la PGI2 producen un aumento en la transmisión del dolor, al inducir la sensibilización de los nociceptores centrales y periféricos, aumentando la expresión de COX-1 y COX-2 en los tejidos lesionados [191]. Además, tanto la COX-1 como la COX-2 están expresadas de manera constitutiva en el sistema nervioso central, con predominio de la COX-1 a nivel del córtex cerebral y la COX-2 en la médula espinal, por lo que inhibición de ambas isoenzimas puede producir un efecto analgésico y antipirético a nivel central [192,196].

Al inhibir la síntesis de prostaglandinas actuando de forma relativamente selectiva sobre la COX-2, el meloxicam tendrá efecto analgésico, antipirético y antiinflamatorio [197]. Gracias a su selectividad por la COX-2, el meloxicam muestra una alta actividad farmacológica junto con un bajo potencial de efectos adversos gastrointestinales, efectos adversos renales y una alta tolerabilidad en las diferentes especies estudiadas, lo que lo convierte en uno de los AINEs más frecuentemente utilizados en la clínica veterinaria de

especies domésticas y exóticas [165,178]. Sin embargo, pese a ser considerado un inhibidor selectivo de la COX-2 a dosis terapéuticas, el meloxicam también ejerce cierto efecto inhibitorio sobre la COX-1 [197]. Un indicador de la selectividad en la inhibición de las diferentes isoformas de la COX por parte de un AINE es la ratio IC50, que consiste en la ratio de las concentraciones plasmáticas necesarias para la inhibición del 50 % de la COX-1 y COX-2 [198]. Se han descrito diferencias significativas entre las diferentes especies animales estudiadas en el índice de inhibición IC50 COX-1/COX-2 para el meloxicam [161,187,188].

Dado que la base de datos en cuanto a inhibición selectiva de la COX-2 por parte del meloxicam es nula en especies no domésticas, se requieren estudios de inhibición de la COX por parte del meloxicam y del resto de AINEs en estas especies (incluidos los peces) [119]. Pese a que esta ratio suele utilizarse como indicador de la seguridad y potencial de prevención de efectos adversos de un AINE, debe interpretarse con cautela debido a las grandes diferencias obtenidas en estas ratios entre estudios científicos, y a las importantes variaciones interespecíficas observadas [198–200]. La mayoría de los estudios determinando la ratio IC50 están realizados *in vitro*, pudiendo aportar resultados que no reflejen la respuesta producida al administrar el fármaco *in vivo*. Por esto, el estudio clínico de los AINEs requiere de la realización de ensayos farmacocinéticos y farmacodinámicos *in vivo* [33,34].

G.3 Farmacocinética

Las propiedades farmacocinéticas del meloxicam han sido estudiadas en humanos, diversos animales de experimentación (ratones, ratas, cerdos y primates de experimentación), animales domésticos y de producción (incluyendo perros, gatos, conejos, caballos, cerdos, ovejas, cabras, terneros, gallinas, pavos…) y recientemente están siendo estudiadas también en animales exóticos: tanto mamíferos (tales como hurones, cobayas, perritos de las praderas, llamas, camellos, macacos, koalas, delfines…) como aves (palomas, flamencos, avestruces, diversas especies de psitácidas, anátidas y rapaces), reptiles (iguanas, tortugas acuáticas de agua dulce, tortugas marinas) y, todavía de manera muy escasa, en peces [174,176,201–220].

Se han estudiado sus propiedades farmacocinéticas tras la administración por las vías intravenosa, intramuscular, oral y rectal en regímenes de dosificación única y múltiple, incluyendo individuos sanos además de individuos con insuficiencia hepática, renal y pacientes geriátricos [175,221]. Dado que la administración conjunta de un fármaco con alimento es una condición que puede alterar los parámetros cinéticos, así como la eficacia de ciertos fármacos (incluidos algunos AINEs), también se ha estudiado la administración concomitante de meloxicam con alimento, demostrado la ausencia de variaciones clínicas al administrar el meloxicam con gran cantidad de alimento y/o alimentos grasos [197,222].

Se han descrito importantes variaciones interespecíficas para los parámetros farmacocinéticos del meloxicam entre las diferentes especies animales estudiadas, que sugieren diferencias interespecíficas significativas a la hora de su aplicación clínica en cuanto a las dosis requeridas y los periodos interdosis para el meloxicam entre las diferentes especies animales [138,175,178]. En la Tesis Doctoral de Montesinos (2019) se presentó una exhaustiva revisión de la cinética del meloxicam en veterinaria [223]. La Tabla 4 presenta una recopilación de los principales parámetros farmacocinéticos del meloxicam en las especies más relevantes estudiadas.

En todas las especies estudiadas, una vez el meloxicam es absorbido, éste se une ampliamente a las proteínas plasmáticas y se elimina en las heces y la orina [197,221]. El metabolismo en humana se realiza principalmente en el hígado, por acción de las enzimas del citocromo p450 (CYP), para transformarse en cuatro metabolitos principales (AF-UH 1 Se, BIBO 8032, UH-AC 110 SE y DS-AC 2SE); y en otras especies puede acceder a rutas de fase II para unirse a moléculas como la urea [197,204,224,225]. Las enzimas de la familia CYP son proteínas importantes involucradas en la metabolización de sustancias exógenas (incluidos los fármacos); se estudian con frecuencia y están bien definidos en los mamíferos, aunque su función en la mayoría de los vertebrados no mamíferos todavía no está clara [224]. En humanos, la enzima CYP predominante involucrada en el metabolismo del meloxicam es CYP2CP, con una contribución menor de la enzima CYP3A4 [224].

Tabla 4. Recopilación de los principales parámetros farmacocinéticos del meloxicam en distintas especies relevantes estudiadas.

Especie	Dosis (mg/kg) *mg	Vía	Tmax (h)	Cmax (µg/ml) *mg-eq/l	t1/2β (h)	Cle (l/h/kg) *Cle/F (l/h/kg)	REF
Humano	15*	IV	-	-	15.4	0.516*	[226]
	15*	IM	1.4	1.60	16.2	0.510*	
	15*	PO	6.0	0.93	19.3	0.564*	
Ratón	20	PO	4.0	16.70	7.4	0.125	[208]
Rata	1.0	IV	-	-	13.4	0.015	[216]
	1.0	PO	4.4	2.35*	49.9	0.023*	
Perro	0.2	IV	-	-	24.0	0.010	
	0.2	PO	7.5	0.46*	23.7	0.009*	
	0.2	SC	2.5	0.73*	23.7	-	
Cerdo Göttingen	10.0	IV	-	-	121.0	0.043	
	10.0	PO	3.0	15.35*	145.0	0.047*	
Babuino	10.0	PO	6.0	34.15*	6.1	-	
Gato	0.1	PO	-	.	25.7	0.006*	[227]
Conejo	0.2	PO	-	0.17	8.0	-	[228]
Caballo	0.6	PO	-	0.91	10.2	-	[229]
		IV	-	-	-	0.035	[230]
Burro		IV	.-	-	-	0.188	
Oveja	0.5	IV	-	-	10.8	0.10	[231]
Cabra	0.6	IV	-	-	7.4	0.026	[201]
Ternero	1.0	PO	11.6	3.10	27.54	-	[202]
Camello	0.6	IV	-	-	40.20	0.002	[232]
Delfín mular	0.1	PO	11.0	1.03	70.0	0.00	[205]
Perrito de las praderas	1.0	SC	2.0	4.30	11.88	-	[233]
Hurón	0.2	SC	-	0.79	14.6	0.013	[234]
Cobaya	1.5	IV	-	-	3.7	0.130	[176]
		PO	-	0.92	3.5	0.241*	
Llama	0.5	IV	-	-	17.4	0.192	[235]
	1.0	PO	21.4	1.31	22.7	0.230*	
Koala	0.4	IV	-	-	1.19	0.440	[236]
	0.2	SC	0.5	0.19	1.01	-	
	0.2	PO	6.7	0.013	-	-	

(Continúa en la página siguiente).

Especie	Dosis (mg/kg)	Vía	Tmax (h)	Cmax (µg/ml) *mg-eq/l	t1/2β (h)	Cle (l/h/kg) *Cle/F (l/h/kg)	REF
Gallina	1.0	IM	0.8	8.94	5.50	-	[237]
		PO	3.1	3.04	5.79	-	
	0.5	IV	-	-	3.21	0.013	[217]
Pavo			-	-	0.99	0.055	
Pato			-	-	0.72	0.061	
Paloma			-	-	2.40	0.039	
Avestruz			-	-	0.5	0.720	
Loro gris	1.0	IV	-	-	31.40	0.002	[165]
		IM	0.5	8.32	35.30	-	
		PO	13.2	4.69	33.3	-	
Buitre del Cabo	2.0	IM	0.6	3.58	0.42	0.130*	[174]
	2.0	PO	0.5	5.25	0.32	0.056*	
Loro de La Española	1.0	IV	-	13.30^{Δ}	15.9	0.012	[177]
		IM	1.4	10.50	15.1	-	
		PO	5.0	3.70	15.8	-	
Halcón de cola roja	0.5	IV	0.3	0.53^{Δ}	0.49	1.675	[219]
		PO	0.7	0.18	3.97	0.543	
Búho virginiano	0.5	IV	0.2	3.77^{Δ}	0.78	0.154	
		PO	7.8	0.37	5.07	0.175	
Flamenco menor	0.5	IM	0.2	6.01	1.93	0.030	[220]
		PO	3.1	1.79	6.05	0.020	
	1.0	IM	0.3	5.50	1.83	0.190*	[238]
		PO	1.3	1.00	3.83	0.590*	
Iguana verde	0.2	IV	1.8	0.63	9.93	0.037	[207]
		PO	16.3	0.19	12.96	0.040	
Tortuga de orejas rojas	0.2	IV	-	-	9.78	0.002	[239]
		IM	1.5	0.72	13.53	-	
		IC	2.8	1.15	5.73	-	[240]
Tortuga boba	0.1	IV	-	0.06^{Δ}	38.50	0.005	[212]
		IM	0.8	0.07	3.26	-	
	2.0	SC	-	3.63	2.99	-	[241]
Tortuga verde	1.0	SC	-	9.35	-	-	
Tortuga lora			-	6.76	5.51	-	

IV, vía intravenosa; IM, vía intramuscular; PO, vía oral; SC, vía subcutánea; IC, vía intacelómica; Tmax, tiempo hasta la máxima concentración; Cmax, concentración máxima; t1/2β, semivida de eliminación; Cle, aclaramiento; Cle/F, cociente del aclaramiento entre la biodisponibilidad; $^{\Delta}$ indica C_0, concentración extrapolada a tiempo cero tras administración IV; REF, referencia.

El metabolismo ocurrido a través de las enzimas CYP debe estudiarse cuidadosamente antes de la extrapolación entre taxones, ya que se ha demostrado que los CYP de los peces actúan de manera diferente en comparación con los de los mamíferos [242]. Las diferencias en las enzimas de la Fase I pueden estar relacionadas con los parámetros farmacocinéticos altamente variables entre los peces. Un estudio anterior evaluó el sistema de metabolización de los peces utilizando varias isoformas de CYP y mostró diferencias interespecíficas en las actividades y la sensibilidad a diferentes sustancias químicas, incluido el AINE diclofenaco [243]. Estas variaciones podrían modificar la eliminación de meloxicam en algunas especies de peces y aumentar la importancia de desarrollar más estudios de PK y PD, ya que las dosis requeridas y los protocolos terapéuticos pueden dar lugar a grandes variaciones entre especies.

Dado que el meloxicam se metaboliza principalmente a nivel hepático y es eliminado en heces y orina (predominantemente en forma de metabolitos), las características únicas del hígado de los elasmobranquios, en los cuales el tamaño y composición varía a su vez entre especies, puede también afectar a su cinética [36,244]. Además, como se ha abordado en detalle en el apartado B.3 (Sistema excretor), los sistemas porta hepático y porta renal descritos en peces, así como las grandes diferencias existentes entre los riñones de los mamíferos y los de los peces, con sus tasas de filtración más altas, pueden influenciar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del meloxicam en elasmobranquios y deben ser igualmente tenidas en cuenta [50,53,245].

G.4 Efectos adversos e interacciones farmacológicas

Como se ha presentado en el apartado anterior, al inhibir (aunque de manera parcial) la COX-1, el meloxicam puede causar efectos adversos que se darán principalmente a nivel digestivo, renal, hepático, sistema óseo y cartilaginoso, así como en la coagulación de la sangre [246–252]. Por orden de aparición, los efectos adversos a nivel gastrointestinal son los más frecuentes, seguidos de la toxicidad hepática y renal, aunque de manera menos frecuente, y por último las alteraciones de la agregación plaquetaria, la letargia y la polidipsia, que están descritos como efectos secundarios infrecuentes [247,248,253–255].

Por otro lado, el meloxicam, al igual que el resto de AINEs, se emplea frecuentemente en el manejo terapéutico del dolor y la inflamación de manera conjunta con otros fármacos analgésicos y/o antiinflamatorios. Además, puede ser prescrito en combinación con otros fármacos indicados para tratar enfermedades concomitantes que el paciente pueda padecer [195]. Las interacciones farmacológicas pueden producir efectos beneficiosos, efectos adversos o bien no suponer efectos a nivel clínico; estas pueden resultar de interacciones farmacocinéticas, interacciones farmacodinámicas, incompatibilidad farmacéutica (como puede ser las combinaciones de ácidos y bases), o una combinación de estos mecanismos [256]. Por esto, además de conocer los posibles efectos adversos del meloxicam, es necesario tener en cuenta las interacciones farmacológicas que pueden desarrollarse y potenciar la aparición de toxicidad. Se deberá considerar por tanto como factor de riesgo su administración en combinación con otros principios activos que puedan causar toxicidad renal, hepática, o alteraciones a nivel digestivo y de la coagulación [183,257,258]. Además de la administración junto con fármacos con los que pueda producir un efecto sinérgico en cuanto a su toxicidad, se deben considerar otros factores de riesgo, tales como la administración en pacientes con enfermedades concomitantes y que cursen con enfermedad renal, hepática, trastornos digestivos o hipertensión/hipovolemia [183]. Es importante que además de conocer y evaluar los efectos adversos, así como las interacciones farmacológicas del meloxicam con los fármacos que se van a emplear en combinación, se realice una revisión exhaustiva del historial clínico del paciente, junto con un examen físico completo antes de la administración del fármaco [249].

Algunos de los efectos secundarios descritos más frecuentemente a nivel gastrointestinal son los vómitos, diarrea, anorexia, gastritis y úlceras gástricas de moderadas a severas, que pueden producir un importante sangrado y llegar a ocasionar la muerte; también se ha descrito recientemente la perforación del colon en cuatro perros tratados con meloxicam [259,260]. Los efectos adversos a nivel digestivo ocurren por una producción de leucotrienos aumentada, la inhibición de las prostaglandinas E_2 e I_2, unida a la alteración de los canales iónicos; esto produce en conjunto una irritación de la mucosa del tracto digestivo [191,249]. Añadido a este mecanismo, se debe tener en cuenta que el meloxicam, al ser un ácido, puede por sí mismo irritar directamente la mucosa gastrointestinal cuando se administra por vía oral [173]. En caso de aparecer efectos adversos a nivel gastrointestinal, la acción clínica más empleada consiste en retirar el

tratamiento hasta que se resuelvan los signos clínicos, para volver a instaurarlo una vez estos han desaparecido, acompañando el AINE de un protector gástrico, y cambiando, si es necesario, la dosis o el principio activo [195]. Cabe destacar que incluso en el caso de los AINEs selectivos de la COX-2 (incluido el meloxicam), la administración de estos fármacos a dosis elevadas se ha asociado a una mayor afectación y toxicidad, incluyendo ulceración gastrointestinal [261,262]. En caballos administrados durante dos semanas con meloxicam a 3 mg/kg PO q 24 h (cinco veces superior a la dosis recomendada) se ha descrito colitis, edema ventral, diarrea, inapetencia, leucopenia, neutropenia, hipoproteinemia e hipoalbuminemia [263]. Debido a los posibles efectos de los AINEs sobre la cicatrización de las erosiones en la mucosa gastrointestinal, estos fármacos no deben ser utilizados o deberán emplearse con cautela en animales con lesiones digestivas activas [264].

El meloxicam administrado simultáneamente con otros AINEs puede producir un efecto sinérgico que potenciará la aparición de efectos adversos, habiéndose descrito la perforación gastroduodenal en varios perros tratados experimentalmente mediante asociación de varios AINEs [183,265]. Todavía no se han estudiado los efectos sinérgicos de los AINEs en especies animales no domésticas, por lo que el uso clínico conjunto debe ser evitado, dejando un tiempo de lavado adecuado que garantice la seguridad entre administraciones de distintos fármacos. La administración conjunta de meloxicam y corticosteroides también puede producir sinergias en cuando a los mecanismos de toxicidad gastrointestinal: la combinación de meloxicam con dexametasona ha demostrado incrementar de manera significativa la afectación de la mucosa gástrica y la aparición de úlceras, en comparación con su administración sin corticosteroide [286].

Los efectos adversos del meloxicam a nivel renal se deben a que la COX se expresa de manera constitutiva en este órgano, y también puede ser activada durante la isquemia e hipotensión, produciendo un aumento de las PGE2 y PGI2. Esto produce un aumento de la excreción de sodio por una reducción de su reabsorción, modifica el transporte de cloro y altera el flujo sanguíneo total renal mediante la estimulación de la liberación de renina [191,266]. Al reducir los efectos protectores de las prostaglandinas, tales como la vasodilatación renal y el incremento de excreción de sodio, los principales efectos adversos de los AINEs son la vasoconstricción renal (con la azotemia, necrosis papilar y lesión tubular aguda asociadas), así como el descenso de la excreción de agua y sodio

(pudiendo desencadenar una retención hídrica, hipertensión y edema) [255]. Por tanto, en las especies estudiadas, se recomienda monitorizar los parámetros indicadores de correcta perfusión renal (creatinina y tasa de filtración glomerular), los indicadores de lesión tubular aguda (tales como la presencia de cilindros o células epiteliales en sedimento urinario), los niveles de electrolitos, el peso corporal y la presión sanguínea del individuo a tratar [165,266].

La distribución anatómica de las isoformas COX-1 y COX-2, así como su expresión en estados de isquemia e hipovolemia, parecen mostrar diferencias interespecíficas [267]. Al estar tanto la COX-1 como la COX-2 implicadas en la regulación de la función del riñón, dado que, en estados de hipotensión o hipovolemia la COX-2 induce la producción de PGE_2, la utilización de AINEs selectivos, producirá igualmente una alteración de la perfusión renal [255,259]. Estudios previos han demostrado que la selectividad de los AINEs para la COX no está directamente correlacionada con la aparición de efectos adversos a nivel renal, sugiriendo que la acumulación del AINE es el factor más importante a tener en cuenta sobre la aparición de efectos adversos en riñón, y no su selectividad COX [259]. Cabe mencionar que la acumulación del meloxicam y de los diferentes AINEs a nivel renal también muestra diferencias interespecíficas, por lo que la posibilidad de daño renal será dependiente de la especie, y será necesario realizar estudios de cinética y dinamia de los diferentes fármacos a nivel específico, para descartar su acumulación excesiva a nivel renal y apoyar el uso seguro del fármaco [165,174,197,206,221,268]. Así, en los estudios realizados con meloxicam administrado durante 90 días en perros no se encontraron indicadores de daño renal en las analíticas de sangre ni de orina, mostrando eficacia y seguridad para este fármaco en individuos sanos sometidos a tratamientos prolongados [175,247]. Dado que la estructura y función renal de los teleósteos y los elasmobranquios es muy distinta a la de los mamíferos, cabría esperar variaciones en los efectos secundarios producidos por el meloxicam y los AINEs a nivel renal, siendo necesarios futuros estudios en este campo [50].

En general, el hecho de que los AINEs puedan contribuir a agravar la hipertensión debe ser tenido en cuenta a la hora de administrarlos con fármacos hipotensores tales como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los betabloqueantes, habiéndose demostrado que la administración conjunta resulta en una disminución del efecto hipotensor asociado a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas producida por los

AINEs [269]. Pese a esta disminución del efecto hipotensor, no hay evidencias clínicas de que la combinación mencionada produzca fallo renal. Sí se ha descrito una afectación importante de la función del riñón, con una disminución del flujo renal y la excreción de sodio en caballos tratados con furosemida en combinación con meloxicam (inhibidor COX-2 selectivo) *vs* fenilbutazona (inhibidor COX no selectivo), afectando ambos AINEs a la función renal de manera independiente a su selectividad COX [270]. Los efectos sinérgicos entre la furosemida y el meloxicam en cuanto a toxicidad renal parecen deberse a la unión del efecto reductor de sodio en sangre del diurético y el efecto de depleción de sodio del AINE, pudiendo desencadenar en conjunto una hipovolemia severa, con una disminución de la perfusión renal [271]. Otra combinación que debe evitarse es la utilización simultánea de corticoides y AINES, habiéndose descrito toxicidad renal en perros tras la administración simultánea de meloxicam con prednisolona [256].

A nivel hepático se han descrito efectos adversos del meloxicam tanto en humanos como en animales de laboratorio, con infiltración mononuclear y necrosis de células parenquimatosas en ratas tratadas a dosis terapéuticas [272,273]. Sin embargo, también se han encontrado evidencias de que el meloxicam ejerce un efecto protector frente a la fibrosis hepática, asociada a la supresión de las lipo-peroxidasas y reducción de glutatión, lo que disminuye la vía oxidativa en el hígado [274]. En perros tratados con meloxicam a dosis única de 0.2 mg/kg no se detectaron variaciones significativas en ninguno de los parámetros de bioquímica plasmática, a diferencia del paracetamol y el carprofeno que sí produjeron un aumento significativo de la ALT [266]. También se ha estudiado la toxicidad hepática del meloxicam tras tratamientos prolongados en perros (90 días), caballos (40 días) y conejos (29 días), sin mostrar signos analíticos (y tampoco anatomopatológicos, en el caso de los caballos) de toxicidad hepática asociada al principio activo [229,247,275].

Dado que actualmente todavía no existe prácticamente información sobre el uso de meloxicam en animales exóticos con insuficiencia hepática o renal, el empleo de este fármaco en estos casos debe realizarse con cautela y bajo la adecuada monitorización. Se han estudiado los parámetros farmacocinéticos del meloxicam en humanos de edad avanzada (>65 años) y en casos de insuficiencia hepática o renal moderada, sin haberse encontrado diferencias significativas en los parámetros cinéticos ni en la aparición de efectos

adversos frente a individuos adultos sanos [183,221,276,277]. En gatos con enfermedad renal crónica tratados con meloxicam a dosis de 0.02 mg/kg/día durante 6 meses no se detectó una disminución en la funcionalidad y excreción renal, aunque sí se describió una mayor proteinuria a los 6 meses de tratamiento en comparación con el grupo control [278]. Debido a la escasa información disponible en este tipo de pacientes, se recomienda una reducción de la dosis de meloxicam en individuos que sufren de enfermedades hepática o renal a modo de precaución [183,276].

Los efectos adversos del meloxicam a nivel del cartílago articular han demostrado ser despreciables, incluso a concentraciones altas, en estudios realizados *in vitro* [279]. La ausencia de efectos adversos producidos por el meloxicam en el cartílago es de gran importancia en elasmobranquios dado su esqueleto cartilaginoso [4]. En un estudio realizado en ratas a las que se les inducía osteoartritis, tanto la dosis baja (0.2 mg/kg) como la dosis alta (1.0 mg/kg) de meloxicam tuvieron un efecto condroprotector, y la dosis alta también protegió contra las lesiones óseas subcondrales [280]. En estudios *in vivo* el meloxicam ha demostrado gran eficacia en el manejo clínico de la osteoartritis (que se caracteriza por la lesión del cartílago sinovial y la remodelación ósea) no sólo en humanos y animales de experimentación, sino también en diferentes especies de animales domésticos y silvestres [177,268,281,282].

Por último, los efectos adversos de los AINEs sobre la coagulación sanguínea han sido muy estudiados en humanos y en animales de compañía. Este grupo de fármacos puede inducir alteraciones en la coagulación y sangrados debido a la disfunción plaquetaria asociada con la inhibición de la COX-1 que altera la producción de tromboxano [283]. El meloxicam en concentraciones terapéuticas y supraterapéuticas ha demostrado no afectar a los tiempos de coagulación en humanos, a diferencia de otros AINEs como el ketorolaco que sí los aumenta [284]. En perros, se ha constatado que el uso del meloxicam a dosis terapéuticas no eleva de manera significativa el número de plaquetas, el hematocrito, los niveles de prostaglandina-F2α ni de tromboxano A2 y no produce variaciones significativas en la agregación plaquetaria [247,258,283]. A nivel clínico, el uso del meloxicam a dosis terapéuticas ha demostrado no alterar los tiempos de sangrado bucal en perros sometidos a intervenciones quirúrgicas y tampoco parece producir alteraciones en la función plaquetaria y tiempos de coagulación de gatos, macacos y humanos [285–287].

Los efectos adversos de los AINEs, en general, aparecen en especies de animales domésticos dentro de las tres primeras semanas de tratamiento; por ello se recomienda la realización de controles analíticos completos a las dos semanas del inicio del tratamiento prolongado en régimen de dosis múltiples [158]. En reptiles, aves y peces, se ha observado una rápida metabolización del meloxicam, lo que impediría su acumulación y garantizaría su seguridad a la exposición repetida al fármaco [165,174,211,217]. El meloxicam ha demostrado producir una menor cantidad de efectos adversos tanto a nivel digestivo, renal, hepático y hemostático en humanos y en las diferentes especies domésticas estudiadas en comparación con otros AINEs como el carprofeno, la fenilbutazona, el flunixin meglumina o el ketoprofeno [247,288,289]. Sin embargo, no se han realizado estudios exhaustivos evaluando los efectos adversos de estos AINEs en la mayoría de las especies no domésticas [290].

En peces se han realizado pocos estudios de toxicidad, si bien los resultados obtenidos por el momento parecen indicar un buen índice de seguridad a dosis bajas. En el carpín, tras la administración de una dosis única de meloxicam 5 mg/kg IM, no se detectaron reacciones adversas ni lesiones histopatológicas asociadas a la administración del fármaco [144]. Otros AINEs, como la indometacina, han sido estudiados por vía oral (5 mg/kg) administrados de manera crónica (cada 24 h durante 30 días) en truchas arcoíris, sin producir lesiones macroscópicas o histopatológicas [291]. Sin embargo, las truchas tratadas con el mismo fármaco en un régimen similar, pero a dosis altas (10-15 mg/kg), desarrollaron lesiones macroscópicas e histopatológicas, incluyendo úlceras cutáneas, con distensión y necrosis de la pared celómica [291]. El ibuprofeno ha demostrado afectar de manera significativa a la actividad de algunas enzimas antioxidantes y de biotransformación en el pez cebra; el diclofenaco en inmersión a dosis de 1-500 µg/L, provoca una acumulación dosis-dependiente en todos los órganos estudiados y lesiones histopatológicas en branquias y riñones a dosis superiores a 5 µg/L [164,292]. Estos estudios muestran la importancia de realizar estudios de toxicidad específicos y del riesgo que supone sobredosificar a los peces con AINEs, especialmente si se trata de compuestos no selectivos para la COX.

G.5 Uso clínico del meloxicam en teleósteos y elasmobranquios

La presencia de actividad COX ha sido demostrada en elasmobranquios, y la expresión génica de la COX-2 ha sido confirmada en un amplio número de especies de teleósteos, por lo que el uso de AINEs selectivos parece una opción terapéutica a considerar en peces, aunque todavía se requiere mayor investigación que apoye esta propuesta [159,190]. El meloxicam se utiliza frecuentemente de forma empírica en peces por vía oral e intramuscular como fármaco antiinflamatorio y analgésico debido a su inhibición selectiva sobre la COX-2, aunque todavía no se ha probado científicamente su eficacia y no se conocen sus propiedades farmacocinéticas y dinámicas en muchas especies [293]. Es importante mencionar que en España todavía no existe un preparado comercial de meloxicam expresamente autorizado para uso en peces o animales no domésticos, por lo que los profesionales que trabajan con estas especies, incluidos los elasmobranquios, utilizan medicamentos destinados a su uso en pequeños animales de compañía [138,151].

Cuando se inició esta tesis en octubre de 2019, todavía no había ningún estudio farmacológico publicado con meloxicam en elasmobranquios, y el único estudio farmacocinético con meloxicam en peces se había publicado en 2016, administrando meloxicam a dosis de 1 mg/kg IV e IM en tilapia del Nilo (*Orechromis niloticus*). Este trabajo mostraba que la tilapia eliminaba el fármaco considerablemente más rápido que los mamíferos, y sugería la necesidad de una administración más frecuente para poder alcanzar y mantener niveles suficientes en plasma [142].

Haciendo eco de la necesidad de conocimiento científico sobre el comportamiento de un fármaco tan ampliamente utilizado, para apoyar su uso racional por parte de los veterinarios clínicos, en los últimos años se han publicado un considerable número de artículos sobre este tema. A finales de 2021 se publicó otro estudio que evaluaba las propiedades cinéticas del meloxicam tras la administración de 1 mg/kg IM y PO en tilapia, en el que los niveles de concentración plasmática del fármaco no superaban aquellos considerados terapéuticos en otras especies, que mostraba también una eliminación muy rápida con niveles por debajo del límite de detección a las nueve horas tras la administración [294].

En 2022 se ha publicado un estudio farmacocinético con meloxicam en trucha arcoíris, tras la administración de una dosis de 1 mg/kg IV, IM y PO, en el que se apuntan unos

elevados niveles de fármaco en plasma, pero una rápida eliminación que no permiten establecer un régimen posológico de dosis múltiples adecuado para esta especie [295]. Al igual que en tilapia, tras la administración IM se alcanzan mayores concentraciones plasmáticas y una mayor biodisponibilidad que por la vía oral. El hecho de que el meloxicam presente una rápida absorción en peces teleósteos tras la administración intramuscular puede suponer una ventaja importante para su uso en procedimientos traumáticos o dolorosos y de corta duración. Sin embargo, su rápida eliminación limitaría en gran medida el uso de este fármaco en peces óseos, ya que la corta semivida de eliminación y el reducido tiempo medio de residencia del meloxicam en el organismo se traduciría en periodos interdosis por debajo de cuatro horas, lo que reduce considerablemente las posibilidades para su aplicación clínica rutinaria [33,142]. Una manipulación de los peces repetida varias veces en el día para la administración del fármaco podría suponer más inconvenientes que beneficios, dada la alta susceptibilidad de los peces al estrés por captura y los posibles traumatismos y complicaciones que podrían aparecer asociadas a las capturas repetidas y frecuentes [142].

En elasmobranquios está descrito el uso anecdótico del meloxicam a dosis empíricas de 0.07-0.40 mg/kg, aunque la mayoría de los clínicos utiliza la dosis extrapolada de perros, de 0.2 mg/kg IM cada 48-72 h. No se han reportado reacciones adversas tras la administración de las dosis y regímenes posológicos mencionados, pero la efectividad del tratamiento continúa siendo desconocida [138]. Estos regímenes posológicos indicados en distintos formularios para elasmobranquios son protocolos muy prácticos y conservadores, que administran el fármaco cada 2-3 días, evitando la manipulación frecuente de los animales enfermos, fácilmente estresables y de difícil manejo. Sin embargo, en ausencia de resultados de eficacia y teniendo en cuenta la rápida eliminación y la necesidad de dosis mucho más elevadas requeridas en peces teleósteos para alcanzar concentraciones las plasmáticas deseables [138,142,212], cabe poner en duda su utilidad terapéutica.

Un estudio publicado muy recientemente, en 2022, evalúa la administración del meloxicam en dosis únicas (1 mg/kg IM y 2 mg/kg PO) en la raya amarilla (*Urobatis jamaicensis*), aportando datos farmacocinéticos distintos de los obtenidos previamente en teleósteos. Con una C_{max} de 1.29 y 0.42 µg/ml y una $t_{1/2\beta}$ de 5.75 h y 15.46 h para las vías

intramuscular y oral, respectivamente, los resultados de este estudio abren una posibilidad de uso terapéutico del meloxicam en este grupo de animales [296].

Todos estos antecedentes nos han llevado a plantear el presente Trabajo de Tesis Doctoral y estudiar el meloxicam, un fármaco necesario por su utilidad clínica, en elasmobranquios de distintos órdenes, utilizando especies que estén muy presentes en los acuarios y de fácil manejo como modelos. Esto posibilitará la realización de estudios farmacológicos con este fármaco en este grupo de animales, y aportar datos cinéticos que nos permitan establecer regímenes posológicos basados en el conocimiento científico, incrementando además el conocimiento de la seguridad de la administración del meloxicam en tiburones y rayas. En definitiva, el estudio farmacocinético del meloxicam en diferentes especies de elasmobranquios permitirá establecer un conocimiento científico (estudio básico) y a la vez ayudar a los veterinarios especialistas en medicina de animales no domésticos/acuáticos (estudio clínico).



OBJETIVOS

III OBJETIVOS

Los objetivos del trabajo de Tesis Doctoral se dividieron en un objetivo general y dos objetivos específicos, que corresponden a los dos capítulos que la componen.

A Objetivo general

Esta Tesis Doctoral pretende aportar información novedosa que incremente los conocimientos existentes en cuanto a manejo clínico y terapéutico de los elasmobranquios. Nuestro trabajo tiene como objetivo proporcionar resultados que permitan mejorar los regímenes posológicos y optimizar los protocolos farmacoterapéuticos del antiinflamatorio meloxicam en tiburones y rayas, además de favorecer la comprensión y la interpretación de los principales parámetros hematológicos, bioquímicos y de electroforesis de proteínas en este grupo de animales, como base de la herramienta diagnostica que supone la analítica sanguínea tanto en animales enfermos como en la exploración de posibles reacciones adversas a los fármacos. En concreto, en dos especies modelo de elasmobranquio: un tiburón (el tiburón alitán, *Scyliorhinus stellaris*) y una raya (la raya mosaico, *Raja undulata*), por su elevada presencia en acuarios y fácil manejo, y como representantes de las dos superórdenes de elasmobranquios, superorden *Selachimorpha* (tiburones) y superorden *Batoidea* (rayas).

B Objetivos específicos, por capítulos

B.1 Primer capítulo

Objetivo: estudiar el comportamiento cinético del meloxicam como fármaco antiinflamatorio y analgésico para su uso en elasmobranquios.

Subobjetivo 1: conocer las propiedades cinéticas del meloxicam tras la administración intravenosa en el tiburón alitán, que permita el estudio completo de los parámetros de disposición cinética del fármaco.

Subobjetivo 2: determinar los parámetros farmacocinéticos del meloxicam en el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) tras la administración a dosis única utilizando las principales vías indicadas en el manejo terapéutico de elasmobranquios, vía oral e intramuscular.

Subobjetivo 3: establecer un régimen posológico de dosis múltiples para el tiburón alitán en función de los resultados anteriores (elección de vía, dosis y periodos interdosis más adecuados) y conocer el comportamiento de las concentraciones plasmáticas, los parámetros farmacocinéticos y los posibles efectos adversos tras su administración en elasmobranquios.

Subobjetivo 4: evaluar el comportamiento del meloxicam en otro grupo taxonómico dentro de los elasmobranquios, en concreto en la raya mosaico (*Raja undulata*), y determinar si existen diferencias interespecíficas para los parámetros farmacocinéticos del fármaco entre las dos especies estudiadas como modelos dentro de los superórdenes a los que pertenecen.

B.2 Segundo capítulo

Objetivo: establecer los valores de referencia en ambas especies para los principales parámetros analíticos sanguíneos, utilizando poblaciones de referencia grandes y homogéneas de animales clínicamente sanos.

Subobjetivo 1: establecer valores clásicos de referencia para los principales parámetros hematológicos en el tiburón alitán y la raya mosaico, realizando una comparación de los valores y tipos celulares de ambas especies.

Subobjetivo 2: establecer valores clásicos de referencia para los principales parámetros de bioquímica plasmática en el tiburón alitán y la raya mosaico, realizando un estudio comparativo y evaluando las diferencias obtenidas entre ambas especies.

Subobjetivo 3: definir las curvas de electroforesis de proteínas plasmáticas y establecer valores de referencia para las distintas fracciones de los electroforetogramas del tiburón alitán y la raya mosaico, realizando una comparación entre ambas especies y con los estudios previamente publicados.

Subobjetivo 4: evaluar la influencia que pueden ejercer algunos factores intrínsecos (sexo y grado de desarrollo de los individuos) y extrínsecos (salinidad del medio y dieta) sobre los valores de referencia de los parámetros analíticos sanguíneos estudiados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

IV DISEÑO EXPERIMENTAL

A Declaración ética

Todos los protocolos experimentales descritos en este apartado se han diseñado atendiendo a la normativa legal vigente en la Unión Europea (Directive 2010/63/EU) y en nuestro país (Real Decreto 53/2013). Atendiendo a la clasificación de los procedimientos proporcionados en el ANEXO IX del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, los utilizados en el presente proyecto se encuadran en los de tipo "leves", concretamente en los tipificados en los apartados: b) Estudio farmacocinético donde se administra una única dosis y se recoge un número limitado de muestras de sangre (totalizando < 10 por cien del volumen circulante) y no se prevé que la sustancia cause ningún efecto nocivo detectable; y f) Administración de sustancias por vía subcutánea, intramuscular, intracelómica, por sonda gástrica e intravenosa a través de los vasos sanguíneos superficiales, donde la sustancia sólo tiene un efecto leve en el animal, y los volúmenes se encuentran dentro de límites apropiados para el tamaño y la especie del animal. Antes de iniciar cada fase del estudio, se realizó un examen preliminar de cada individuo y una analítica sanguínea que incluía hematología y bioquímica, para confirmar el buen estado de salud de los animales y excluir la presencia de condiciones o enfermedades que podrían debilitarlos o interferir en el estudio. El resto de la metodología utilizada en el proyecto se desarrolla en el laboratorio utilizando las muestras de sangre recogidas de los animales del estudio y no implica la utilización de animales vivos.

Todos los experimentos y protocolos de toma de muestras, incluidos los muestreos que se llevaron a cabo en colaboración con el Aquarium Finisterrae, el Bioparc Acuario Gijón, el Museo Marítimo del Cantábrico y el Acuario de Sevilla, han sido aprobados por el Comité de Cuidado y Bienestar Animal de la Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, registrada por la Generalitat Valenciana como centro usuario de investigación con número ES460250001024 en el Registro oficial de centros de investigación y autorizado como Órgano Habilitado. Todos los procedimientos se realizaron de conformidad con las directrices y reglamentos nacionales y autonómicos existentes en el momento, realizándose los máximos esfuerzos para minimizar el sufrimiento animal. Por último, hay que destacar que tras los estudios conducidos para

realizar esta tesis ninguno de los animales empleados murió, enfermó o sufrió lesión irreversible alguna y todos pudieron volver a formar parte de las colecciones mantenidas en el Oceanogràfic y los distintos acuarios colaboradores.

B Esquema del diseño experimental

En este esquema (Esquema 1) se organiza de manera resumida todo el diseño experimental de los diferentes estudios realizados en este Trabajo de Tesis Doctoral. Aunque en el apartado siguiente describimos la metodología de forma general para los dos capítulos que componen este trabajo, los detalles de cada uno de los experimentos (que se realizaron de forma no consecutiva), así como sus resultados, pueden encontrarse en cada artículo referenciado.

Esquema 1. Diseño experimental de la Tesis Doctoral y publicaciones asociadas a cada experimento.

<table>
<tr><th colspan="8">Diseño Experimental</th></tr>
<tr><td colspan="5">Primer Capítulo</td><td colspan="3">Segundo Capítulo</td></tr>
<tr><td colspan="5">Objetivo-Estudios farmacocinéticos controlados con meloxicam
Animales-Grupo experimental reducido: S.stellaris (n=8) y R.undulata (n=7)
Ubicación-Oceanogràfic + Laboratorio Farmacología UCM + Laboratorio Farmacología UV</td><td colspan="3">Objetivo-Determinación de valores de referencia
Animales-Muestreo sanguíneo en poblaciones grandes y homogéneas de S.stellaris (n=94) y R.undulata (n=50).
Ubicación-Oceanogràfic + Finisterrae Aquarium, Bioparc Acuario Gijón, Museo Marítimo del Cantábrico, Acuario de Sevilla</td></tr>
<tr><td colspan="2">Meloxicam dosis única 0.5 mg/kg S.stellaris</td><td>Meloxicam dosis única 1.5 mg/kg + Variaciones analítica S.stellaris</td><td>Meloxicam dosis única 1.5 mg/kg R.undulata</td><td colspan="2">Meloxicam dosis múltiple 1.5 mg/kg q 24h S.stellaris</td><td>Hematología y bioquímica plasmática</td><td>Electroforesis de proteínas capilar</td></tr>
<tr><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td rowspan="2"></td><td>R.undulata</td><td>S.stellaris</td><td>S.stellaris + R.undulata</td></tr>
<tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>IV</td><td>IM</td><td>PO</td><td>IM</td><td>IM</td><td>IM</td><td>PO</td><td></td><td></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Artículo 1</td><td>Artículo 2</td><td>Artículo 3</td><td colspan="2">Artículo 4</td><td>Artículo 5</td><td>Artículo 6</td><td>Artículo 7</td></tr>
</table>

C Breve descripción de la metodología general utilizada en el primer capítulo

Para la realización de los procedimientos experimentales enmarcados en el primer capítulo de esta tesis, se utilizó un grupo de ocho ejemplares adultos de tiburón alitán (cuatro machos y cuatro hembras) y siete ejemplares adultos de raya mosaico (cuatro machos y tres hembras). Todos los ejemplares habían nacido o habían sido mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia durante dos años previos al inicio del estudio, y fueron considerados como clínicamente sanos, basándose en un examen completo de cada individuo compuesto por una revisión exhaustiva de la historia clínica de cada ejemplar, un examen físico externo y una analítica sanguínea. Los ejemplares de tiburón alitán fueron identificados de forma única utilizando los patrones de pigmentación natural dorsal; por lo tanto, no fue necesario marcarlos artificialmente (Figura 16).

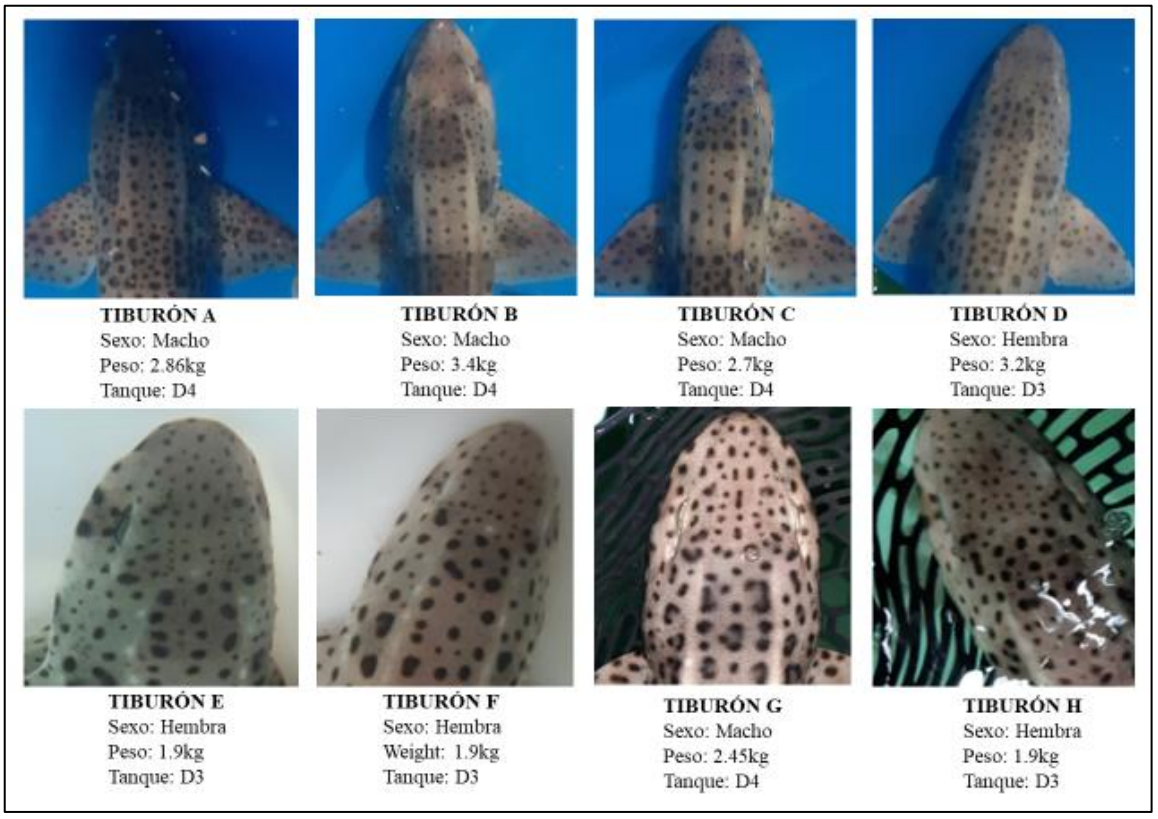


Figura 16. Detalle de la identificación de los 8 ejemplares de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) utilizados en el primer capítulo de esta tesis. Nótese los diferentes patrones de puntos que tiene cada individuo y que permitían su identificación.

Sin embargo, dado el tamaño y patrón de coloración similar de los ejemplares de raya mosaico, algunos individuos fueron identificados utilizando unas cuentas de plástico de colores unidas al animal mediante material de sutura.

Los animales que iban a ser utilizados en los diferentes estudios de este doctorado se capturaban de los tanques de exhibición del Oceanogràfic de Valencia y se transportaban a los tanques de cuarentena del mismo acuario de manera temporal, permitiendo un periodo de aclimatación mínimo de dos semanas antes del inicio de los estudios en el que se verificaba que la alimentación y el comportamiento fuesen normales. Los tanques en los que se realizaban los estudios eran tanques cilíndricos de 10.000 litros ubicados en las instalaciones de cuarentena del acuario, y que permitían un acceso más sencillo a los animales y un mayor control y monitorización de éstos (Figura 17).



Figura 17. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia Sistema D (Agua salada), tanque D4: uno de los tanques en los que se mantenían los ejemplares de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) y raya mosaico (Raja undulata) durante la realización de los estudios del primer capítulo de esta tesis. Se aprecia la técnica de captura de los animales, utilizando un salabre de plástico.

Los diferentes estudios farmacocinéticos con meloxicam incluidos en este primer capítulo de la tesis se desarrollaron como un ensayo experimental prospectivo. Se administró el meloxicam por las diferentes vías estudiadas y a las dosis seleccionadas en cada uno de los experimentos. Se realizó la toma de muestras de sangre antes de la administración del meloxicam y tras la administración, de manera repetida a lo largo de una serie de puntos de muestreo preestablecidos. El protocolo y los tiempos de administración y de muestreo se diseñaron basándose en estudios piloto que utilizaron dos ejemplares de alitán y raya mosaico por cada ensayo farmacocinético realizado y dosis de meloxicam evaluada. Aunque el número de muestras obtenidas durante el estudio farmacocinético y la

frecuencia de extracción de las mismas dependió de la vía de administración a estudiar, los protocolos garantizaban que el volumen total de sangre obtenido en cada estudio farmacocinético nunca superara el 0.25 % del peso vivo del animal, estando muy por debajo del 1 %, que es el volumen máximo de extracción indicado en peces [48].

Tras la obtención, las muestras se transfirieron de manera inmediata a tubos de 1 ml que contenían heparina de litio como anticoagulante. Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio adyacente situado en la clínica veterinaria del Oceanogràfic y procesadas en un tiempo inferior a 15 minutos tras su extracción. Se obtuvo el plasma mediante centrifugación de las muestras de sangre, que fue congelado a -18 ºC y enviado a las instalaciones del Laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid o a las del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia para la detección y cuantificación de la concentración del fármaco (Figura 18).

La determinación de la concentración de meloxicam en plasma se realizó mediante la adaptación del método de cromatografía liquida de alta eficacia (CLAE) descrito por Montesinos y col. (2019), modificado y validado en los laboratorios de los Departamentos de Farmacología y Toxicología de la UCM y de Farmacología de la UV para la detección del meloxicam en plasma de elasmobranquio [290]. El estudio y análisis farmacocinético de los datos de concentración plasmática se realizó mediante un modelo no compartimental, utilizando programas informáticos específicamente diseñados para el análisis cinético. Los datos y parámetros farmacocinéticos fueron estimados individualmente para cada animal incluido en los diferentes procedimientos experimentales y, posteriormente, se trataron todos los datos estadísticamente.

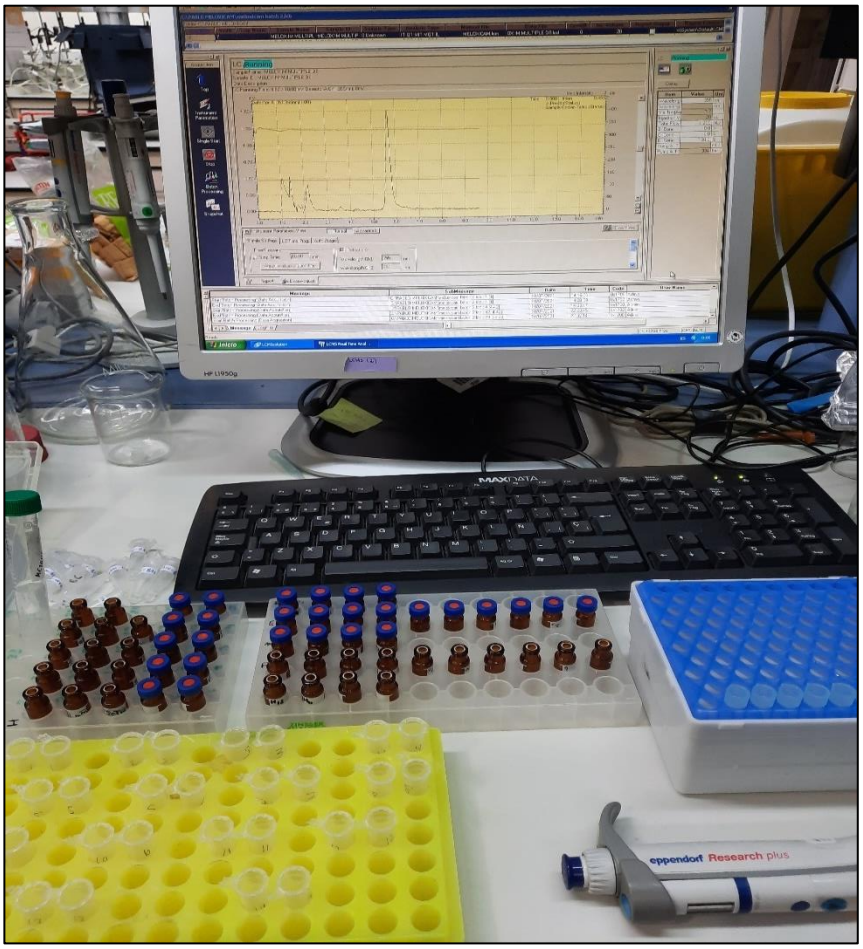


Figura 18. Procesado de muestras de plasma de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia.

D Breve descripción de la metodología general utilizada en el segundo capítulo

Debido a las dificultades de trabajar con elasmobranquios, la mayoría de los estudios publicados que determinan valores de referencia analíticos en estos animales utilizan poblaciones de referencia de pequeño tamaño (frecuentemente por debajo de los 30 individuos). Con el objetivo de generar unos valores sanguíneos lo más precisos y fiables posibles, que sirvan de referencia para veterinarios, investigadores y profesionales que trabajen con la raya mosaico o el tiburón alitán, para este capítulo de la tesis utilizamos las poblaciones más grandes y homogéneas que pudimos conseguir:

La determinación de valores de referencia para los principales parámetros de la analítica sanguínea en la raya mosaico se realizó utilizando un grupo de 43 rayas mosaico

juveniles, que habían nacido en las instalaciones del Oceanogràfic y que tenían entre 7 y 24 meses de edad en el momento del muestreo. Se complementó este estudio comparando los valores obtenidos en los animales juveniles con los valores de 7 individuos de raya mosaico adultos, también mantenidos en las instalaciones del Oceanogràfic desde hacía más de 8 años.

Para la determinación de los valores de referencia en cuanto a hematología, bioquímica y electroforesis de proteínas en el tiburón alitán, dado que el Oceanogràfic de Valencia únicamente disponía de 16 ejemplares durante el periodo de realización de esta tesis, y con el objetivo de aumentar el tamaño muestral para así poder determinar unos valores de referencia más precisos y fiables, se estableció una colaboración con cuatro acuarios españoles que también mantienen alitanes en sus instalaciones. Los acuarios colaboradores fueron: Finisterrae Aquarium (www.coruna.gal/mc2/es/aquarium-finisterrae), Bioparc Gijón Aquarium (www.acuariogijon.es); Museo Marítimo del Cantábrico (www.museosdecantabria.es/museo-maritimo), y Sevilla Aquarium (www.acuariosevilla.es). Se preparó un equipo de muestreo portátil, transportándolo desde el Oceanogràfic de Valencia y que fue recorriendo los diferentes acuarios para la realización de la toma de muestras en cada uno de ellos. Gracias a la colaboración de los acuarios mencionados se consiguió aumentar el tamaño de la población de referencia de tiburón alitán de 16 a 94 individuos.

El procedimiento experimental para la toma de muestreas tanto en la raya mosaico como en el tiburón alitán se realizó de la misma manera en todos los acuarios incluidos en el estudio: antes del inicio de los muestreos se realizó un examen físico inicial de todos los animales utilizados para verificar la inclusión en el estudio exclusivamente de animales clínicamente sanos. Se evaluó su estado general siguiendo una lista de criterios de exclusión previamente determinada. Cualquier desviación en el historial médico, comportamiento, color y apariencia de la piel, estado y reflejos oculares, apariencia de la cavidad oral, encías y dentición, presencia de lesiones externas, deformidades de la columna, natación anormal o bombeo bucal/ventilación forzada era considerado motivo de exclusión de ese individuo del estudio. Una vez el animal era considerado candidato para ser incluido en el estudio se realizó la toma de muestras, que consistió en la

extracción de 1 ml de sangre de cada individuo, la toma de medidas morfométricas, determinación del sexo y pesaje (Figuras 19 y 20).



Figura 19. Toma de muestras del tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) en el Museo Marítimo del Cantábrico, Santander.



Figura 20. Pesaje de una raya mosaico (Raja undulata) utilizando una camilla. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia.

La sangre obtenida fue procesada de manera inmediata tras el muestreo, para la determinación de los principales parámetros hematológicos. El análisis hematológico consistió en la determinación del hematocrito, sólidos totales en plasma, contaje manual de eritrocitos y leucocitos totales y recuento diferencial de leucocitos. El análisis hematológico se realizó de forma manual bajo microscopio en el laboratorio de la clínica veterinaria del Oceanogràfic para los animales muestreados en ese acuario; y en los laboratorios de los distintos acuarios colaboradores, para los ejemplares de tiburón alitán que se muestrearon en cada uno de ellos, ya que la hematología debía ser realizada al momento de la extracción para evitar alteraciones y variaciones en los parámetros. La metodología, personal y los equipos utilizados para el análisis hematológico fueron los mismos en todos los acuarios, ya que se utilizaron equipos portátiles que se transportaron a los diferentes acuarios. Tras el análisis hematológico, se obtuvo el plasma mediante centrifugación, que fue congelado para su posterior procesado (Figura 21). Una vez que el plasma sanguíneo se encontraba congelado, se envió desde los distintos acuarios hasta el laboratorio de la clínica veterinaria del Oceanogràfic, donde se realizó la determinación de los principales parámetros bioquímicos (fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, nitrógeno ureico en sangre, hierro, glucosa, calcio, cloro, potasio, sodio, fósforo, proteínas totales, colesterol y triglicéridos) y de electroforesis de proteínas.



Figura 21. Separación del plasma de tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) tras centrifugación de tubos con heparina de litio como anticoagulante, utilizando una micropipeta para su obtención y tubos Eppendorf® para su almacenamiento y congelación.

RESULTADOS:

TRABAJOS PUBLICADOS

V RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS

Los siete artículos científicos incluidos dentro de esta Tesis Doctoral están presentados a continuación. Cada trabajo está precedido de una ficha que resume las características principales del estudio. Todos los artículos han sido publicados en 2022, habiéndose realizado entre 2020 y 2022; en paralelo para los dos capítulos (farmacocinética del meloxicam y parámetros de referencia para analítica sanguínea).

Los siete artículos ordenados por temática son los siguientes:

Capítulo 1: Estudio farmacocinético del meloxicam en el tiburón alitán y la raya mosaico

- **Artículo 1.** Pharmacokinetic studies in elasmobranchs: Meloxicam administered at 0.5 mg/kg using intravenous, intramuscular and oral routes to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*).
- **Artículo 2.** Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry.
- **Artículo 3.** Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*).
- **Artículo 4.** Pharmacokinetics meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*).

Capítulo 2: Determinación de parámetros de referencia para analítica sanguínea en el tiburón alitán y la raya mosaico

- **Artículo 5.** Hematology and Plasma Biochemistry Reference Values of Juvenile Undulate Rays *(Raja undulata*) Under Human Care.
- **Artículo 6.** Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris)* Maintained Under Human Care.
- **Artículo 7.** Increasing the Data on Elasmobranch Plasma Protein Capillary Zone Electrophoresis: Electrophoretogram Description and Reference Values in the Undulate Skate (*Raja undulata*) and the Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care.

Artículo 1. Pharmacokinetic studies in elasmobranchs: Meloxicam administered at 0.5 mg/kg using intravenous, intramuscular and oral routes to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*).

- **Revista:** Frontiers in Veterinary Science
- **Impacto:** Q1 II=0.72 SJR Vet Sci 2021; Q1 (D1) II=3.47 JCR Vet.Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Carlos Rojo Solís, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Daniel García Párraga y Teresa Encinas.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio farmacocinético prospectivo con intervención.
  - **Animales empleados:** ocho tiburones alitanes (*Scyliorhinus stellaris*) adultos clínicamente sanos, mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia.
  - **Parámetros explorados:** en este estudio se determinan los principales parámetros cinéticos del meloxicam, tras su administración a dosis de 0.5 mg/kg en el tiburón alitán, utilizando las vías intravenosa, intramuscular y oral. Se extrajo sangre antes y durante tiempos predeterminados tras la administración, las concentraciones plasmáticas se determinaron mediante un método validado de cromatografía líquida de alta eficacia y los datos farmacocinéticos se obtuvieron mediante un análisis no compartimental.
- **Resultados:** El meloxicam administrado por vía oral no produjo concentraciones detectables en plasma. La administración IV produjo una semivida de eliminación media de 10.71 h, y un área bajo la curva extrapolado a infinito de 11.37 h·μg/ml. Tras la administración IM, la concentración plasmática máxima media fue 0.38 μg/ml, la semivida de eliminación media fue 11.27 h, el área bajo la curva extrapolada al infinito fue 5.98 h·μg/ml, y la biodisponibilidad absoluta media fue 56.22 %. Estos valores respaldan al meloxicam como un fármaco prometedor para su uso por vía IM en el tiburón alitán, cuestionan la eficacia de su uso único por vía oral en elasmobranquios, sugieren la utilización de dosis más elevadas en esta especie y evidencian la necesidad de realizar más estudios farmacocinéticos en tiburones y rayas.

frontiers in Veterinary Science

BRIEF RESEARCH REPORT
published: 23 March 2022
doi: 10.3389/fvets.2022.845555

Pharmacokinetic Studies in Elasmobranchs: Meloxicam Administered at 0.5 mg/kg Using Intravenous, Intramuscular, and Oral Routes to Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*)

Pablo Morón-Elorza[1,2*], *Carlos Rojo-Solís*[3], *Teresa Álvaro-Álvarez*[3], *Mónica Valls-Torres*[3], *Daniel García-Párraga*[2,3] and *Teresa Encinas*[1]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, [2] Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, Valencia, Spain, [3] Veterinary Services, Oceanogràfic, Valencia, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:
Chi-Chung Chou,
National Chung Hsing University, Taiwan

Reviewed by:
Naseer Ahmad Kutchy,
St. George's University, Grenada
Gregory Aldo Lewbart,
North Carolina State University, United States
Pierre-Louis Toutain,
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, France

***Correspondence:**
Pablo Morón-Elorza
p-moron@hotmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Veterinary Pharmacology and Toxicology, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: 29 December 2021
Accepted: 15 February 2022
Published: 23 March 2022

Citation:
Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D and Encinas T (2022) Pharmacokinetic Studies in Elasmobranchs: Meloxicam Administered at 0.5 mg/kg Using Intravenous, Intramuscular, and Oral Routes to Nursehound Sharks (Scyliorhinus stellaris). Front. Vet. Sci. 9:845555. doi: 10.3389/fvets.2022.845555

Infectious and inflammatory diseases are the most frequently diagnosed pathologies in elasmobranchs maintained under human care. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are frequently used in veterinary medicine for their anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties. Meloxicam is a commonly prescribed NSAID in elasmobranchs, but there are still no published pharmacokinetic (PK) studies supporting its use in this group of animals. In this study, meloxicam was administered at a single dose of 0.5 mg/kg to eight healthy adult nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) intravenously (IV), intramuscularly (IM), and orally (PO), with a minimum 4-week washout period between administrations. Blood samples were obtained both beforehand and at predetermined times after each administration. Plasma concentrations were measured using a validated high performance liquid chromatography method, and PK data was obtained using a non-compartmental analysis. Meloxicam administered orally did not produce detectable concentrations in blood plasma, while mean peak plasma concentration was 0.38 ± 0.08 μg/ml after IM administration. The mean terminal half-life was 10.71 ± 2.77 h and 11.27 ± 3.96 h for IV and IM injections, respectively. The area under the curve extrapolated to infinity was 11.37 ± 2.29 h·μg/ml after IV injections and 5.98 ± 0.90 h·μg/ml after IM injections. Meloxicam administered IM had a mean absolute bioavailability of 56.22 ± 13.29%. These numbers support meloxicam as a promising drug to be used IM in nursehounds, questions the efficacy of its single PO use in elasmobranchs, elucidate the need for higher dosage regimes, and evidence the need for further PK studies in sharks and rays.

Keywords: meloxicam, shark, chondrichthyan, pharmacology, pharmacokinetics, non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), half-life (T1/2)

INTRODUCTION

Aquariums serve as an indispensable research tool for the study of elasmobranchs, as by keeping them since 1860s, they have contributed to our knowledge base of sharks and rays in a wide variety of fields including, but not limited to, nutrition, reproduction, physiology, behavior, and pathology (1). They provide an easy and economical way for the scientific community to collect data on these animals that would otherwise be very difficult to obtain in the wild (2, 3). These contained facilities allow a 24 h monitoring of the study subjects, access to their medical history and data on their environmental parameters, which have all led to the identification of different pathologies in these species (2). Among these illnesses, infectious and inflammatory diseases have been the most frequently diagnosed in elasmobranchs (4). Disease management can be challenging, since the elasmobranch therapy database currently in use relies mostly on empirical data, and safe and effective therapeutic regimes for most antimicrobial and anti-inflammatory/analgesic agents in sharks and rays have not been yet established (5, 6). To this end, there is a need for updated and validated information regarding not only elasmobranch pathology, but also its accurate and effective clinical management.

The difficulty of evaluating pain in fish makes it challenging to properly manage pain and inflammation in elasmobranchs. Although it has been described that pain in fish produces stress, immunosuppression and behavioral changes, this group of animals lacks facial expression, live in water, and have social and behavioral responses very different to it when compared with mammals (7). Veterinary medicine addresses nociception from its origin to its transmission, modulation, and perception in the central nervous system. As part of a multimodal approach to analgesia, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used to eliminate pain caused by inflammation, local anesthetics to stop pain transmission, and dissociative anesthetics and opioids to modulate cerebral pain perception. Furthermore, NSAIDs can have both central and peripheral effects since their mechanism of action is the inhibition of cyclooxygenase (COX) and thereby the production of prostaglandins (8, 9). Previous studies have confirmed the genetic expression of COX messenger ribonucleic acid in many fish species, thus prompting the use of NSAIDs as analgesics in these animals (10).

Pharmacokinetic (PK) studies require frequent handling of the subjects for blood collection, making them less suitable for easily stressed, large or dangerous species (5, 11). Very few PK studies have been carried out in elasmobranchs, and the ones performed used small benthic elasmobranch species such as the white bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*) and the smooth dogfish (*Mustelus canis*) (12, 13). An advantage of using elasmobranchs for the development of PK studies is that they are susceptible to tonic immobility (TI) (11). TI is a form of physiological restraint commonly used while handling elasmobranchs for husbandry and medical procedures. It consists of a reflex that causes a temporary state of inactivity and mild sedation while the animal is placed in dorsal recumbency, reducing the need for anesthetics or sedative agents that could otherwise influence the PK parameters of the drug under study (14). Scyliorhinid sharks are frequently maintained in aquariums worldwide and are also frequently used as model species for elasmobranch studies (15, 16).

For this study, meloxicam, a NSAID that has a selective inhibition of the COX-2 enzyme, was chosen for its high importance and frequent use the clinical management of sharks and rays in aquariums (17, 18). The current recommended dosage for meloxicam can vary greatly among species, being lower in most domestic species and elasmobranchs (0.1-0.2 mg/kg), and higher in teleost fish (1 mg/kg), amphibians (1 mg/kg) and some avian species (1.0-1.6 mg/kg) (17, 19, 20). The popularity of meloxicam, along with the absence of PK data in elasmobranchs, called for the evaluation of its kinetics post- administration, which was achieved in this study using nursehounds (*Scyliorhinus stellaris*) as a model species.

MATERIALS AND METHODS

This experimental study was designed as an observational, prospective study. Animal handling and sample collection procedures were performed in agreement with and under the approval of the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat of València with the project reference ID OCE-22-19.

Animals and Experimental Conditions

A group of eight adult nursehounds (four males and four females) under managed care at Oceanogràfic of Valencia (Valencia; Spain. http//www.cac.es/oceanografic) were used in this study. All sharks were determined healthy based on clinical history, physical examination, hematology, and plasma biochemistry results. On the first day of the study, weights were recorded for all the sharks, which ranged from 2.00 to 3.35 kg (mean ± SD was 2.69 ± 0.43 kg). Animals were classified as adults based on their total length measurements, which ranged from 81 to 91 cm (mean ± SD was 83.62 ± 3.20 cm), exceeding the average length of 77 cm in adult males and 79 cm in adult females (21). All animals have been kept at Oceanogràfic for at least 2 years. For the duration of the PK study, the sharks were temporarily transferred to 10,000-liter cylindrical tanks in the quarantine facility of the aquarium, with the following environmental parameters: 12:12 h artificial light: darkness periods, water temperature of 18°C and 34 g/L salt concentration; pH ranging from 7.9 to 8.1; zero ammonia and maximum 0.05 ppm nitrite and 50 ppm nitrate. Translocation of the animals to temporary tanks was performed more than 2 weeks prior to the onset of the study, so that all sharks were fully acclimated to their new environment. Animals were provided with shaded areas and environmental enrichment for resting and hiding. Sharks were fed previously thawed pieces of teleost and cephalopods once daily ad libitum, 6 days per week. Individuals were visually monitored throughout the study for possible clinical signs associated with handling, blood collection and drug toxicity.

Experimental Protocol and Sampling

Meloxicam was administered at a single dose of 0.5 mg/kg to all eight nursehounds either by intravenous (IV), intramuscular

(IM) or two different oral (PO) methods, with a minimum 4-week washout period between studies.

For parenteral administration, meloxicam (Metacam® 5 mg/ml injectable solution, Boehringer Ingelheim S.A., Barcelona 08174, Spain) was delivered using a 23-gauge (0.6 x 25 mm) needle attached to a 1 ml syringe. Sharks were carefully captured with a rubber net and manually restrained underwater in a dorsoventral position, with the injection site above water for administration. IV administration was performed at the caudal vasculature using a lateral approach, and the administration was slow and constant, assuring that the vascular access was maintained throughout administration (5). IM injection was performed in the dorsal epaxial musculature; the needle was introduced approximately 20 mm into the musculature in the marginal region to the dorsal fin. Pressure was applied at the injection site after administration to minimize drug leakage (5).

For single dose oral administration, and to evaluate the two most common methods for oral drug delivery in sharks, two separate voluntary and forced administration studies were performed. In the first one, meloxicam tablets (Movalis® 7.5 mg/tablet, Boehringer Ingelheim S.A., Barcelona 08174, Spain) were crushed to a powder and put into gelatin capsules, which were inserted into fish that were given to the sharks administered using a feeding stick, as the animals had been previously trained. Four individuals were medicated using herring and the remaining four using mackerel pieces. Animals voluntarily ate the pieces of fish containing the medication and were monitored during the entire study to ensure that they did not regurgitate the piece of food or the capsules. In the second study, meloxicam was manually administered using a plastic 10 mm diameter orogastric tube and a 20 ml syringe. The orogastric tube length was estimated for each animal so that the medication was administered directly into the stomach. For this study, the eight individuals were divided into two groups of four. In the first group, meloxicam tablets (Movalis® 7.5 mg/tablet) were crushed to a powder and manually administered in combination with wet dog food (Hill's® a/d prescription diet restorative care wet canned food). In the second group, meloxicam suspension (Metacam® 1.5 mg/ml oral suspension, Boheringer Ingelheim S.A., Barcelona 08174, Spain) was administered with wet dog food using the same orogastric tube. All animals were monitored for regurgitation throughout the study.

Blood was drawn using a lateral access of the caudal vasculature with a 25-gauge needle attached to a 1-ml syringe. Each shark was placed in dorsal recumbency to induce TI, allowing efficient blood collection while reducing the possibility of muscular damage. The tail and posterior half of the shark were brought to the surface while the head and gills of the animal were kept underwater (see **Figure 1**). A volume of 0.4 ml blood was collected before meloxicam administration and at the following times after meloxicam IV administration: 10, 20, 40 min, and 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 36, and 48 h. The same 0.4 ml blood volume was collected in the IM and PO studies, and extraction times after administration were: 15, 30 min, and 1, 3, 6, 9, 12, 24 h. Samples were also collected at 48 h for PO administration. All samples were processed separately.

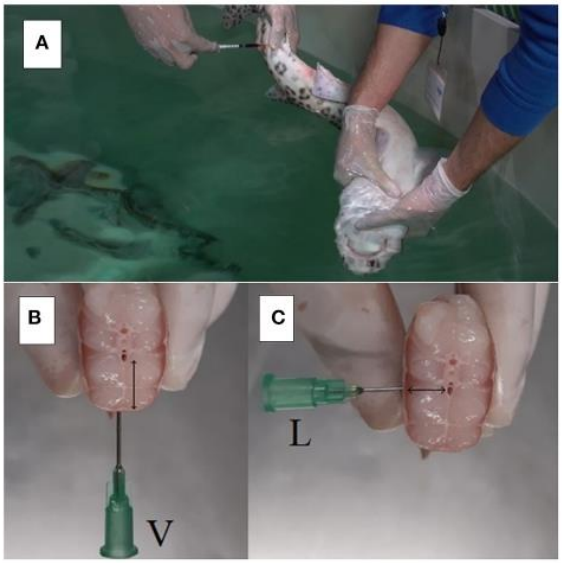


FIGURE 1 | Blood collection in an adult nursehound (*Scyliorhinus stellaris*) during PK study **(A)**. Note that the animal is manually restrained with its head and gills under water and blood is collected via lateral access to the caudal vasculature. Quarantine facilities, Oceanográfic of Valencia, Spain. Caudal sagittal section in a nursehound shark during necropsy, dorsal is above and ventral is below; detail of the indicated for venipuncture site in elasmobranchs **(B,C)**. Please note that when performing the lateral access (L) to the caudal blood vasculature for venipuncture, the amount of traumatized muscle tissue (↔) is reduced compared to the ventral access (V; ↕).

Blood Processing

After extraction, blood samples were directly transferred into 1 ml lithium heparin tubes (Aquisel® 1 ml 12x55mm, AQUISEL S.L., Abrera 08630, Spain). Samples were maintained at 4°C, transported to the aquarium's laboratory, and processed within 30 min of their collection. At the laboratory, heparin tubes were centrifuged at 590 g for 5 min at room temperature (24°C) in an Ortoalresa® centrifuge (Ortoalresa® RT106 Na 170007/01, 132 mm rotor radius, 35-degree angle fixed, Ortoalresa-Alvarez Redondo S.A., Daganzo de Arriba 28814, Spain). Plasma was collected and transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes, which were then frozen at −20°C and sent to the Pharmacology and Toxicology Department of the Complutense University of Madrid to measure meloxicam concentrations.

Meloxicam Quantification

Meloxicam concentration in each plasma samples was determined using a previously described reverse-phase high performance liquid chromatographic method, validated for its use in different non-mammalian species (22, 23). In this study, a C18 column (Mediterranean Sea C-18 column; Teknokroma Analítica S.A., Barcelona 08173, Spain) was equipped to the chromatography system (Teknokroma Analítica S.A., Barcelona 08173, Spain). A 20 mM potassium phosphate buffer (pH, 3.5)

with acetonitrile (50:50 [vol:vol]) as a mobile phase, which was delivered via an isocratic flow at a rate of 1.2 ml/min. The wavelength of the UV detector was 355 nm. Drug quantification was performed via chromatographic peak integration. For drug concentration measurements, a volume of 0.25 ml shark plasma was mixed with 100 µl of hydrochloride acid solution (5M) and vortexed for 2 min. Afterwards, 3 ml of diethyl ether was added, and the solution was vortexed again for 10 min and centrifuged at 4,500 g and 4°C for 10 min. Finally, the organic layer was collected, transferred to a new test tube, evaporated until dry (at 45°C, under a vacuum stream), and reconstituted in 0.25 ml of methanol for injection into the chromatography system. A calibration curve was created using solutions of known meloxicam concentration (from 1 to 2,500 ng/ml) in methanol, displaying linear absorbance at the studied concentrations ($R^2 > 0.99$). The limit of detection was 4 ng/ml, the limit of quantification was 15 ng/ml, the inter-assay variability was 5.19% and intra-assay variability was 5.73%. The mean ± SD meloxicam recovery in nursehound plasma samples using this protocol was 92.85 ± 5.30% after adding known concentrations of meloxicam (Sigma-Aldrich Química SA, Tres Cantos 28760, Madrid, Spain) to blank *S.stellaris* plasma.

Pharmacokinetic Analysis

Mean peak plasma concentration (C_{max}) and mean time to peak plasma concentration (T_{max}) were calculated directly from the plasma concentrations obtained during the study.

A non-compartmental analysis was performed using a commercially available software (PK Solutions, version 2.0, Summit Research Services, Montrose, Colorado USA) and the following PK parameters were evaluated: plasmatic concentration extrapolated to 0 h (C_0), elimination half-life ($t_{1/2\beta}$), area under the plasma concentration computed using observed data points only (AUC_t), area under the plasma concentration extrapolated to infinity (AUC_{inf}), and mean residence time (MRT). AUC after IM and IV administration provide the absolute IM bioavailability (F) of meloxicam. In addition, apparent volume of distribution in pseudo-equilibrium conditions (Vd) and systemic clearance (Cl) were estimated after IV administration and corrected using the F value after IM administration. Mean absorption time (MAT) was calculated as the difference between MRT for IM administration and MRT for IV administration. Plasma concentrations and PK parameters are expressed in this article as means ± SD.

RESULTS

Meloxicam administered at a dosage of 0.5 mg/kg PO in nursehounds did not produce detectable levels in plasma within 48 h after voluntary or forced administration.

Mean plasmatic concentrations after IV and IM administrations are represented in **Figure 2**. PK parameter estimates for 0.5 mg/kg IV and IM meloxicam administration in *S.stellaris* are summarized in **Table 1**. Meloxicam showed a rapid absorption after IM administration, and elimination was slower and progressive after both IV and IM administrations, with detectable levels in plasma 48 h after IV administration.

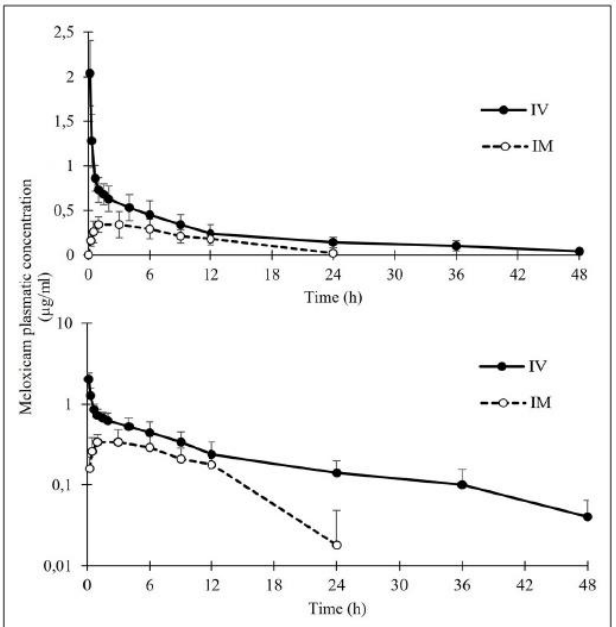


FIGURE 2 | Mean ± SD plasma concentrations of meloxicam in nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*; $n = 8$) after administration of a single IV (solid circles) or IM dose (open circles) (0.5 mg/kg). Note that data are represented using both linear and logarithmic scale.

IV, IM and PO meloxicam administrations were easily performed in nursehounds under the proposed experimental conditions. In the 6 months following the study, there were no shark fatalities or signs of toxicity. Swimming behavior and appetite were also normal in all subjects.

DISCUSSION

The results provided by this study are relevant for aquatic animal veterinarians and researchers because they present novel data on the PK properties of meloxicam in sharks, following the prevalent administration methods. This study suggests that a correction in the empirical dosages that are recommended and used today in sharks (0.2 mg/kg) may be necessary, due to the low plasma concentrations detected, even when dosages as high as 0.5 mg/kg are administered IM (17). This study uses a dosage of 0.5 mg/kg, rather than 0.2 mg/kg, because a pilot study with 0.5 mg/kg meloxicam IM using two adult nursehounds had already showed relatively low plasma concentrations. Oral meloxicam is still commonly prescribed in elasmobranchs (17). This study shows that neither PO method of administering 0.5 mg/kg meloxicam in nursehounds produces detectable concentrations in plasma. Additionally, this study establishes a safe and efficient experimental model for the development of PK studies using nursehound sharks.

Nursehounds appear to be a promising candidate species for the further development of PK studies in elasmobranchs, due to their popularity in aquariums and easy handling and

TABLE 1 | Pharmacokinetic parameters of meloxicam administered at a single dose of 0.5 mg/kg IV or IM in nursehounds (*S.stellaris*; $n = 8$) under human care.

		IV administration		IM administration	
Parameter	**Unit**	**Mean ($n = 8$)**	**SD**	**Mean ($n = 8$)**	**SD**
C_0	μg/ml	3.55	1.30	-	-
T_{max}	h	-	-	2.68	1.81
C_{max}	μg/ml	2.05	0.22	0.38	0.08
$t_{1/2\beta}$	h	10.71	2.77	11.27	3.96
AUC_t	h·μg/ml	10.64	1.95	4.74	1.04
AUC_{inf}	h·μg/ml	11.37	2.29	5.98	0.90
MRT	h	15.01	3.45	16.07	5.00
Vd	L/kg	0.67	0.08	0.79	0.31
Cl	ml/min·kg	0.81	0.22	0.81	0.11
F	%	-	-	56.22	13.29
MAT	h	-	-	1.05	0.99

T_{max}, time required to achieve maximum plasmatic concentration; C_0, extrapolated concentration at 0 h after IV administration; C_{max}, maximum plasmatic concentration; $t_{1/2\beta}$, elimination half-life; AUC_t, area under the plasma concentration curve computed using observed data points only; AUC_{inf}, area under the curve extrapolated to infinity; MRT, mean residence time; Vd, distribution volume in pseudo-equilibrium conditions; Cl, clearance; F, bioavailability; MAT, mean absorption time.

management under human care (1). These sharks are one of the largest members in size of the Scyliorhinidae family, while maintaining a relatively small size (max 162 cm total length and 8 kg weight) (21). While handling can be challenging and dangerous in larger elasmobranchs, smaller species may not allow for sufficient collection of blood volumes required to develop a PK study, seeing as the recommended total blood collected from fish should be <1% of its body weight in a 2-week period (24). The small cell fraction present in elasmobranch peripheral blood (mean PCV ranging from 15 to 30%) permits the obtainment of high plasma volumes, reducing the blood volume required to develop the PK analysis (25, 26). The total 5.6 ml, 3.6 ml, and 4.9 ml blood collected over 48 h in the studies performed with IV, IM, PO administration, respectively, represent 0.21, 0.13, and 0.18% of the mean body weight (2.69 kg ± 0.43 kg) of the nursehounds sampled in this study. These values were well below the maximum 1% body weight indicated in fish and shows that the frequent blood sampling required to develop a PK study can be performed in this species while leaving appropriate safety margins (24). Another advantage of nursehounds as subjects is that they are easily induced into TI (14, 27). While some elasmobranch species are less susceptible to TI and can fight and struggle when turned in a dorsal decubitus, muscle relaxation in nursehounds in this study was produced <30 s after dorsal recumbency and allowed for easy blood collection (14). This study collected blood from the indicated site for venipuncture in elasmobranchs, which is the caudal hemal arch. This caudal blood vessel in fish can be accessed via a ventral approach (the most common and intuitive since it is symmetrical) or a lateral approach (more challenging, since it is asymmetrical). As shown in **Figure 3**, lateral sampling can result in a smaller amount of traumatized muscular tissue and allow for the use of shorter needles in many elasmobranch species. The lateral approach of the caudal hemal arch can be useful in reducing tissue trauma during procedures that require frequent blood sampling, such as PK studies.

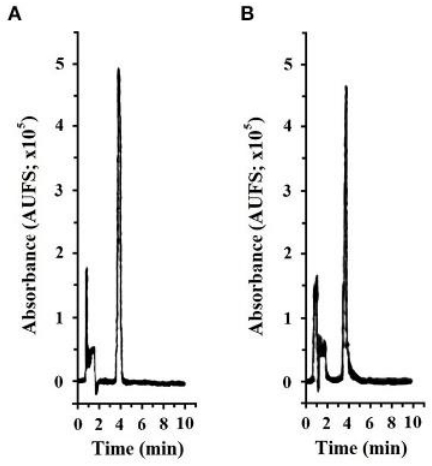


FIGURE 3 | Representative chromatogram (Teknokroma Analítica S.A., Barcelona 08173, Spain) of meloxicam (Sigma-Aldrich Química SA., Tres Cantos 28760, Madrid, Spain) at 1.2 μg/ml concentration in methanol; retention time was 3.91 min and AUC was 132,819 AUFS·min^{-1} **(A)** and in nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*) plasma after processing using the methodology described by Montesinos et al. (22); retention time was 3.85 min and AUC was 111,259 AUFS·min^{-1} **(B)**. Spectra-physics SP4600 Integrator, Lasing S.A., Madrid 28037, Spain.

Although meloxicam is used frequently in the treatment of inflammatory diseases in elasmobranchs today, there is still very limited information about its PK properties and efficacy in non-domestic animals, particularly in fish (12, 19). A former PK study performed with meloxicam in fish administered at a dosage of 1 mg/kg IM and IV in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) suggested that meloxicam was not an effective anti-inflammatory drug to be used in fish, due to its extremely short mean elimination half-life (1.8 h) when administered IM (20). A recent PK study

administered meloxicam at 1 mg/kg PO in tilapia, obtaining a similar half-life (1.91 h) (28). If we use the PK parameter half-life as an indicator to define possible inter-dosage periods, as it has been suggested in previous PK studies, inter-dosage periods as short as 2 h would not be recommended since frequent capture for IM injection in fish could be counterproductive (20). However, our results show that meloxicam 0.5 mg/kg has a much longer half-life in elasmobranchs (11.27 h) when administered IM, as compared to teleost (29). Furthermore, both mean t_{max} (2.68 vs. 0.50 h) and MRT (16.07 vs. 2.76 h) are longer in nursehounds than in Nile tilapia, supporting the slower absorption, distribution, and elimination of this drug in sharks. These data, together with no local intolerance noted for the drug administered IV or IM, would suggest that IM administration could be an efficient administration route in sharks, though further studies at higher dosages may require longer periods between administrations.

The important differences observed between bony and cartilaginous fish, mainly related to the elimination phase, may be explained by the significant anatomical, physiological, and metabolic differences between the studied species. Meloxicam elimination is mainly hepatic, through conjugation and metabolic reactions via p450 cytochrome; there is also minor renal elimination as a secondary elimination route (30). The size and composition of the liver depend on the species, and in elasmobranchs can represent up to 23% of their body weight and most of it (as high as 80%) can be lipid (31). Moreover, elasmobranchs lack cavitary adipose tissue, storing lipids in hepatocytes; the amount of liver cell exposure, as well as lipids, can influence drug pharmacodynamics (32). The elasmobranch kidney is very different from that of other vertebrates: it has a higher filtration rate as well as different filtration, secretion, and reabsorption selectivity (33). These differences could have influenced the elimination rates of the drug.

Drug leakage at the injection site may explain the decreased AUC_{inf} observed both in teleost and elasmobranchs after IM as compared to IV administration, with a similar F of 53% in nursehounds and 51% in Nile tilapia for IM administration (20). Although manual pressure was applied at the injection site after IM administration, drug leakage has already been described in teleost and elasmobranch fish, due to their different muscle composition, structure and elasticity as compared to mammals (34). This was a limitation to this study, as measuring the amount of drug expelled from the injection site and determining possible ways to reduce leakage should be addressed in future studies. Some possibilities to reduce drug leakage include sealing the injection site after injection, using higher concentration formulas, reducing injection volumes, or distributing the dose across various injection sites. Again, this study aimed to evaluate the current administration protocols for meloxicam in clinical management; additional PK studies would be needed to test the aforementioned hypotheses in elasmobranchs.

Analgesic efficacy of the NSAID ketoprofen at 1–4 mg/kg IM has been studied in the chain dogfish (*Scyliorhinus retifer*), without detecting a significant effect; the study suggested that the lack of appropriate drug doses, administration protocols, and other not yet identified physiological factors could be leading to the lack of apparent analgesic efficacy of this NSAID in sharks (35). In the absence of efficacy studies determining the minimum plasma concentrations of meloxicam necessary for producing analgesia in fish, the effective concentrations determined for other animal species were taken as a reference. Using the established analgesic and anti-inflammatory concentrations, mean meloxicam plasma concentrations ± SD at 12 h after IV and IM administrations (0.239 ± 0.09 μg/ml and 0.181 ± 0.04 μg/ml, respectively) stay above the minimum effective concentrations for ameliorating pain and inflammation in horses (0.130–0.195 μg/ml) (36). However, using effective concentrations in other species like humans (0.57–0.93 μg/ml) or dogs (0.82 μg/ml) as a reference, meloxicam administered IM at 0.5 mg/kg could not reach sufficient plasma concentrations to ameliorate inflammation and pain in sharks (37, 38). These interspecific differences should be interpreted with caution, as the plasma protein binding extent of meloxicam has not been yet determined in fish, and the extrapolation of clinically effective concentrations from other species can lead to an overdose or an insufficient drug administration (39). Future studies determining plasma protein binding of meloxicam in teleost and elasmobranchs are needed to determine the free meloxicam concentration in their plasma. Previous studies conducted with meloxicam administered IM at a dosage of 5 mg/kg in goldfish (*Carassius auratus auratus*) demonstrated that it does not cause acute toxicity in fish (40). This supports the development of future PK trials with higher single-dose and multiple-dose studies, as well as *in vitro* and *in vivo* studies to determine the effective meloxicam concentration for COX-2 inhibition in elasmobranchs. The results from this study indicate that meloxicam should not be used orally at 0.5 mg/kg in nursehounds due to its non-detectable levels in plasma. A recently published study evaluated PK of oral meloxicam in teleost fish for the first time, administering 1 mg/kg meloxicam PO to tilapia, and concluded that oral meloxicam in tilapia would likely not reach clinically effective concentrations because of the significantly low plasmatic concentrations achieved (C_{max} 0.07 μg/ml), with a MRT of 4.11 h and non-detectable concentrations in plasma 8 h after administration (28). Oral administration of meloxicam can, however, be of great use in cases of delicate, easily stressed, or potentially dangerous elasmobranch species since it does not require capture for manual or pole injection. Future trials with higher dosages, delayed release oral formulations, and/or administration with different foods should be conducted to identify possible alternative oral therapeutic regimes (41). Gastrointestinal motility and secretion are the two factors necessary for disintegration and dissolution of solid dosage forms, so differences in these two parameters in teleost and elasmobranchs could have also influenced dissolution and therefore absorption of the drug (42). PK results suggest that oral bioavailability of meloxicam in fish is very limited, and efforts should be taken to better understand why, as oral meloxicam is currently used in elasmobranchs at dosages below those evaluated in this study (17). Furthermore, a hepatic fist-pass effect could have also produced the non-detectable meloxicam levels in plasma after oral administration, rendering oral bioavailability null after meloxicam absorption (43). In all

studied species, once meloxicam is absorbed, it undergoes mainly hepatic metabolization, which transform meloxicam into several inactive metabolites (44–46). Plasma and tissue concentrations of meloxicam and its metabolite 5'Hydroxy-desmethyl-meloxicam in tilapia after 1 mg/kg oral administration were all very low, with non-detectable tissue concentrations of its metabolite (28). Another limitation to our study is that the concentration of meloxicam metabolites was not determined in nursehounds, and it is not possible to discard that a hepatic first-pass effect was responsible for the non-detectable levels of meloxicam in plasma after oral administration. Further studies determining plasma and tissue concentrations of meloxicam metabolites in elasmobranchs, including known meloxicam metabolites and possibly still undetermined metabolites in these species, are necessary to understand if this null bioavailability may be caused by a hepatic first-pass effect rather than insufficient drug absorption. However, it should be considered that although the determination of the concentration of meloxicam metabolites would be of great importance to better understand its kinetic properties, since none of its currently determined metabolites are pharmacologically active, the clinical applications of their determination would be limited (46).

Determination of therapeutic regimes following PK studies in elasmobranchs is challenging, since great interspecific variations have been observed in fish administered the same drugs, and elimination has proven temperature-dependent for some active principles (47). Therefore, future studies using higher dosages of meloxicam and multiple administrations are needed. Meloxicam PK properties should also be evaluated in other chondrichthyan species to determine if the elimination rate and half-life is maintained for meloxicam among elasmobranchs and how environmental parameters, such as water temperature and salinity, can influence the PK parameters.

CONCLUSIONS

Meloxicam administered to nursehounds (*Scyliorhinus stellaris*) at a dosage of 0.5 mg/kg presents a more prolonged PK profile when injected IM/IV than in teleost fish. Meloxicam PO did not produce detectable levels in plasma, though plasma concentrations were detectable when the drug was administered IM/IV for at least 12 h, likely resulting in clinically relevant levels. However, in the absence of studies determining the minimum plasma concentrations of meloxicam necessary for effective COX-2 inhibition in fish, the results obtained in this study for IM administration would suggest that 0.5 mg/kg produces stable but low meloxicam plasma levels, which are lower than those associated with anti-inflammatory effects in other animal species. These results suggest that currently recommended dosages in sharks and rays are most likely unable to produce clinically effective plasma concentrations in sharks. They also elucidate the need for further PK studies with higher dosages of meloxicam administered IM in elasmobranchs in order to establish efficient analgesic/anti-inflammatory treatment protocols.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia with the project reference ID OCE-22-19.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PM-E: study design, conducting experiments, data acquisition, photography, and preparation of the manuscript. CR-S: conducting experiments, data acquisition, and revision of the manuscript. TÁ-Á and MV-T: conducting experiments and revision of the manuscript. DG-P: study design and revision of the manuscript. TE: study design, data acquisition, and revision of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

Funding for this study was provided by the Complutense University of Madrid Predoctoral Contract (PME; CT63/19-CT64/19) and the Fundación Oceanogràfic (Under the Project Reference Number OCE-22-19).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Complutense University of Madrid for the PhD scholarship awarded to the main author, the Fundación Oceanogràfic for supporting this study, Oceanogràfic Aquarium for providing the researchers with the sharks and infrastructure necessary for developing this study, Christina Janulis for the English grammar revision of this article, and the team of aquarists and veterinarians at Oceanogràfic for their excellent work and assistance.

REFERENCES

1. Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R eds. *Elasmobranch Husbandry Manual: CAPTIVE Care of Sharks, Rays, and Their Relatives*. Columbus, OH: Ohio Biological Survey. (2004). p. 588.
2. Smale MJ, Jones RT, Correira JP, Henningsen AD, Crow GL, Garner R. Research on elasmobranchs in public aquariums. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. *Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and Their Relatives*. Columbus, OH: Ohio Biological Survey. (2004). p. 533–41.
3. Cain DK, Harms CA, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *J Zoo Wildl Med.* (2004) 35:471–6. doi: 10.1638/03-107
4. Garner MM, A. retrospective study of disease in elasmobranchs. *Vet Pathol.* (2013) 50:377–89. doi: 10.1177/0300985813482147

5. Stamper AM, Miller SM, Berzins IK. Pharmacology in Elasmobranchs. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. *Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and Their Relatives*. Columbus: Ohio Biological Survey. (2004). p. 447–66.
6. Smith MFL, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra JM, editors. *Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and Their Relatives*. Columbus, OH: Ohio Biological Survey. (2017). p. 482.
7. Chatigny F, Creighton CM, Stevens ED. Updated review of fish analgesia. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* (2018) 57:5–12.
8. Engelhardt G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. *Br J Rheumatol.* (1996) 35:4–12. doi: 10.1093/rheumatology/35.suppl_1.4
9. Praveen Rao PN, Knaus EE. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Pharm Sci.* (2008) 11:81–110. doi: 10.18433/J3T886
10. Wang T, Mai K, Ai Q. A review of cyclooxygenase-2 role in fish. *Austin J Nutr Metab*. (2016) 3:1037. Available online at: https://austinpublishinggroup.com/nutrition-metabolism/fulltext/ajnm-v3-id1037.php
11. Stamper MA. Immobilization of elasmobranchs. In: Smith MD, Warmolts D, Thoney D, Hueter R editors. *Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and Their Relatives*. Ohio: Ohio Biological Survey. (2004). p. 281–95.
12. Fayette MA, Rose JB, Hunter RP, Bowman MR, Proudfoot JS. Naïve-pooled pharmacokinetics of ceftiofur crystalline free acid after single intramuscular administration in smooth dogfish *(Mustelus canis)*. *J Zoo Wildl Med.* (2019) 50:466–9. doi: 10.1638/2018-0104
13. Zimmerman DM, Armstrong DL, Curro TG, Dankoff SM, Vires KW, Cook KK, et al. Pharmacokinetics of florfenicol after a single intramuscular dose in white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*). *J Zoo Wildl Med.* (2006) 37:165–73. doi: 10.1638/05-065.1
14. Henningsen AD. Tonic immobility in 12 elasmobranchs: use as an aid in captive husbandry. *Zoo Biol.* (1994) 13:325–32. doi: 10.1002/zoo.14301 30406
15. de Boeck G, Eyckmans M, Lardon I, Bobbaers R, Sinha AK, Blust R. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* (2010) 155:503–8. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.12.014
16. Muñoz-Baquero M, Marco-Jiménez F, García-Domínguez X, Ros-Santaella JL, Pintus E, Jiménez-Movilla M, et al. Comparative study of semen parameters and hormone profile in small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*): aquarium-housed vs. wild-captured. *Animals.* (2021) 11:2884. doi: 10.3390/ani11102884
17. Mylniczenko N. Appendix 1- elasmobranch formulary. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J editors. *Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and Their Relatives*. Columbus, OH. Ohio Biological Survey (2018).
18. Schattenkirchner M. Meloxicam: a selective COX-2 inhibitor non-steroidal anti-inflammatory drug. *Expert Opin Investig Drugs.* (1997) 6:321–34. doi: 10.1517/13543784.6.3.321
19. Carpenter JW, Marion CJ. *Exotic Animal Formulary*. 5th ed. Amsterdam: Elsevier Inc. (2017). p. 702.
20. Fredholm D, Mylniczenko ND, Kukanich B. Pharmacokinetic evaluation of meloxicam after intravenous and intramuscular administration in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Zoo Wildl Med.* (2016) 47:736–42. doi: 10.1638/2015-0253.1
21. Ebert DA, Dando M. *Field Guide to Sharks, Rays and Chimaeras of Europe and the Mediterranean*. Plymouth: Wild Nature Press (2021). p. 306–9.
22. Montesinos A, Encinas T, Ardiaca M, Gilabert JA, Bonvehí C, Orós J. Pharmacokinetics of meloxicam during multiple oral or intramuscular dose administration to African grey parrots (*Psittacus erithacus*). *Am J Vet Res.* (2019) 80:201–7. doi: 10.2460/ajvr.80.2.201
23. Rojo-Solis C, Ros-Rodrigues JM, Valls M, Alvaro T, Gilabert JA, Encinas T, et al. Pharmacokinetics of meloxicam (MetacamTM) after intravenous, intramuscular and oral administration to red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). In: *Proceedings AAZV AAWV Joint Conference*. Tulsa, OK (2009). p. 228.
24. Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. *Zebrafish.* (2013) 10:425–32. doi: 10.1089/zeb.2012.0862
25. Nau MR, O'Brien JK, Schmitt TL, Nollens HH, Robeck TR. Diagnostic assessment of reproductive status in white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*). *Anim Repr Sci.* (2018) 197:48–57. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.08.005
26. Cusack L, Field CL, Hoopes L, McDermott A, Clauss T. Comparison of pre- and postquarantine blood chemistry and hematoogy values from wild-caught cownose rays (*Rhinoptera bonasus*). *J Zoo Wildl Med.* (2016) 47:493–500. doi: 10.1638/2015-0267.1
27. Lawrence MJ, Raby GD, Teffer AK, Jeffries KM, Danylchuk AJ, Eliason EJ, et al. Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature. *J Fish Biol.* (2020) 97:4–15. doi: 10.1111/jfb.14339
28. Martin M, Smith S, Kleinhenz M, Magnin G, Lin Z, Kuhn D, et al. Coetzee J. Comparative pharmacokinetics and tissue concentrations of flunixin meglumine and meloxicam in tilapia *(Oreochromis spp)*. *Fishes.* (2021) 6:68. doi: 10.3390/fishes6040068
29. Visser M. Translating pharmacokinetic and pharmacodynamic data into practice. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* (2018) 21:169–82. doi: 10.1016/j.cvex.2018.01.001
30. Lees P, Landoni MF, Giraundel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Ther.* (2004) 27:479–90. doi: 10.1111/j.1365-2885.2004.00617.x
31. Bakes MJ, Nichols PD. Lipid, fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters. *Comp Biochem Physiol B Biochem Molec Biol.* (1995) 110:267–75. doi: 10.1016/0305-0491(94)00083-7
32. Holmgren S, Nilsson S. Digestive system in sharks, skates and rays. In: Hamlett WC, editor. *The Biology of Elasmobranch Fish*. Baltimore: Johns Hopkins University Press (1999). p. 144–73.
33. Lacy ER, Reale E. The elasmobranch kidney. I Gross anatomy and general distribution of the nephrons. *Anat Emrbiol.* (1985) 173:23–34. doi: 10.1007/BF00707301
34. Neiffer DL, Stamper MA. Fish sedation, anesthesia, analgesia, and euthanasia: considerations, methods, and types of drugs. *ILAR J.* (2009) 50:343–60. doi: 10.1093/ilar.50.4.343
35. Davis MR, Mylniczenko N, Storms T, Raymond F, Dunn JL. Evaluation of intramuscular ketoprofen and butorphanol as analgesics in chain dogfish (*Scyliorhinus retifer*). *Zoo Biol.* (2006) 25:491–500. doi: 10.1002/zoo.20105
36. Toutain PL, Cester CC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal joint. *Am J Vet Res.* (2004) 65:1533–41. doi: 10.2460/ajvr.2004.65.1533
37. Montoya L, Ambros L, Kreil V, Bonafine R, Albarellos G, Hallu R, et al. pharmacokinetic comparison of meloxicam and ketoprofen following oral administration to healthy dogs. *Vet Res Com.* (2004) 28:415–28. doi: 10.1023/B:VERC.0000034995.81994.49
38. Türck D, Roth W, Busch U. A review of the clinical pharmacokinetics of meloxicam. *Br J Rheumatol.* (1996) 35:13–6. doi: 10.1093/rheumatology/35.suppl_1.13
39. Hunter RP, Isaza R. Concepts and issues with interspecies scaling in zoological pharmacology. *J Zoo Wild Med.* (2008) 39:517–26. doi: 10.1638/2008-0041.1
40. Larouche CB, Limoges MJ, Lair S. Absence of acute toxicity of a single intramuscular injection of meloxicam in goldfish (*Carassius auratus auratus*): a randomized controlled trial. *J Zoo Wildl Med.* (2018) 49:617–22. doi: 10.1638/2018-0077.1
41. Moore RA, Derry S, Wiffen PJ, Straube S. Effects of food on pharmacokinetics of immediate release oral formulations of aspirin, dipyrone, paracetamol and NSAIDs - a systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* (2015) 80:381–8. doi: 10.1111/bcp.12628
42. Aghazadeh-Habashi A, Jamali F. Pharmacokinetics of meloxicam administered as regular and fast dissolving formulations to the rat: influence of gastrointestinal dysfunction on the relative bioavailability of two formulations. *Eur J Pharm Biopharm.* (2008) 70:889–94. doi: 10.1016/j.ejpb.2008.07.013

43. Gibaldi M, Boyes RN, Feldman S. Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. *J Pharm Sci.* (1971) 60:1338–40. doi: 10.1002/jps.2600600909
44. Chesné C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T. Metabolism of meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4. *Xenobiotica.* (1998) 28:1–13. doi: 10.1080/004982598239704
45. Turner P. v, Chen Cheng H, Taylor Michael W. Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after single and repeat oral dosing. *Comp Med.* (2006) 56:63–7.
46. Mosher RA, Coetzee JF, Cull CA, Gehring R, Kukanich B. Pharmacokinetics of oral meloxicam in ruminant and preruminant calves. *J Vet Pharmacol Ther.* (2012) 35:373–81. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01331.x
47. Samuelsen OB. Pharmacokinetics of quinolones in fish: a review. *Aquaculture.* (2006) 255:55–75. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.008

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Morón-Elorza, Rojo-Solís, Álvaro-Álvarez, Valls-Torres, García-Párraga and Encinas. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artículo 2. Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry.

- **Revista:** Journal of Zoo and Wildlife Medicine
- **Impacto:** Q2 II=0.34 SJR Vet Sci 2021; Q4 II=0.806 JCR Vet Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Carlos Rojo Solís, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Daniel García Párraga y Teresa Encinas.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio farmacocinético prospectivo con intervención.
  - **Animales empleados:** ocho tiburones alitanes (*Scyliorhinus stellaris*) adultos clínicamente sanos, mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia.
  - **Parámetros explorados:** este estudio determina los principales parámetros cinéticos del meloxicam, tras su administración IM a dosis de 1.5 mg/kg en seis ejemplares de tiburón alitán, administrando una solución fisiológica salina IM en dos tiburones que se utilizaron como control negativo, para así evaluar los posibles efectos adversos producidos por el meloxicam. Se extrajo sangre antes y durante tiempos predeterminados tras la administración, las concentraciones plasmáticas se midieron mediante cromatografía líquida de alta eficacia y se utilizó un modelo cinético no compartimental. Se realizó un examen físico y una analítica completa (que incluía hematología y bioquímica) antes y 24 h tras la administración del meloxicam.
- **Resultados:** El tiempo medio hasta la concentración plasmática máxima fue 2.58 h, la concentración plasmática máxima media fue 806 ng/ml; la semivida de eliminación media fue 15.97 h; el tiempo medio de residencia fue 23.40 h, el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo extrapolada al infinito fue 15.52 h·µg/ml. Este estudio sugiere que el meloxicam administrado IM en el tiburón alitán a dosis de 1.5 mg/kg posiblemente produzca niveles plasmáticos clínicamente relevantes durante 24 h, sin producir alteraciones significativas en los análisis de sangre asociados al fármaco. Pese a la ausencia de signos clínicos, se detectó un aumento significativo en la creatinina quinasa y el aspartato aminotransferasa en el grupo tratado con meloxicam y en el grupo control, asociado al muestreo y la manipulación necesarios para el estudio.

DOI: 10.1638/2021-0144

Journal of Zoo and Wildlife Medicine 53(2): 393–401, 2022
Copyright 2022 by American Association of Zoo Veterinarians

PHARMACOKINETICS OF MELOXICAM AFTER A SINGLE 1.5 MG/KG INTRAMUSCULAR ADMINISTRATION TO NURSEHOUND SHARKS (*SCYLIORHINUS STELLARIS*) AND ITS EFFECTS ON HEMATOLOGY AND PLASMA BIOCHEMISTRY

Pablo Morón-Elorza, DVM, Carlos Rojo-Solís, DVM, MSc, Teresa Álvaro-Álvarez, DVM, Mónica Valls-Torres, DVM, Daniel García-Párraga, DVM, PhD, DECZM (ZHM), DECAAH (N-P), and Teresa Encinas, DVM, PhD

Abstract: A single-dose meloxicam pharmacokinetic (PK) study was performed with eight clinically healthy nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care. Meloxicam was administered IM at a dosage of 1.5 mg/kg to six animals; two animals were administered elasmobranch physiological saline solution (EPSS) IM as a negative control group. Blood samples were obtained prior to and at 12 predetermined times during the first 36 h after administration. Effects on hematology and plasma biochemistry were compared prior to and 24 h after administration. No animal died or showed clinical signs during the study. A significant increase in creatinine kinase and aspartate aminotransferase was found in both EPSS and meloxicam groups and could be considered a direct consequence of sampling and handling required for the PK study. Observed mean time to maximum plasma concentration ± SEM was 2.58 ± 0.47 h and observed mean maximum plasma concentration ± SEM was 806 ± 66 ng/ml; mean terminal half-life ± SEM was 15.97 ± 1.20 h; mean residency time ± SEM was 23.40 ± 2.25 h. Area under the plasma concentration–versus-time curve extrapolated to infinity ± SEM was 15.52 ± 1.70 h·µg/ml. This study suggests that meloxicam 1.5 mg/kg IM in nursehound sharks is likely to result in clinically relevant plasma levels for periods of 24 h without producing significant alterations in blood analytics, although further PK studies with meloxicam IV in sharks are needed. Future PK and pharmacodynamic studies with different drugs and doses are needed in elasmobranchs to establish safe and effective treatment protocols.

INTRODUCTION

In the last 25 yr, clinical awareness of the importance of treating pain and inflammation in animals has increased.[2] Former studies have proven that fish have the appropriate neuroanatomical structures and pathways to experience pain, and therefore it is currently accepted and agreed that in these animals it must be effectively treated.[27,35] Analgesics and anti-inflammatory drugs are essential in the routine clinical management of pain in mammals, yet their use in fish is still limited. Some recommendations on the use of analgesics in teleosts and elasmobranchs are currently described in the literature; however, detailed information on the therapeutic properties of analgesic and anti-inflammatory drugs in most fish species is still scarce.[7,27]

From the Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain (Morón-Elorza, Encinas); and Veterinary Services, Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic), 1B. 46013 Valencia, Spain (Morón-Elorza, Rojo-Solís, Álvaro-Álvarez, Valls-Torres, García-Párraga). Correspondence should be directed to Dr. Morón-Elorza (p-moron@hotmail.com).

Efficacy of the different analgesic and anti-inflammatory drugs mut be tested via pharmacokinetic (PK) studies (which determine drug absorption, distribution, and elimination) and pharmacodynamic (PD) studies (which determine the biochemical, physiologic, molecular, and possible secondary effects produced by the drug in the body).[33] Because of the scarce scientific documentation on pharmacotherapeutics in elasmobranchs, much of the veterinary clinical practice is carried out by extrapolating established therapeutic protocols from other species (generally teleost fish, birds, and exotic species) and empirically acquired clinical experience.[22,27] In contrast, PK studies, by evaluating the disposition of a drug in the body, generate important information on how to efficiently treat a patient.

Effective pain and inflammation management in elasmobranchs is of great importance, infectious and inflammatory diseases being the most frequently diagnosed pathologies in this group of animals.[12,25] Most of the studies on fish analgesia focus on clinical efficacy and evaluation of pain modulation, mainly in studies with opioids, with very few using nonsteroid anti-inflammatory drugs.[8,22,27] Two studies[9,34] clinically evaluate the effect of ketoprofen on chain dogfish (*Scyliorhinus retifer*) and goldfish (*Carassius auratus auratus*),

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Journal-of-Zoo-and-Wildlife-Medicine on 04 Oct 2022
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use Access provided by European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians

Artículo 3. Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*).

- **Revista:** Veterinary Sciences
- **Impacto:** Q1 II=0.52 SJR Vet Sci 2021; Q2 II=2.518 JCR Vet Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Daniela Cañizares Cooz, Carlos Rojo Solís, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Daniel García Párraga y Teresa Encinas.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio farmacocinético prospectivo con intervención.
  - **Animales empleados:** siete rayas mosaico (*Raja undulata*) adultas clínicamente sanas mantenidas en el Oceanogràfic de Valencia.
  - **Parámetros explorados:** en este estudio se determinan los principales parámetros cinéticos del meloxicam, tras su administración IM a dosis de 1.5 mg/kg en raya mosaico. Se extrajo sangre antes y durante tiempos predeterminados tras la administración, las concentraciones plasmáticas se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia y los datos farmacocinéticos se obtuvieron mediante un análisis no compartimental.
- **Resultados:** La máxima concentración plasmática media fue 1.84 µg/ml se alcanzó en un tiempo medio de 1.5 h, el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo extrapolado al infinito fue 11.43 h·µg/ml, la semivida de eliminación fue 3.55 h y el tiempo medio de residencia fue 5.37 h. La concentración plasmática relativamente alta, la rápida absorción y ausencia de reacciones adversas sugieren que el meloxicam podría convertirse en un fármaco analgésico y antiinflamatorio eficaz para ser utilizado en procedimientos de corta duración que cursen con dolor e inflamación en rayas, aunque la rápida eliminación del meloxicam podría limitar los protocolos de dosis múltiple en esta especie.

veterinary sciences

MDPI

Article

Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*)

Pablo Morón-Elorza [1,2,*], Daniela Cañizares-Cooz [1], Carlos Rojo-Solis [3], Teresa Álvaro-Álvarez [3], Mónica Valls-Torres [3], Daniel García-Párraga [2,3] and Teresa Encinas [1]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; dcaniz01@ucm.es (D.C.-C.); tencinas@vet.ucm.es (T.E.)
[2] Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, C/Eduardo Primo Yúfera (Científic) 1B, 46013 Valencia, Spain; dgarcia@oceanografic.org
[3] Veterinary Services, Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, C/Eduardo Primo Yúfera (Científic) 1B, 46013 Valencia, Spain; crojo@oceanografic.org (C.R.-S.); talvaro@oceanografic.org (T.Á.-Á.); mvalls@oceanografic.org (M.V.-T.)
* Correspondence: p-moron@hotmail.com

Abstract: The therapy database currently used in elasmobranchs is still mostly based on empirical data, and there are few efficacy and safety studies supporting clinical practice. In this study, meloxicam pharmacokinetics (PK) were evaluated after a single 1.5 mg/kg IM administration to a group of seven clinically healthy adult undulate skates (*Raja undulata* Lacepède, 1802). Blood samples were collected before administration and at 15, 30, 60 and 90 min and 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h after the IM injection. The meloxicam concentrations in plasma were determined using high-performance liquid chromatography, and PK parameters were calculated using a non-compartmental model approach. The mean ± SEM values of the main PK values were 1.84 ± 0.31 µg/mL for peak plasma concentration, 1.5 ± 0.24 h for time to maximum plasma concentration, 11.43 ± 2.04 h·µg/mL for area under the plasma concentration vs. time curve, 3.55 ± 0.65 h for elimination half-life, and 5.37 ± 0.94 h for mean residency time. No adverse reactions were detected. The relatively high plasma concentration and short time to maximum plasma concentration suggest that meloxicam could turn into an efficient analgesic and anti-inflammatory candidate drug to be used in skates. Further efficacy, pharmacodynamic, and multiple-dose studies with meloxicam are needed in elasmobranchs.

Keywords: elasmobranch; chondrichthyan; pain; analgesia; NSAID; HLPC; drug kinetics; fish cyclooxygenase; inflammation

check for updates

Citation: Morón-Elorza, P.; Cañizares-Cooz, D.; Rojo-Solis, C.; Álvaro-Álvarez, T.; Valls-Torres, M.; García-Párraga, D.; Encinas, T. Pharmacokinetics of the Anti-Inflammatory Drug Meloxicam after Single 1.5 mg/kg Intramuscular Administration to Undulate Skates (*Raja undulata*). *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 216. https://doi.org/10.3390/vetsci9050216

Academic Editor: Patrick Butaye

Received: 6 April 2022
Accepted: 27 April 2022
Published: 28 April 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Meloxicam is a cyclooxygenase (COX)-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) that is currently indicated and successfully used in the therapeutical management of a wide range of companion and exotic animal species, due to its great selectivity for COX-2, good absorption through oral (PO) and intramuscular (IM) routes, and wide safety margins [1,2]. However, pharmacokinetics (PK) of meloxicam have shown great variations among the species studied to date (mainly mammals, avian and reptile species), with significant differences in the dosages required to achieve clinically effective plasma concentrations and important variations in half-life and clearance [1,3]. In all the studied species, once meloxicam is absorbed, it is metabolized mainly in the liver via cytochrome p450 (CYP) enzymes, transformed into four inactive metabolites and eliminated in feces and urine [4,5]. Previous studies provide evidence that pharmaceutical and xenobiotic-metabolization via CYP enzymes, including NSAIDs, should be carefully studied before extrapolation across taxa, as fish CYPs have proven to respond differently compared to mammals [6].

These differences are important, as they can influence the speed at which some drugs are metabolized and eliminated, affecting clearance rates and leading to variations in the kinetic properties or toxic effects of those drugs that undergo liver metabolization [7,8]. PK studies aim to examine how the concentration of a drug evolves over time, determining the amounts of that drug and its metabolites in the tissues of different species, their fluids, and excrements [9]. In addition, PK studies also help the clinician to adjust the drug dosages and inter-dosage periods and allows the prediction of the results obtained during a pharmacological treatment, since pharmacological response is determined by the ability of the drug to access the sites of action and drug concentration over time [10]. PK behavior can show great variations between species, even if these species are very close phylogenetically [3].

There is currently very little information regarding pain and inflammation management in fish. The drug concentrations reached at their sites of action are not known for most of the drugs used, with much of the veterinary clinical practice depending on the extrapolation of data from other species and in most cases, lacking the corresponding PK, pharmacodynamic (PD), efficacy and safety studies [11,12]. There are few published PK studies performed with meloxicam in fish. In teleosts, meloxicam has been only recently studied after intravenous (IV), IM and PO routes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and Nile tilapia (*Oreochromys niloticus* Linnaeus, 1758) [12–14]. In addition, although meloxicam is frequently prescribed in the clinical management of elasmobranchs maintained in aquariums and marine rehabilitation centers, it has been studied only in nursehounds (*Scyliorhinus stellaris* Linnaeus, 1758) and yellow stingrays (*Urobatis jamaicensis* Cuvier, 1816) [15–18]. Given the high prevalence of infectious and inflammatory diseases in elasmobranchs and the frequent prescription of meloxicam in this group of animals, this study sought to determine the kinetic properties of meloxicam when administered IM to undulate skates and to provide information that could help improve the therapeutic management of pain and inflammation in elasmobranchs and most specifically in skates [17,19,20].

2. Materials and Methods

2.1. Animals

The study population consisted of seven adult (three females, four males) undulate skates (*Raja undulata* Lacepède, 1802), with weights ranging from 3.20 kg to 4.5 kg (mean ± SD was 3.94 ± 0.41 kg) and a mean total length ± SD of 76.67 ± 5.64 cm. All animals were maintained in the exhibit tanks of the Oceanogràfic Aquarium of Valencia for a minimum period of four years. For the purpose of the study, the skates were transferred to a temporary 10,000-L cylindrical tank at the quarantine facilities of the aquarium, to allow better access and management of the animals during the study. The undulate skates were translocated to the experimental tanks 14 days prior to the onset of the PK study to allow them to acclimate to their new environment. The seven individuals were determined clinically healthy based on their medical history, a detailed physical examination, hematology, and plasma biochemistry results obtained prior to the PK study. Due to a previous study evaluating the possible effects of meloxicam on hematological and plasma chemical values during an equivalent PK trial administering meloxicam IM at 1.5 mg/kg to nursehounds, which did not reveal significant variations in blood analytical values associated with meloxicam administration, and in an effort to minimize animal handling as well as reducing the blood volume collected, this study did not perform hematological and plasma chemical follow ups in the skates [15]. However, all animals were visually monitored throughout and one month after the PK study for possible adverse reactions.

To recreate the experimental conditions used at Oceanogràfic to evaluate meloxicam PK in the other elasmobranch species, the tanks contained processed sea water collected from the Mediterranean at 17–18 °C, with a 34 g/L salt concentration and pH of 7.8–8.1. Ammonia, nitrite, and nitrate concentrations were always under 0.01, 0.05 and 50 ppm, respectively. The light cycle was a 12 h light: 12 h dark artificially controlled period, and

the air temperature ranged from 15 to 24 °C. The undulate skates were fed once daily, six days per week, with thawed pieces of cephalopods and teleosts provided *ad libitum* [15].

The procedures involving animals were in compliance with the Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals, the EU Directive 2010/63/EU and Spanish RD 53/2013 for animal experiments and were approved by the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat Valenciana, under the project reference ID OCE-22-19.

2.2. Experimental Design

This study was designed as a prospective experimental trial. All the animals were closely monitored throughout the course of the study to detect possible alterations or adverse effects that could have been produced by the drug or the sampling procedure. All the individuals were uniquely identified during the study using colored plastic beads, which were placed on the edge of the disc using a surgical suture.

All the skates were weighted using a crane scale and received the same (1.5 mg/kg) intramuscular dosage at 8:00 a.m., using meloxicam (5 mg/mL Metacam® solution for injection, Boehringer Ingelheim, Barcelona, Spain). The mean volume ± SD of meloxicam administered was 1.18 ± 0.12 mL. For drug administration, the animals were captured using a rubber net, and meloxicam was administered in the caudal third of the disc musculature dorsally, using a 23-gauge needle attached to a 2 mL syringe. The blood samples consisted of 0.4 mL of whole blood and were collected from each animal before drug administration and at the following times after the meloxicam injection: 15, 30, 60 and 90 min and 2, 4, 8, 12, 24 and 48 h. The total blood volume collected during the study was 4.4 mL for each individual, which represented 0.11% of the mean body weight, and was under the maximal 1% body weight total blood volume collection recommended in fish [21]. For blood collection, the animals were captured using a rubber net and placed in dorsoventral recumbency for the induction of tonic immobility; manually restrained with their body submerged in water and the tail was brought to the surface while blood was collected. Venipuncture was performed from the caudal blood vessels at the proximal ventral tail, using a 23-gauge needle attached to a 2 mL syringe [22].

As in the previous PK studies performed with elasmobranchs at Oceanogràfic, once blood was collected, it was directly placed into 1 mL lithium-heparin tubes, which were refrigerated at 4 °C and sent to the laboratory located at the veterinary clinic of the aquarium for further processing, within 30 min from collection. The blood tubes were then placed in an Ortoalresa® Digicen21 CE110 centrifuge with a swing bucket rotor (Ortoalresa® RT106 Na 170007/01, 132 mm rotor radius, 35-degree angle fixed) and centrifuged at room temperature (24 °C) for 5 min and 590× *g*. After centrifugation, whole plasma was collected using a micropipette, introduced into a 1.5 Eppendorf tube, and frozen at −20 °C until meloxicam quantification.

2.3. Meloxicam Quantification

The plasma samples were analyzed for meloxicam quantification within 30 days after collection. The meloxicam plasma concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection, by using a previously described HPLC method successfully used in elasmobranchs [16]. Briefly, 250 µL of the thawed plasma sample was mixed with 100 µL of hydrochloride acid solution (5M), vortexed for 2 min, before adding 3 mL of diethyl ether and being vortexed again for 10 min. The solution was centrifuged at 3150× *g* (4500 rpm) and 4 °C for10 min using a refrigerated centrifuge (Hettich Universal 32R, Hettich Iberia, Torrejón de Ardoz 28850, Madrid, Spain), equipped with a swing bucket rotor of 140 mm rotor radius. The organic layer was collected and evaporated to dryness under a vacuum at 45 °C. The residue was resuspended in 250 µL of methanol, and 20 µL were injected in the HPLC.

Sample processing and chromatographic assays were performed at the Department of Pharmacology, Faculty of Medicine at the University of Valencia (Av. de Blasco Ibáñez,

15, 46010 València, Valencia, Spain), with a Shimadzu HPLC system (PC-FIHGUV-09, Shimadzu Europe GmbH, Albert-Hahn-Str. 6–10, D-47269 Duisburg, Germany), with a SCL-10Avp controller, SIL-10ADvp autoinjector, FDV-10ALvp quaternary pump and SP10ADvp UV detector set at 355 nm and Shimadzu LCMS Solutions software for data processing and peak integration. A C18 column (Mediterranean Sea C-18 column, Teknokroma, Barcelona, Spain), was equipped to the system. The validation of the HPLC methods was performed prior to assay, and calibration curves were generated using methanol spiked with meloxicam (Sigma-Aldrich Química SA, Tres Cantos, Madrid, Spain), displaying linear absorbance at the studied concentrations ($R^2 > 0.99$). The limit of detection was 0.02 µg/mL, the limit of quantification was 0.09 µg/mL, and inter- and intra-assay variability were under 6%. The mean ± SD recovery for meloxicam in undulate skate plasma was 90.31 ± 7.40%.

2.4. Data Analysis

The maximal concentration in plasma (C_{max}) and time to maximal concentration in plasma (T_{max}) were directly determined from the plasma concentration vs. time data. The PK parameters, including elimination half-life ($t_{1/2\beta}$), area under the plasma concentration–time curve to the last sampling time (AUC_t), area under the plasma concentration–time curve extrapolated to infinite (AUC_{inf}) and mean residency time (MRT), were determined following a noncompartmental analysis, using a commercially available software (PK Solutions, version 2.0, Summit Research Services, Montrose, Colorado, USA). The elimination rate constant (K_e) was estimated via semilog-linear regression of the terminal slope (λ_z), based on data points automatically estimated using the regression with the largest adjusted R^2. Elimination half-life ($t_{\frac{1}{2}\beta}$) was estimated by $\ln 2/K_e$. In this study, the AUC_t and area under the moment curve to the last sampling time ($AUMC_t$) were determined via log-trapezoidal integration, and the AUC_{inf} was estimated based on the last observed or predicted concentration, divided by λ_z; MRT was calculated by dividing the AUC_t by the $AUMC_t$.

3. Results

No adverse reactions or pathological signs were detected in any of the animals during the study, or in the following two months of its completion.

The individual meloxicam plasma concentrations after a single intramuscular administration of meloxicam at 1.5 mg/kg in *R. undulata* are represented in Figure 1. The plasma concentration vs. time curves were very similar for all the individuals administered with the drug, and the inter-individual variations were minimal. The meloxicam mean plasma concentrations (n = 7) are represented in Figure 2. Meloxicam was rapidly absorbed from the muscle in the seven individuals, with a mean T_{max} ± SEM of 1.50 ± 0.24 h and achieved high concentrations in plasma, with a mean C_{max} ± SEM of 1.84 ± 0.31 µg/mL. The mean AUC_t ± SEM was 11.43 ± 2.04 h·µg/mL and the AUC_{inf} ± SEM was 11.63 ± 2.08 h·µg/mL. Elimination was fast, although slightly more progressive than absorption, with a mean $t_{1/2\beta}$ ± SEM of 3.55 ± 0.65 h and mean MRT ± SEM of 5.37 ± 0.94 h. The PK parameters of meloxicam after 1.5 mg/kg IM administration are represented in Table 1.

Table 1. Pharmacokinetic parameters of meloxicam in seven undulate skates (*Raja undulata*) (n = 7) after a single intramuscular administration (1.5 mg/kg).

Parameter (Unit)	MEAN	SEM
T_{max} (h)	1.50	0.24
C_{max} (µg/mL)	1.84	0.31
$t_{1/2\beta}$ (h)	3.55	0.65
AUC_t (h·µg/mL)	11.43	2.04
AUC_{inf} (h·µg/mL)	11.63	2.08
$AUC_{t/inf}$ (h·µg/mL)	0.98	0.16
MRT (h)	5.37	0.94

T_{max} = time to maximum concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; $t_{\frac{1}{2}\beta}$ = terminal half-life; AUC_t = area under the curve until last sampling; AUC_{inf} = area under the curve extrapolated to infinity; MRT = mean residency time.

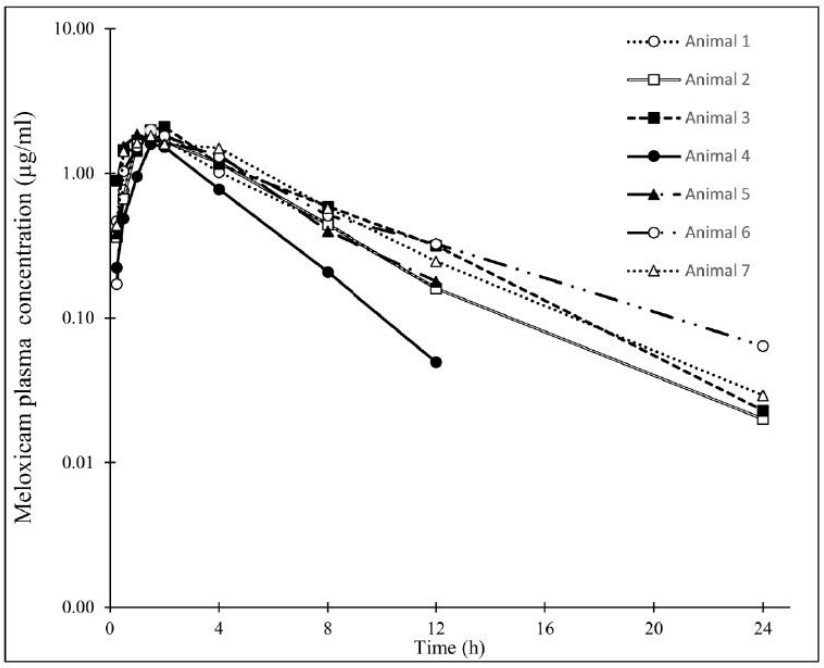


Figure 1. Individual plasma concentrations of meloxicam in undulate skates (*Raja undulata*) (n = 7) after a single IM administration (1.5 mg/kg). Please note the very similar kinetic curves among the different individuals. Meloxicam plasma concentration at 24 h in animals 1, 4 and 5 was under the limit of detection (0.02 µg/mL); concentration at 48 h was under the limit of detection in all individuals.

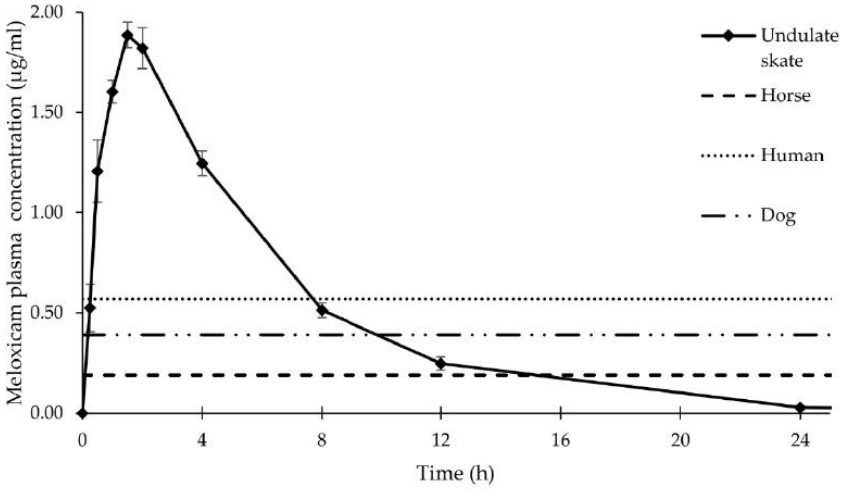


Figure 2. Mean plasma concentrations ± SEM of meloxicam 1.5mg/kg IM in undulate skates (*Raja undulata*) (n = 7). Reference meloxicam concentrations required for anti-inflammatory effect in different animal species are also represented [23–25]. Please note that mean meloxicam concentrations are maintained over inhibitory concentrations (IC) determined for other animal species for 8–12 h after IM administration. Meloxicam plasma concentration at 48 h was under the limit of detection in all individuals.

4. Discussion

To the authors' knowledge, despite the frequently diagnosed inflammatory diseases that affect elasmobranchs and the frequent prescription of meloxicam in this group of animals, meloxicam PKs had never been studied in skates. So far, studies have only been conducted in two elasmobranch species, the nursehound shark and the yellow stingray [17–19]. The drug was easily administered to the undulate skates, and no adverse reactions were observed after the administration of 1.5 mg/kg IM. Previous PK studies with meloxicam at 0.5 mg/kg and 1.5 mg/kg IM and PO in nursehounds and 1mg/kg IM and 2 mg/kg PO in yellow stingrays, did not produce any detectable adverse effects, and dosages as high as 5 mg/kg meloxicam IM have been safely administered to goldfish, without evidencing toxic effects [15,16,26].

The intramuscular administration of meloxicam at 1.5 mg/kg in undulate skates resulted in a fast and effective absorption, with a mean C_{max} of 1.84 µg/mL, which was similar to that reported for Nile tilapia (1.95 µg/mL) and yellow stingrays (1.29 µg/mL) after administering meloxicam at 1 mg/kg IM, although higher than the C_{max} registered in previous studies with nursehounds (0.81 µg/mL) after giving meloxicam at 1.5 mg/kg IM [14,15]. The C_{max} was also high when compared to previous studies performed with different mammalian, avian and reptile species [14]. The relatively higher C_{max} would suggest that clinically effective concentrations could be achieved in undulate skates using the described treatment protocol. The fast absorption with a short T_{max} (1.5 h) could be useful for short and moderately painful procedures that could lead to inflammation, such as biopsy collection or minor surgeries.

Meloxicam elimination was also fast in the undulate skates, with a relatively short $t_{1/2\beta}$ (3.55 h) when compared to other mammalian species, such as rabbits (6.1 h) or horses (8.5 h) [14,27]. The elimination half-life was, however, within range of that reported in teleost species, such as tilapia (1.59 h) and trout (4.55 h), reptile species, such as the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta* Linnaeus, 1758) (3.26 h), and avian species, such as the zebra finch (*Taeniopygia guttata* Vieillot, 1817) (3.24 h) [12,14,28,29]. Previous studies performed with meloxicam in avian species showed that interspecific and interindividual variations in Phase I system enzymes, such as cytochromes P450 (CYPs), can result in longer half-lives of metabolized NSAIDs [7]. CYPs are important proteins involved in pharmaceutical metabolism; they are frequently studied and well defined in mammals, although their function in most non-mammalian vertebrates is much less understood [6]. The differences in Phase I enzymes may be linked to the highly variable PK parameters among fish. A previous study evaluated the metabolizing system of deep-sea fish using several CYP isoforms and showed species-specific differences in baseline activities and sensitivity to different chemicals, including the NSAID diclofenac [8]. These variations could be leading to the greater clearance of meloxicam in some fish species and enhance the importance of developing further PK and PD studies in fish, as the required dosages and therapeutic protocols can result in great variations among species.

Interestingly, the $t_{1/2\beta}$ was shorter in undulate skates ($t_{1/2\beta}$ = 3.55 h) when compared to yellow stingrays ($t_{1/2\beta}$ = 5.75 h) after 1 mg/kg IM administration and nursehounds ($t_{1/2\beta}$ = 15.97 h) after meloxicam 1.5 mg/kg IM administration, showing important variations in elimination for meloxicam among elasmobranch species [15,18]. The three studied elasmobranch species belong to different orders (undulate skates belong to order *Rajiformes*, yellow stingrays to order *Myliobatiformes* and nursehounds to order *Carcharhiniformes*), and there are many factors that could have produced the previously mentioned differences in the PK parameters, as anatomical, physiological, and environmental peculiarities can greatly influence the behavior of the drugs administered to fish [30,31]. Previous studies showed that the enzymatic metabolism of the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) was lower than that of teleost fish [32]. These differences in metabolism and elimination could lead to the maintenance of high meloxicam concentrations in plasma for longer periods in some elasmobranch species compared to teleost, and therefore to much more efficient administration protocols for this drug in sharks. For this reason, it is es-

pecially important to determine the pharmacokinetic profiles in each group of animals, and to carefully assess the possibility of extrapolating therapeutic regimens from other species.

Most elasmobranchs and teleost fish are poikilothermic, with their body temperature (and therefore the enzyme activity and metabolism, drug clearance and duration of effect) dependent on the environmental water temperature [11,33]. Because of this, environmental conditions, such as water temperature, salinity and pH, could greatly influence drug kinetics and should be recorded during a PK study involving fish [30]. In our study, the undulate skates were kept at the same environmental conditions as the catsharks used in the preliminary meloxicam PK studies (18.0 °C, 34 g/L, ph 8, pO2 > 95%), while Nile tilapia were kept at 23.3–24.4 °C during the meloxicam PK trial [14]. The yellow stingrays were kept at higher water temperatures (24.0–28.0 °C) and showed a longer $t_{1/2\beta}$ than undulate skates, although shorter than nursehounds. Further PK studies using elasmobranchs maintained at different temperatures and salinities could provide important information on how these environmental factors influence meloxicam kinetics in fish.

Great variations have been reported in the standard metabolic rates (SMR) among the elasmobranch species [34]. Meloxicam elimination in undulate skates was faster when compared to nursehounds, which could initially suggest that undulate skates have a higher SMR that those of nursehounds [15]. However, previous studies performed with nursehounds and the little skate (*Raja erinacea* Mitchill, 1825) (which belongs to the same genus as the *Raja undulata* and has a similar distribution and benthic behavior), reported similar SMR for both species [34,35]. These results would imply that the nursehounds and undulate skates in our studies, being both benthic species, healthy adult animals, and maintained at the same environmental conditions, had similar SMRs, despite the great variations in the following elimination PK parameters: a mean $t_{1/2\beta}$ of 3.55 h and MRT of 5.37 h in undulate skates and mean $t_{1/2\beta}$ of 15.97 h and MRT of 23.40 h in nursehounds, after meloxicam 1.5 mg/kg IM administration in both cases [15]. These results would suggest that there are other important factors that affect meloxicam kinetics in elasmobranchs, such as protein binding capacity or differences in metabolization and excretion, which should be evaluated.

Within elasmobranchs, the size and composition of the liver depend on the species, which, together with the amount of liver cell exposure, can greatly influence the pharmacodynamics and kinetics of the drugs [20]. In addition, fish kidneys are very different from those of mammals; they have a higher filtration rate and different filtration, secretion, and reabsorption selectivity [36]. These differences can influence the elimination rates of the drugs such as meloxicam, which is partly eliminated in urine [37]. Previous studies also revealed the following kidney differences between freshwater and marine fish: marine species have generally smaller and fewer glomeruli, together with lower filtration rates to those of freshwater fish species [38,39]. The differences in kidney function between te freshwater and marine fish species could be influencing meloxicam elimination, and further PK studies with meloxicam in marine teleost species would help to understand the observed differences in $t_{1/2\beta}$ between the studied fish species. Although kidney-related side effects of meloxicam have been described in mammalian and avian species, they are considered milder and less frequent when compared to other NSAIDs, due to meloxicam's weak inhibitory activity on COX-1 [2,3]. Regarding teleost, a previous acute toxicity study provided evidence that a single intramuscular injection of meloxicam at a dosage of 5 mg/kg does not cause acute toxicity, nor significant histological kidney alterations, determining meloxicam safe for administration to goldfish at the studied dosage [26]. Despite the fact that no clinical signs were detected in the undulate skates and nursehounds after meloxicam administration, and due to the absence of published NSAID toxicity studies in elasmobranchs, further single and long-term meloxicam administration toxicity studies are needed in this group of animals [15,16]. The biochemical processes in elasmobranchs also present very notable differences compared to the rest of vertebrates, many of them related to their high urea retention index; the peculiar metabolic organization and the unique functionality of biological membranes can decisively interfere with the kinetic behavior of

multiple substances and lead to important differences between elasmobranchs and other vertebrate species [40]. Finally, the renal portal system could have also affected drug kinetic parameters in all the studied fish species. In an effort to replicate the most frequently indicated injection sites in fish therapeutics, meloxicam was administered in the epaxial musculature, latero-caudal to the dorsal fin in nursehounds, tilapia and trout, and in the disc musculature of the undulate skates [12,14–16]. These regions belong to the caudal half of the animals and could have been affected by the renal portal system, as the system allows blood from this region to drain directly to the kidneys; this could have increased pre-systemic renal excretion and modified drug distribution [36]. Additional PK studies are granted to evaluate the differences in meloxicam kinetics after administration in the cranial-third of the body in fish, to discard a possible renal portal system interaction with drug distribution and elimination.

The determination of the meloxicam clinical effective concentration in undulate skates was not the objective of the present study, and in the absence of studies determining the effective meloxicam plasma concentrations required for COX-2 inhibition in fish, further studies investigating the pharmacodynamics of meloxicam in rays and sharks are required. The mean meloxicam plasma concentration at 8 h after administration was 0.51± 0.04 μg/mL in undulate skates, which is over the 0.39 μg/mL meloxicam plasma concentration described in dogs for analgesic/anti-inflammatory effects [41]. In addition, the mean plasma concentration at 12 h post-administration was 0.25 ± 0.03 μg/mL, which is still over the mean inhibitory concentration of COX-2 described in other animal species, such as horses (0.13 to 0.19 μg/mL), potentially leading to clinically relevant concentrations for longer periods [23]. However, the current therapeutical management of fish tries to minimize handling as much as possible, in an effort to reduce stress and the risk of trauma related to animal capture for drug administration [14]. In this sense, inter-dosage periods requiring handlings as frequent as every 8 h, although achievable in small and resilient species, such as the undulate skate, could be too frequent for some easily stressed elasmobranch species, and could be counterproductive [11]. Prolonged release meloxicam injectable formulations have provided a longer $t_{1/2\beta}$ in mammalian vertebrates, compared to the conventional injection solution used in this study [42]. Although prolonged release meloxicam formulations are still not evaluated in elasmobranchs, given the important differences observed in PK parameters, the good absorption and fast elimination after IM administration, further studies with prolonged release formulations together with viability studies could result in longer inter-dosage periods, which could benefit the therapeutical management of some elasmobranchs and teleost fish species.

5. Conclusions

The results provided in this study suggest that meloxicam administered intramuscularly at a dosage of 1.5 mg/kg in undulate skates was rapidly absorbed, metabolized, and excreted. The studied administration could provide clinically relevant plasma concentrations for 8–12 h, although further clinical efficacy and PD studies are needed to better determine the potential of meloxicam as an analgesic and anti-inflammatory drug to be used in undulate skates.

This study also identifies the possible factors that could be related to the important differences observed in meloxicam PK parameters between the different teleost and elasmobranch species, revealing the limited information available in the field of fish pharmacology and therapeutics, while opening new prospects for further research lines, which could significantly improve pain management and inflammation therapeutics in these species.

Author Contributions: Study design, P.M.-E., D.G.-P. and T.E.; designing experiment, P.M.-E., D.C.-C., C.R.-S., T.Á.-Á. and M.V.-T.; data acquisition, P.M.-E., D.C.-C., C.R.-S., T.Á.-Á. and M.V.-T.; preparation of the manuscript, P.M.-E.; revision of the manuscript, C.R.-S., D.G.-P. and T.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Funding for this study was provided by the Complutense University of Madrid Predoctoral Contract (PME; CT63/19-CT64/19) and the Fundación Oceanogràfic (under the project reference number OCE-22-19).

Institutional Review Board Statement: All animal handling and sample collection procedures have been designed in agreement with the Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals, the EU Directive 2010/63/EU and Spanish RD 53/2013 for animal experiments and have been approved by the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat of Valencia, under the project reference ID OCE-22-19.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data obtained in this study are available upon request to the corresponding author.

Acknowledgments: This study was supported by the Fundación Oceanogràfic and the Complutense University of Madrid and could not have been developed without the great help of the aquarist and veterinary teams working at the Oceanogràfic of Valencia. A special thanks for their help and support to the team of aquarists running the quarantine area where the animals were allocated during the study and to James Batchik for the revision of this manuscript. The authors would also like to thank Julio Cortijo, Paula Montero, and the research team working at the Department of Pharmacology of the University of Valencia for their great help, support and advice during the liquid chromatography analysis of the samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Carpenter, J.W.; Marion, C.J. *Exotic Animal Formulary*, 5th ed.; Elsevier Inc.: St. Louis, MO, USA, 2017; p. 1104, ISBN 9780323498036.
2. Schattenkirchner, M. Meloxicam: A Selective COX-2 Inhibitor Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug. *Expert Opin. Investig. Drugs* **1997**, *6*, 321–334. [CrossRef] [PubMed]
3. Montesinos, A.; Encinas, T.; Ardiaca, M.; Gilabert, J.A.; Bonvehí, C.; Orós, J. Pharmacokinetics of Meloxicam during Multiple Oral or Intramuscular Dose Administration to African Grey Parrots (*Psittacus Erithacus*). *Am. J. Vet. Res.* **2019**, *80*, 201–207. [CrossRef] [PubMed]
4. Chesné, C.; Guyomard, C.; Guillouzo, A.; Schmid, J.; Ludwig, E.; Sauter, T. Metabolism of Meloxicam in Human Liver Involves Cytochromes P4502C9 and 3A4. *Xenobiotica* **1998**, *28*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
5. Turner, P.V.; Chen, C.H.; Taylor, M.W. Pharmacokinetics of Meloxicam in Rabbits after Single and Repeat Oral Dosing. *Comp. Med.* **2006**, *56*, 63–67. [CrossRef] [PubMed]
6. Smith, E.M. Cytochrome P450 Drug Metabolism and Protein Induction and Inhibition in Fish Liver Microsomes. Master's Thesis, McMaster University, Hamilton, ON, Canada, 2009; p. 134. Available online: http://hdl.handle.net/11375/9496 (accessed on 17 February 2020).
7. Hutchinson, T.H.; Madden, J.C.; Naidoo, V.; Walker, C.H. Comparative Metabolism as a Key Driver of Wildlife Species Sensitivity to Human and Veterinary Pharmaceuticals. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *369*, 20130583. [CrossRef] [PubMed]
8. Ribalta, C.; Solé, M. In Vitro Interaction of Emerging Contaminants with the Cytochrome P450 System of Mediterranean Deep-Sea Fish. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 12327–12335. [CrossRef] [PubMed]
9. Roberts, S. Drug Metabolism and Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2003**, *6*, 66–80. [CrossRef]
10. Lees, P.; Landoni, M.F.; Giraundel, J.; Toutain, P.L. Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Species of Veterinary Interest. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2004**, *27*, 479–490. [CrossRef]
11. Stamper, M.A.; Miller, S.M.; Berzins, I.K. Pharmacology in Elasmobranchs. In *Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and Their Relatives*; Smith, M., Warmolts, D., Thoney, D., Hueter, R., Eds.; Ohio Biological Survey: Columbus, OH, USA, 2004; pp. 447–466, ISBN 0867271523.
12. Corum, O.; Terzi, E.; Durna Corum, D.; Uney, K. Pharmacokinetics and Bioavailability of Meloxicam in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Broodstock Following Intravascular, Intramuscular, and Oral Administrations. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2021**, *45*, 213–219. [CrossRef]
13. Martin, M.; Smith, S.; Kleinhenz, M.; Magnin, G.; Lin, Z.; Kuhn, D.; Montgomery, S.; Coetzee, J. Comparative Pharmacokinetics and Tissue Concentrations of Flunixin Meglumine and Meloxicam in Tilapia (*Oreochromis* spp.). *Fishes* **2021**, *6*, 68. [CrossRef]
14. Fredholm, D.V.; Mylniczenko, N.D.; Kukanich, B. Pharmacokinetic Evaluation of Meloxicam after Intravenous and Intramuscular Administration in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Zoo Wildl. Med.* **2016**, *47*, 736–742. [CrossRef]
15. Morón-Elorza, P.; Rojo-Solís, C.; Álvaro-Álvarez, T.; Valls-Torres, M.; García-Párraga, D.; Encinas, T. Pharmacokinetics of Meloxicam after Single 1.5 Mg/Kg Intramuscular Administration to Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and Its Effects on Hematology and Plasma Biochemistry. *J. Zoo Wildl. Med.* **2022**, *53*. In press; accepted for publication 5 February 2022. [CrossRef]

16. Morón-Elorza, P.; Rojo-Solís, C.; Álvaro-Álvarez, T.; Valls-Torres, M.; García-Párraga, D.; Encinas, T. Pharmacokinetic Studies in Elasmobranchs: Meloxicam Administered at 0.5 Mg/Kg Using Intravenous, Intramuscular and Oral Routes to Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*). *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 845555. [CrossRef]
17. Mylniczenko, N. Appendix 1- Elasmobranch Formulary. In *Elasmobranch Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and Their Relatives*; Smith, M., Warmolts, D., Thoney, D., Hueter, R., Murray, M., Ezcurra, J., Eds.; Ohio Biological Survey: Columbus, OH, USA, 2018.
18. Kane, L.P.; O'Connor, M.R.; Papich, M.G. Pharmacokinetic of a Single Dose of Intramuscular and Oral Meloxicam in Yellow Stingrays (*Urobatis jamaicensis*). *J. Zoo Wildl. Med.* **2022**, *53*, 153–158. [CrossRef]
19. Garner, M.M. A Retrospective Study of Disease in Elasmobranchs. *Vet. Pathol.* **2013**, *50*, 377–389. [CrossRef]
20. Stamper, A.M. Elasmobranchs (Sharks, Rays, and Skates). In *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*, 2nd ed.; West, G., Heard, D., Caulkett, N., Eds.; Wiley Blackwell: Victoria, TX, USA, 2014; pp. 197–201.
21. Zang, L.; Shimada, Y.; Nishimura, Y.; Tanaka, T.; Nishimura, N. A Novel, Reliable Method for Repeated Blood Collection from Aquarium Fish. *Zebrafish* **2013**, *10*, 425–432. [CrossRef]
22. Lawrence, M.J.; Raby, G.D.; Teffer, A.K.; Jeffries, K.M.; Danylchuk, A.J.; Eliason, E.J.; Hasler, C.T.; Clark, T.D.; Cooke, S.J. Best Practices for Non-Lethal Blood Sampling of Fish via the Caudal Vasculature. *J. Fish Biol.* **2020**, *97*, 4–15. [CrossRef]
23. Beretta, C.; Garavaglia, G.; Cavalli, M. COX-1 and COX-2 Inhibition in Horse Blood by Phenylbutazone, Flunixin, Carprofen and Meloxicam: An in Vitro Analysis. *Pharmacol. Res.* **2005**, *52*, 302–306. [CrossRef]
24. Montoya, L.; Ambros, L.; Kreil, V.; Bonafine, R.; Albarellos, G.; Hallu, R.; Soraci, A. A Pharmacokinetic Comparison of Meloxicam and Ketoprofen Following Oral Administration to Healthy Dogs. *Vet. Res. Commun.* **2004**, *28*, 415–428. [CrossRef]
25. Bae, J.W.; Kim, M.J.; Jang, C.G.; Lee, S.Y. Determination of Meloxicam in Human Plasma Using a HPLC Method with UV Detection and Its Application to a Pharmacokinetic Study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *859*, 69–73. [CrossRef]
26. Larouche, C.B.; Limoges, M.J.; Lair, S. Absence of Acute Toxicity of a Single Intramuscular Injection of Meloxicam in Goldfish (*Carassius auratus auratus*): A Randomized Controlled Trial. *J. Zoo Wildl. Med.* **2018**, *49*, 617–622. [CrossRef] [PubMed]
27. Toutain, P.L.; Cester, C.C. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships and Dose Response to Meloxicam in Horses with Induced Arthritis in the Right Carpal Joint. *Am. J. Vet. Res.* **2004**, *65*, 1533–1541. [CrossRef] [PubMed]
28. Miller, K.A.; Hill, N.J.; Carrasco, S.E.; Patterson, M.M. Pharmacokinetics and Safety of Intramuscular Meloxicam in Zebra Finches (*Taeniopygia guttata*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **2019**, *58*, 589. [CrossRef] [PubMed]
29. Lai, O.R.; Di Bello, A.; Soloperto, S.; Freggi, D.; Marzano, G.; Cavaliere, L.; Crescenzo, G. Pharmacokinetic Behavior of Meloxicam in Loggerhead Sea Turtles (*Caretta caretta*) after Intramuscular and Intravenous Administration. *J. Wildl. Med.* **2015**, *51*, 509–512. [CrossRef]
30. Samuelsen, O.B. Pharmacokinetics of Quinolones in Fish: A Review. *Aquaculture* **2006**, *255*, 55–75. [CrossRef]
31. Nelson, J.S.; Grande, T.C.; Wilson, M.V.H. *Fishes of the World*, 5th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2016; p. 787, ISBN 9781119174844.
32. Gorbi, S.; Pellegrini, D.; Tedesco, S.; Regoli, F. Antioxidant Efficiency and Detoxification Enzymes in Spotted Dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Mar. Environ. Res.* **2004**, *58*, 293–297. [CrossRef]
33. Stamper, M.A. Immobilizatuon of Elasmobranchs. In *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and Their Relatives*; Smith, M.D., Warmolts, D., Thoney, D., Hueter, R., Eds.; Ohio Biological Survey: Columbus, OH, USA, 2004; pp. 281–295.
34. Bernal, D.; Carlson, J.; Goldman, K.J.; Lowe, C.G. Energetics, Metabolism and Endothermy in Sharks and Rays. In *Biology of Sharks and Their Relatives*; Carrier, J.C., Musick, J.A., Heithaus, M.R., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2012; pp. 212–237.
35. Kulka, D.W.; Anderson, B.; Herman, K.; Derrick, D.; Pacoureau, N.; Dulvy, N.K. Leucoraja erinacea. The IUCN Red List of Threatened Species. Available online: https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-3.RLTS.T161418A124481430.en (accessed on 15 December 2021).
36. Lacy, E.R.; Reale, E. The Elasmobranch Kidney. I. Gross Anatomy and General Distribution of the Nephrons. *Anat. Embryol.* **1985**, *173*, 23–34. [CrossRef]
37. Churchill, P.C.; Malvin, R.L.; Churchill, M.C. Lack of Renal Effects of DOCA, ACTH, Spironolactone, and Angiotensin II in Squalus Acanthias. *J. Exp. Zool.* **1985**, *234*, 17–22. [CrossRef]
38. Greenwell, M.G.; Sherrill, J.; Clayton, L.A. Osmoregulation in Fish: Mechanisms and Clinical Implications. *Vete. Clin. Exot. Anim. Pract.* **2003**, *6*, 169–189. [CrossRef]
39. Wood, C.; Kajimura, M.; Bucking, C.; Walsh, P. Osmoregulation, Ionoregulation and Acid-Base Regulation by the Gastrointestinal Tract after Feeding in the Elasmobranch (*Squalus acanthias*). *J. Exp. Biol.* **2007**, *210*, 1335–1349. [CrossRef]
40. Ballantyne, J.S. Some of the Most Interesting Things We Know, and Don't Know, about the Biochemistry and Physiology of Elasmobranch Fishes (Sharks, Skates and Rays). *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **2016**, *199*, 21–28. [CrossRef]
41. Jeunesse, E.C.; Bargues, I.A.; Toutain, C.E.; Lacroix, M.Z.; Letellier, I.M.; Giraudel, J.M.; Toutain, P.L. Paw Inflammation Model in Dogs for Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Investigations of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, *338*, 548–558. [CrossRef]
42. Guo, F.; Li, Y.; Yang, D.; Jiang, X.; Ren, J.; Miao, Y.; Ding, F.; Yu, Z. Comparative Pharmacokinetics of Meloxicam Oil Suspension in Pigs at Different Dosages Following Intramuscular Administration. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *139*, 172–176. [CrossRef]

Artículo 4. Pharmacokinetics of meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*).

- **Revista:** Journal of Veterinary Anaesthesia and Analgesia (Enviado en marzo de 2022, actualmente en revisión).
- **Impacto:** Q1 II=0.58 SJR 2021 Vet Sci; Q2 II=1.763 JCR Vet Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Carlos Rojo Solís, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Daniel García Párraga y Teresa Encinas.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio farmacocinético prospectivo con intervención.
  - **Animales empleados:** ocho tiburones alitanes (*Scyliorhinus stellaris*) adultos clínicamente sanos, mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia.
  - **Parámetros explorados:** en este estudio se evalúa la farmacocinética del meloxicam tras la administración de 1.5 mg/kg por las vías intramuscular y oral a dosis múltiple. La administración intramuscular se realizó cada 24 h durante siete días (siete dosis), y se tomaron muestras de sangre a las 2.5 h (tiempo previamente determinado para la concentración máxima) y 24 h tras la administración (tiempo de concentración mínima). Después de un periodo de lavado de cuatro semanas, se administró meloxicam por vía oral a la misma dosis cada 12 h durante tres dosis repetidas. Se extrajo sangre a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h después de la primera administración, y el plasma fue analizado mediante cromatografía líquida de alta eficacia para la detección del fármaco, realizándose un análisis cinético no compartimental.
- **Resultados:** La administración de meloxicam a 1.5 mg/kg por vía oral no produjo concentraciones detectables en plasma. Tras la administración de la misma dosis IM, el estado estacionario se alcanzó tras la quinta dosis, y las concentraciones plasmáticas mínimas y máximas medias en el estado estacionario fueron 1.76 y 3.02 μg/ml, respectivamente. La relación de acumulación de concentración máxima media fue de 2.50. Este trabajo supone el primer estudio farmacocinético de meloxicam a dosis múltiple realizado en peces, y muestra resultados prometedores para la dosificación IM de este fármaco cada 24 h a dosis 1.5 mg/kg en el tiburón alitán.

Pharmacokinetics of meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to Nursehound shark (Scyliorhinus stellaris):

Pablo Morón-Elorza[ab], Carlos Rojo-Solís[c], Teresa Álvaro-Álvarez[c], Mónica Valls-Torres[c], Daniel García-Párraga[bc], Teresa Encinas[a].

[a]Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain.

[b]Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic) 1B, 46013 Valencia, Spain.

[c]Veterinary Services, Oceanogràfic. Ciudad de las Artes y las Ciencias. C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic), 1B. 46013 Valencia, Spain

Correspondence: Pablo Morón-Elorza, Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid, Spain. E.mail: p-moron@hotmail.com

Author Contributions: PME: study design, conducting experiments, data acquisition, photography, preparation of the manuscript, CRS: conducting experiments, data acquisition, revision of the manuscript, TAA: conducting experiments, revision of the manuscript. MVT: conducting experiments, revision of the manuscript; DGP: study design, revision of the manuscript; TE: study design, data acquisition, revision of the manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding: Funding for this study was provided by the Complutense University of Madrid Predoctoral Contract (CT63/19-CT64/19) and the Fundación Oceanogràfic (Under the project reference number OCE-22-19).

Acknowledgments: The authors would like to thank the Complutense University of Madrid for the PhD scholarship awarded to the main author, the Fundación Oceanogràfic for the support on this study, Oceanogràfic Aquarium for providing us with the sharks and infrastructure required to develop this study, to the Pharmacology and Toxicology department at the Complutense University of Madrid, and to the team of aquarists and veterinarians at Oceanogràfic for their excellent work and help with this study. A special thank you to Alex Arkwright for the English grammar revision of this manuscript and to the research team working at the Pharmacology Department of the University of Valencia for their great help and advice during the liquid chromatography analysis of the samples.

Abstract:

Objective To determine the pharmacokinetics of meloxicam in the Nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*) during multiple dose administration.

Study design Prospective experimental trial.

Animals A total of 8 clinically healthy adult nursehounds (four males, four females).

Methods Meloxicam was administered intramuscularly at 1.5 mg kg-1 once daily for a 7-day period. Blood samples were collected from the caudal vein for pharmacokinetic analysis at 2.5 hours and 24 hours after drug administration. After a 4-week washout period, meloxicam was administered orally at the same dose at 12-hour intervals for 3 repeated doses. Blood samples were collected at 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 and 48 hours after the first administration. Sharks were visually monitored during each study and 4 weeks afterwards for side effects or signs of toxicity. Time required to achieve steady state was

Artículo 5. Hematology and Plasma Biochemistry Reference Values of Juvenile Undulate Rays (*Raja undulata*) Under Human Care.

- **Revista:** Journal of Zoo and Wildlife Medicine
- **Impacto:** Q2 II=0.34 SJR Vet Sci 2021; Q4 II=0.806 JCR Vet Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Christine Steyrer, Carlos Rojo Solís, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Teresa Encinas y Daniel García Párraga.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio prospectivo.
  - **Animales empleados:** 50 rayas mosaico (*Raja undulata*) clínicamente sanas mantenidas en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia.
  - **Parámetros explorados:** en este estudio se determinan valores de referencia para los principales parámetros hematológicos y bioquímicos en la raya mosaico (*Raja undulata*), utilizando una población homogénea de 43 rayas mosaico juveniles, divididas a su vez en dos subgrupos (1 año *vs* 2 años de edad). Tras la determinación de los intervalos de referencia, se extrajo sangre de 7 rayas mosaico adultas, para evaluar la existencia de posibles diferencias asociadas a la edad.
- **Resultados:** Se detectaron cuatro tipos de glóbulos blancos en la raya mosaico, siendo el linfocito el leucocito predominante en sangre periférica. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los valores bioquímicos entre sexos, ni para los valores hematológicos o bioquímicos entre los subgrupos de 1 *vs* 2 años en las rayas juveniles. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de sólidos totales en plasma, colesterol, triglicéridos, fosfatasa alcalina, nitrógeno ureico sanguíneo, cloro y sodio entre los animales juveniles y adultos. Este estudio es el primero en determinar valores de referencia para la raya mosaico, realizando una discusión detallada sobre la posible influencia de los distintos factores intrínsecos y extrínsecos en los parámetros de la analítica sanguínea en elasmobranquios.

DOI: 10.1638/2021-0140

Journal of Zoo and Wildlife Medicine 53(3): 504–514, 2022
Copyright 2022 by American Association of Zoo Veterinarians

HEMATOLOGY AND PLASMA BIOCHEMISTRY REFERENCE VALUES OF JUVENILE UNDULATE RAYS (*RAJA UNDULATA*) UNDER HUMAN CARE

Pablo Morón-Elorza, DVM, Christine Steyrer, DVM, MSc, Carlos Rojo-Solís, DVM, MSc, Teresa Álvaro-Álvarez, DVM, Mónica Valls-Torres, DVM, Teresa Encinas, DVM, PhD, and Daniel García-Párraga, DVM, PhD, DECZM (ZHM), DECAAH (N-P)

Abstract: Despite the paucity of published literature on elasmobranch hematology and biochemistry, great interspecific diversity has been observed. Blood samples from 43 undulate rays (*Raja undulata*) (23 males, 20 females) hatched and raised at Oceanogràfic Aquarium, were analyzed for hematology and plasma biochemistry. Animals were divided into two age groups: 1 yr old (28 skates) and 2 yr old (15 skates). All individuals were clinically healthy on physical examination. Weight, total length, standard length, and disc width were recorded. No statistically significant differences were observed between male and female juvenile skates for the evaluated morphometric, hematologic, and plasma biochemical values. Once reference intervals (RI) were determined, blood samples from seven healthy adult skates housed at the same aquarium were collected for comparison. Statistically significant differences were observed in cholesterol, triglycerides, alkaline phosphatase, blood urea nitrogen, chloride, and sodium between juvenile and adult skates. This is the first article describing hematological and plasma biochemical RI for this species, increasing the clinical knowledge on elasmobranch blood analytics. These data will serve as a valuable diagnostic and research tool for professionals working with undulate rays and closer relatives in aquariums and in the field. Further studies using larger elasmobranch sample sizes are needed to determine reliable species-specific baseline health values and to evaluate the effect of intrinsic and extrinsic parameters on blood analytics more accurately.

INTRODUCTION

Sharks (superorder *Selachii*), together with rays, skates, and sawfish (superorder *Batoidea*), form the taxonomic subclass *Elasmobranchii*.[7] The undulate ray (*Raja undulata*) belongs to the order *Rajiformes*, which is the largest order of elasmobranchs in the world, comprising almost 300 species.[15] The common name undulate ray is a popular misnomer, as this species is technically a skate, sharing all characteristics of this group, including oviparous reproduction, unlike viviparous rays.[24,34] This species is one of the lesser-studied skates in the northeast Atlantic continental shelf, although it is frequently maintained in aquariums and reported as an important bycatch in some regions.[10] Furthermore, the species is listed as endangered on the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List (www.iucnredlist.org; consulted on February 2022), because of its patchy distribution and large body size required for reproduction (total length [TL] = 84 cm).[16] Its distribution includes the northeastern Atlantic Ocean, from southwest Ireland and southern England to the west coast of Africa, as well as the waters of the Mediterranean Sea.[9]

Because of the limited baseline health reference intervals (RI), health assessments performed on most elasmobranchs use data extrapolated from a few shark and ray species, determined in wild-caught studies or from previously obtained in-house data.[5,23] Interpretations of RI variations are very limited in elasmobranchs, and baseline hematology and plasma biochemistry RI in elasmobranchs have shown high interspecific variability.[17] These factors highlight the need to obtain species-specific reference intervals for hematology and plasma biochemistry parameters. In addition, many variables such as environmental conditions (water-quality parameters, temperature, season), nutrition, age, sex, stress, and disease can influence baseline values.[21] Their effects on blood analytics deserve consideration.

To our knowledge, blood reference values have not yet been published for the undulate ray. The objective of this study was to establish RI for the

From Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, C/Eduardo Primo Yúfera (Científic) 1B, 46013 Valencia, Spain (Morón-Elorza, García-Párraga); Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Avenida Puerta de Hierro s/n 28040 Madrid, Spain (Morón-Elorza, Encinas); Lionsrock Big Cat Sanctuary, Bethlehem, South Africa (Steyrer); Veterinary Services, Oceanogràfic, Avanqua-Oceanogràfic. S.L., C/Eduardo Primo Yúfera (Científic), 1B 46013 Valencia, Spain (Rojo-Solís, Álvaro-Álvarez, Valls-Torres). Correspondence should be directed to Dr. Morón-Elorza (p-moron@hotmail.com).

Downloaded From: https://bioone.org/journals/Journal-of-Zoo-and-Wildlife-Medicine on 04 Oct 2022
Terms of Use: https://bioone.org/terms-of-use Access provided by European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians

Artículo 6. Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care.

- **Revista:** Frontiers in Veterinary Science
- **Impacto:** Q1 II=0.72 SJR Vet Sci 2021; Q1 (D1) II=3.47 JCR Vet.Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Carlos Rojo Solís, Christine Steyrer, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Teresa Encinas y Daniel García Párraga.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio**: estudio prospectivo.
  - **Animales empleados:** 94 tiburones alitanes (*Scyliorhinus stellaris*) adultos clínicamente sanos, mantenidos en cinco acuarios españoles (Oceanogràfic de Valencia, Aquarium Finisterrae, Bioparc Gijón Acuario, Museo Marítimo del Cantábrico, Acuario de Sevilla).
  - **Parámetros explorados:** en este estudio se determinan valores de referencia para los principales parámetros hematológicos y bioquímicos en el tiburón alitán, estableciéndose a modo de colaboración entre distintos acuarios para aumentar el tamaño de la población de referencia, y así la fiabilidad de los intervalos de referencia.

Resultados: Este estudio es el primero en determinar valores de referencia hematológicos y bioquímicos en el tiburón alitán. Los recuentos diferenciales de los leucocitos periféricos fueron similares a los previamente descritos en otros tiburones carcharínidos, siendo los linfocitos los leucocitos predominantes, y evidenciando la existencia de trombocitos granulados en el tiburón alitán. En este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los valores hematológicos entre sexos o estadios de desarrollo. En cuanto a los parámetros bioquímicos, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de gamma-glutamiltransferasa, que pese a estar por debajo del rango de lectura, fueron consistentes en todos los animales estudiados y estuvieron dentro de los rangos previamente determinados en otras especies de elasmobranquio, mostrando niveles significativamente superiores en tiburones alitán adultos en comparación con juveniles. También se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los niveles de colesterol, que fueron mayores en alitanes machos comparados con las hembras.

frontiers | Frontiers in Veterinary Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 11 July 2022
doi: 10.3389/fvets.2022.909834

Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Shark (*Scyliorhinus Stellaris*) Maintained Under Human Care

Pablo Morón-Elorza[1,2*], *Carlos Rojo-Solis*[3], *Christine Steyrer*[4], *Teresa Álvaro-Álvarez*[3], *Mónica Valls-Torres*[3], *Teresa Encinas*[1] and *Daniel García-Párraga*[2,3]

[1] Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain, [2] Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, Valencia, Spain, [3] Veterinary Services, Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, Valencia, Spain, [4] Lionsrock Big Cat Sanctuary, Bethlehem, South Africa

Studies determining baseline hematological reference intervals (RI) in elasmobranchs are very limited. In this study, blood samples were collected from 94 clinically healthy Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care. Median (RI) in major leukocyte types were similar to other Carcharhinid sharks as lymphocytes were the predominant leukocyte with 38.0 (28.2–53.5)%, followed by coarse eosinophilic granulocytes with 20.0 (12.2–31.7)%, fine eosinophilic granulocytes with 6.0 (1.2–12.8) %, monocytes with 2.0 (0.0–6.0)%, and neutrophils with 2.0 (0.0–6.0)%. Nursehound Shark produced granulated thrombocytes, which were classified as granulocytes and represented 28.5 (12.4–39.7)% of all leukocytes. Median (RI) manual red blood cell and white blood cell counts were 177.50 (132.50–210.00) x 10^9 cells/l and 8.26 (5.24–14.23) x 10^9 cells/l, respectively. Median (RI) plasma chemistry values showed alkaline phosphatase 7.7 (4.2–13.0) U/l, aspartate aminotransferase 7.6 (3.3–17.1) U/l, blood urea nitrogen 281.6 (261.2–305.0) mmol/l, calcium 3.97 (3.59–4.47) mmol/l, total cholesterol 2.04 (1.02–3.91) mmol/l, chloride 233.0 (215.2–259.0) mmol/l, iron 3.79 (1.74–6.93) μmol/l, glucose 0.87 (0.47–1.44 mmol/l), potassium 3.8 (2.9–4.6) mmol/l, sodium 243.0 (227.7–271.0) mmol/l, phosphorus 1.58 (1.13–2.10) mmol/l, total protein 24.0 (20.0–35.0) g/l, and triglycerides 0.97 (0.49–3.35) mmol/l. Creatine kinase, gamma glutamyl transferase, and lactate dehydrogenase levels were below the instrument reading range.

Keywords: elasmobranch, shark, hematology, biochemistry, leukocyte, granulocyte, Abaxis, Zoetis

OPEN ACCESS

Edited by:
Bruno Cozzi,
University of Padua, Italy

Reviewed by:
Natascha Wosnick,
Federal University of Paraná, Brazil
Richard Brill,
College of William & Mary, United States

***Correspondence:**
Pablo Morón-Elorza
p-moron@hotmail.com

Specialty section:
This article was submitted to Comparative and Clinical Medicine, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: *31 March 2022*
Accepted: *21 June 2022*
Published: *11 July 2022*

Citation:
Morón-Elorza P, Rojo-Solis C, Steyrer C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T and García-Párraga D (2022) Hematology and Plasma Chemistry Reference Values in Nursehound Shark (Scyliorhinus Stellaris) Maintained Under Human Care. Front. Vet. Sci. 9:909834. doi: 10.3389/fvets.2022.909834

INTRODUCTION

Population-based reference values (RV) represent the most widely used tool for the interpretation of individual clinical laboratory test results and are typically reported as reference intervals (RI) comprising 90–95% of a healthy reference population (1, 2). After the introduction of the concept in human medicine in 1969, RV were rapidly determined for humans and most companion animal species (3–6). However, accurate RV are still lacking for most exotic and aquatic animal species (7). Despite the universally accepted use of population-based RV, the optimal method for

their determination is often discussed, and although a reference population of 120 individuals is frequently recommended for the establishment of species-specific RV, the use of a smaller number of reference individuals is accepted as it is often very difficult to reach large numbers of specimens in many non-domestic animal species (1, 8). While the accuracy in the estimation of RI decreases with the reduction in the reference population size, RI can be statistically determined using parametric or robust statistical methods with sample sizes as low as 20–40 reference individuals (1, 9). Provided that a sample size of 40–120 individuals can be achieved, parametric, robust, or non-parametric methods can be used for the RI determination (1).

Blood collection should be included in the routine health evaluation of elasmobranchs, as underlying disease diagnosis in fish can be challenging and blood work adds important information for their precise health status determination (8, 10, 11). For this purpose, the determination of blood RV provides an important tool for veterinarians, biologists and professionals working with these animals (10). Yet, due to the challenges of working with elasmobranchs, and the difficulties in having access to a large and homogeneous population of sharks and rays, most studies describing hematological and plasma biochemical RI in these animals often rely on small study populations (frequently under 30 individuals) (12–16). In addition, significant differences have been reported among studied species, elucidating the need to obtain species-specific RI to guarantee accurate health assessment interpretations in these animals and the need for further studies with larger elasmobranch populations (15). Collaborations between aquaria maintaining the same elasmobranch species in similar environmental conditions facilitate the obtention of larger reference sample sizes and can allow the determination of more reliable RV.

The Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) of the order *Carcharhiniformes* is a medium-sized oviparous catshark found in the Northeast Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea (17). It is classified as Vulnerable by the IUCN Red List (last consulted in March 2022), with a decreasing population trend (18). Although the species has been consistently housed in aquaria since the 1860s, studies involving this species are still quite limited in comparison to the frequently studied Smallspotted Catshark (*Scyliorhinus canicula*) (19). In addition, to the authors' knowledge, population-based RV have not been determined for this species.

The objective of this study was to document the main hematological and plasma chemical RV for the Nursehound Shark, as well as possible differences which could be associated with sex and developmental stage, using a population of healthy individuals maintained under human care. This information will allow a more accurate interpretation of blood analytical values and improve the quality of the health evaluations performed in this species. Additionally, it will provide a better understanding and comparison of hematology and plasma chemistry with other studied elasmobranch species. It will also allow for further comparison to *in situ* studies with free-ranging Nursehound Shark.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were approved by the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat Valenciana under the project reference OCE-22-19.

Study Design

This study was designed as a prospective experimental trial, arranged as a collaboration between five different Spanish aquaria which housed Nursehound Shark: Oceanogràfic Aquarium of Valencia (Carrer d'Eduardo Primo Yúfera, 1B, Valencia 46013, Spain; www.oceanografic.org), Finisterrae Aquarium (P.° Marítimo Alcalde Francisco Vázquez, 34, A Coruña 15002, Spain; www.coruna.gal/mc2/es/aquarium-finisterrae), Bioparc Gijón Aquarium (Playa De Poniente, S/N, Gijón 33212, Spain; www.acuariogijon.es); Museo Marítimo del Cantábrico (Av. de Severiano Ballesteros, s/n, Santander 39004, Spain; www.museosdecantabria.es/museo-maritimo), and Sevilla Aquarium (Muelle de las Delicias, s/n, Sevilla 41012, Spain; www.acuariosevilla.es).

Animals, Sample Collection and Processing

We collected blood samples from 94 clinically healthy Nursehound Shark (47 females and 47 males). We determined gender based on the presence of claspers (copulatory organs only present in males) (20). We determined body weight (kg) using a crane scale (GRAM CR 150-S, Gram Precision S.L., l'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain), and we took measures for total length (snout to tip of the tail; TL, in cm), and snout to vent length (snout to cloaca; SVL, in cm) using a flexible nylon measure. Former studies determined that female Nursehound Shark mature at an approximate total length of 79 cm, while males mature at 77 cm (17). Total length in animals sampled in our study ranged from 51.0 to 113.0 cm. According to this, we classified sampled shark into two life-history stages: adult (n = 54; 25 females and 29 males) (females with a TL over 79 cm and males with a TL over 77 cm) or subadult (n = 40; 22 females and 18 males) (females with a TL under 79 cm and males with a TL under 77 cm), to examine possible differences in their analytical values. It was not possible to accurately classify animals as sexually mature/immature nor determine if adult females were carrying eggs. Sampled animals were housed in five different aquaria in Spain. **Table 1** provides demographic information for sampled shark.

We selected reference individuals after the evaluation of their medical history and the completion of an initial physical examination to assess their general condition. Any deviation in an animal's medical history, behavior, skin color and appearance, ocular status and reflexes, oral cavity, gums and teeth appearance, presence of external lesions, spinal deformities, abnormal swimming, or buccal pumping/forced ventilation was considered an exclusion criteria. All shark were considered clinically healthy, and the 94 collected samples were used for determining the RI. All sampling occurred during the month of August 2021. We submitted all individuals to a fasting period which ranged from 24 to 36 h prior to sampling, as imbalances in plasma chemistry

TABLE 1 | Classification of Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) included in this study according to sex and developmental stage.

Aquarium	Sex		Developmental stage	
	Female	Male	Adult	Subadult
Oceanogràfic Aquarium	6	10	14	2
Finisterrae Aquarium	15	7	14	8
Bioparc Gijón Aquarium	5	5	5	5
Mueo Marítimo del Cantábrico	10	7	16	1
Sevilla Aquarium	11	18	5	24
Total	47	47	54	40

Shark were sampled from five different aquaria in Spain. Sex was determined based on the presence of claspers and developmental stage was determined based on their total length (17, 20).

have been described in the Spiny dogfish (*Squalus acanthias*) when samples were collected after feeding (21).

Environmental conditions varied slightly between aquaria included in the study. In all aquaria, shark were maintained in tanks provided with life support systems which included mechanical filtration (through sand filters), protein skimmers, biological filtration, and disinfection through UV. In all aquaria, ammonia was maintained under 0.01 ppm, nitrite under 0.05 ppm, and nitrate under 100 ppm. Holding systems in Finisterrae Aquarium, Bioparc Gijón Aquarium, and Museo Marítimo del Cantábrico were filled with natural sea water, filtered from the Cantabrian Sea (coastal waters of the Atlantic Ocean), while Oceanogràfic Aquarium was supplied with natural seawater filtered from the coast of Valencia (Mediterranean Sea) and Sevilla Aquarium was supplied with water filtered from the coast of Cadiz, Spain (Atlantic Ocean). Water temperature, pH, and salinity in the holding systems of Oceanogràfic Aquarium were 18°C, 8.0 and 35.0 ‰, respectively; 18.5°C, 7.9, and 35.2 ‰ in Finisterrae Aquarium; 13°C, 8.0, and 35.0 ‰ in Bioparc Gijón Aquarium; 19°C, 7.8 and 35.6 ‰ in Museo Marítimo del Cantábrico; 18°C, 8.1 and 34.5 ‰ in Sevilla Aquarium. Diet also varied slightly between the different aquaria: Nursehound Shark housed at Oceanogràfic and Sevilla Aquariums were fed once daily, 3 days per week, with pieces of thawed hake (*Merluccius spp.*), squid (*Loligo spp.*), herring (*Clupea spp.*), or mackerel (*Scomber spp.*) supplemented with potassium iodide capsules and Akwavit® fish eating animal tablets (Product reference: 690,206; KASPER faunafood, Woerden 3,440 AA, Netherlands). Nursehound Shark housed at Finisterrae Aquarium were fed once daily, 3 days per week, with pieces of thawed hake, mackerel, and prawn (*Penaus spp.*) supplemented with Vetregard® immunostimulants (AQUAVET S.A., Athens 14,341, Greece), Vit-amin C and Mazuri® Shark & Ray tablets (Mazuri® exotic animal nutrition; St. Louis 63,166, USA). Shark housed at Bioparc Gijón Aquarium were fed once daily, 3 days per week, with pieces of thawed hake, squid, capelin (*Mallotus spp.*), and sprat (*Sprattus spp.*); feed trays were supplemented with spirulina and Calfostonic® powder (Industrial Veterinaria, S.A, Esplugues de Llobregat 08950, Spain). Finally, shark housed at Museo Marítimo del Cantábrico were fed once daily, 4 days per week with pieces of thawed mackerel, Humboldt squid (*Dosidicus gigas*), and pollock (*Pollachius spp.*). All aquaria participating in the study maintained a similar feeding intake rate for their Nursehound Shark, ranging from 5 to 10% body weight per week.

During sampling, we carefully captured shark using a rubber net and manually restrained them in water in a dorsal recumbency to induce tonic immobility which occurred in <1 min in all sampled individuals facilitating blood collection (22). We collected a volume of 1 ml peripheral blood immediately from the caudal vasculature by lateral approach using a 25-gauge needle attached to a 1 ml syringe (22, 23). Blood was then introduced into 1 ml lithium heparin tubes (AQUISEL® 1 ml 12x55mm REF: 1,501,406; Aquisel S.L., Abrera 08630, Spain), which were refrigerated at 4°C and processed within a maximum of 90 min after collection. Time required from capture until blood collection was always <3 min (ranging from 1 to 3 min), and the entire handling procedure was always <5 min per individual (ranging from 3 to 5 min). No animal showed clinical signs during the study nor the month following the study.

Hematological analysis included manual packed cell volume (PCV), which we determined using microhematocrit tubes, centrifuged at 1,372 g (3,500 rpm) for 6 min at room temperature (24°C) in a portable centrifuge (Digital angle centrifuge 2,615/1 Nahita-Blue, 100 mm rotor radius; LABOQUIMIA, Lardero 26,140, Spain). We determined plasma total solids (TS) using an analog refractometer (LABOLAN® model FG301/311; Labolan S.L., Esparza 31,191, Spain). Next, we collected 10 µl of blood and mixed with them with 490 microliter Natt-Herricks solution (Natt-Pette™, Exotic Animal Solutions, Inc., Melbourne 32,941, USA) to perform RBC and total granulocyte manual counts using a Neubauer improved counting chamber (Assistant Glaswarenfabrik Karl Hecht Gmbh & Co Kg, Sondheim vor der Rhön 97,647, Germany). We performed blood smears using lithium-heparin blood samples, previously homogenized, left to dry at ambient temperature (24°C), and stained using a Diff-Quick stain (Diffvet DMV Diagnóstico Médico Veterinario, SL., Barcelona 08198, Spain). We also performed leukocyte differential counts using a portable optical microscope (Vetscan HDmicroscope, ABAXIS Europe Gmbh, Griesheim 64,347, Germany) equipped with an IS E-Plan achromat objective 100 x and immersion oil. We inspected each smear to exclude the presence of platelet and leukocyte aggregates. Leukocyte differentials consisted of counting a minimum of 100 WBC per animal and sample, and the further calculation of cell percentages. Scyliorhinid shark leukocytes have been studied under electron microscopy in previous studies and have been classified into four types according to the structure of their granules (24). In this study, we performed leukocyte differential counts using the following cell nomenclature: fine eosinophilic granulocyte (FEG, granulocyte type I or heterophil-like cells); neutrophil (granulocyte type II or neutrophil-like cells), coarse eosinophilic granulocyte (CEG, granulocyte type III or eosinophil-like cells), granulated thrombocytes (GT, granulocyte type IV), lymphocytes, and monocytes (13, 24).

After hematology analysis, we centrifuged lithium heparin tubes at 448 g (2,000 rpm) for 5 min to obtain plasma using the same centrifuge. We collected plasma, transferred it to 1.5 ml

Eppendorf tubes, which were frozen at −18°C until processing. We Processed all samples within a maximum of 30 days from collection at the laboratory located at the veterinary clinic of Oceanogràfic Aquarium using a Beckman Coulter® Chemistry Analyzer through spectrophotometry and potentiometry (A91961 - AU480 Chemistry Analyzer, Beckman Coulter S.L.U., Alcobendas 28,108, Spain). Plasma chemistry profiles included alkaline phosphatase (ALP) (International Federation of Clinical Chemistry -IFCC- method), aspartate aminotransferase (AST) (IFCC method with Pyridoxal Phosphate), blood urea nitrogen (BUN) (Urease/GLDH method), calcium (Ca) (oCPC method), total cholesterol (CHO-POD method), chloride (Cl) (ISE indirect), creatine kinase (CK) (IFCC method), gamma-glutamyl transferase (GGT) (IFCC method), glucose (Gluc) (HK G6P-DH method), iron (Fe) (TPTZ method), lactate dehydrogenase (LDH) (IFCC method), sodium (Na) (ISE indirect), phosphorus (molybdate, UV method), potassium (K) (ISE indirect), total proteins (TP) (Biuret method), and triglycerides (Trig) (GPO-POD method).

Statistical Analysis

We established reference intervals following the recommended guidelines published by the American Society of Veterinary Clinical Pathology (ASCVP), using the RefVal adv. 2.0 Excel addin and the MedCalc® statistical software (1, 9). We identified outliers using the Dixon's outlier range statistic, and we performed a visual inspection of histograms (25). If we detected an outlier in one analyte, iwas eliminated it and re-run the analysis until the dataset was free from outliers. For leukocyte differential counts, if one outlier was detected in one cell type, we excluded the entire differential count from that individual from the leukocyte differential count. We used the Shapiro-Wilk test to determine Gaussian distribution and established a p-value of 0.2 as a cut off value instead of 0.05, following the previously established recommendations for RI determination using small sample sizes (26). If $p \geq 0.2$, the parametric method was used, and if $p \leq 0.2$ the non-parametric method was used. The 90% confidence intervals (CI) were calculated using a bootstrap method. Because all obtained data were not normally distributed, we used nonparametric statistics, and we report summary statistics as median values throughout the manuscript. We also provide mean values, SD, maximum, and minimum values for every analyte in the tables presented in the results section of this manuscript. We evaluated differences between sexes (female vs. male) and developmental stage (adult vs. subadult) for morphometrical, hematological, and biochemical analytes using a Mann-Whitney U test. We evaluated differences between aquaria and subgroups (adult female vs. adult male vs. subadult female vs. subadult male) using a Kruskal-Wallis test and Dunn's *post hoc* tests with Bonferroni corrections. In addition, we performed a Spearman's rank-order correlation, and calculated the coefficient of determination (R^2) for size (using the morphometric measurements weight, TL and SVL) and the rest of the hematological and plasma chemical parameters. We performed statistical analyses using the statistical software package RStudio® (Version 1.2.504; RStudio Team, 2020. Boston 02210, USA; www.rstudio.com). We set statistical significance at $p < 0.05$. We have expressed results using the Standard International System of Units.

RESULTS

Morphometric Measurements

Median weight was 2.40 kg (range = 0.70–7.45 kg), median TL was 79.0 cm (range = 51.0–113.0 cm), median SVL was 38.0 cm (range = 18.0–56.0 cm). A comparison for morphological measurements between female and male sharks is provided in the **Supplementary Material**. No statistically significant differences were detected between sexes for weight, TL, and SVL ($p = 0.817$, 0.607, and 0.522, respectively; Mann-Whitney U test). When comparing across subgroups (adult females vs. adult males vs. subadult females vs. subadult males), differences were also not significant ($p > 0.05$; Dunn's test, Bonferroni adjusted).

Hematology

Descriptive statistics for hematology analytes are shown in **Table 2**, a comparison for hematological values between sexes and a comparison between developmental stages is provided in the **Supplementary Material**. We classified leukocytes as lymphocytes, monocytes, neutrophils, FEG and CEG. Nursehounds produced granulated thrombocytes, which were classified as granulocytes (13, 24). We did not find statistically significant differences between sexes for any hematological value ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test), and we did not detect significant differences when comparing the hematological values obtained from the different aquaria participating in the study ($p > 0.05$; Kruskal-Wallis test). Furthermore, we did not detectstatistically significant differences in hematological parameters between developmental stages (adult vs. subadult) ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test) and across the different subgroups (adult female vs. adult male vs. subadult female vs. subadult male) ($p > 0.05$; Kruskal-Wallis test). Main peripheral blood cells found in the Nursehound Shark are presented in **Figure 1**.

Blood Chemistry

Descriptive statistics for blood chemistry are presented in **Table 3**, and a comparison between female and male shark biochemical values is presented in the **Supplementary Material**. Plasma CK and LDH values are not reported as they were under the limit of detection in all sampled animals (10 U/l for CK and 25 U/l in LDH). Plasma GGT values are reported in this study, despite being under the linear ranges of the chemistry analyzer (3–1,200 U/l), as they were consistent in all animals sampled and maintained within values previously determined in several elasmobranch species (27). Median plasma total cholesterol was significantly higher in male shark (2.17 mmol/l) compared to females (1.71 mmol/l) ($p < 0.05$; Mann-Whitney U test). Plasma total cholesterol was also significantly higher in adult males (median 2.36 mmol/l) when compared to adult females (median 1.57 mmol/l) ($p < 0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted), but comparison between subadult

TABLE 2 | Hematology reference intervals for Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) under human care.

Analyte (unit)	*n*	Mean	SD	Median	Min	Max	RI	LRL	URL
PCV (l/l)	94	0.17	0.01	0.17	0.14	0.21	0.15–0.20	0.14–0.15	0.20–0.21
TS (g/l)	94	58.0	4.0	58.0	50.0	68.0	50.0–66.0	50.0–51.0	66.0–68.0
WBC (10^9/l)	86	8.85	2.53	8.26	4.91	14.53	5.21–14.23	4.91–5.66	13.47–14.53
RBC (10^9/l)	94	172.7	22.4	177.5	122.5	240.0	132.5–210.0	122.5–135.9	205.0–240.0
L (%)	86	39.5	5.5	38.0	27.0	54.0	28.2–53.5	27.0–32.0	48.0–54.0
M (%)	86	2.8	1.6	2.0	0.0	7.0	0.0–6.0	0.0–0.2	6.0–7.0
N (%)	86	2.5	1.6	2.0	0.0	6.0	0.0–6.0	0.0–0.0	5.7–6.0
FEG (%)	86	6.3	2.8	6.0	1.0	14.0	1.2–12.8	1.0–3.0	12.0–14.0
CEG (%)	86	20.7	4.6	20.0	12.0	33.0	12.2–31.7	12.0–14.0	28.0–33.0
GT (%)	86	28.2	6.4	28.5	12.0	40.0	12.4–39.7	12.0–16.5	38.0–40.0
L (10^9/l)	84	3.44	1.15	3.24	1.55	6.55	1.80–6.48	1.55–1.97	5.68–6.55
M (10^9/l)	86	0.25	0.15	0.23	0.00	0.65	0.00–0.61	0.00–0.01	0.51–0.65
N (10^9/l)	84	0.21	0.13	0.18	0.00	0.56	0.00–0.52	0.00–0.00	0.41–0.56
FEG (10^9/l)	86	0.55	0.27	0.48	0.09	1.32	0.12–1.28	0.09–0.22	1.18–1.32
CEG (10^9/l)	86	1.82	0.63	1.71	0.68	3.67	0.81–3.60	0.69–1.09	2.93–3.68
GT (10^9/l)	85	2.46	0.84	2.33	0.75	4.50	1.12–4.37	0.75–1.28	3.99–4.50

n, number of individuals; SD, standard deviation; RI, reference intervals; LRL, 90% confidence interval of the lower reference limit; URL, 90% confidence interval of the upper reference limit; D, distribution; PCV, packed cell volume; TS, total solids; WBC, white blood cells; RBC, red blood cells; L, lymphocyte; M, monocyte; FEG, fine eosinophilic granulocyte; CEG, coarse eosinophilic granulocyte; N, neutrophile; GT, granulated thrombocyte.

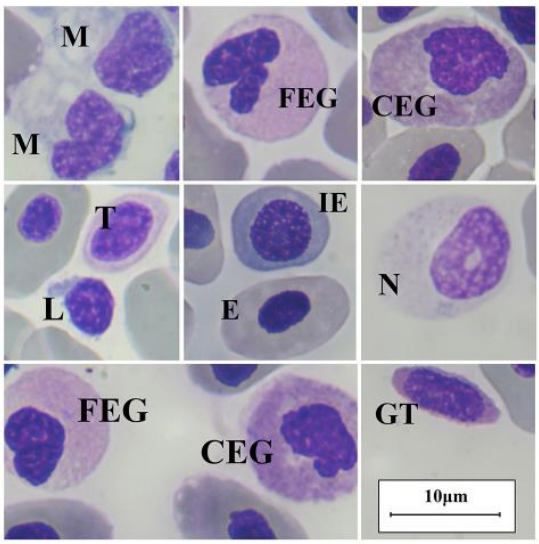


FIGURE 1 | Nursehound Shark (*Scyliorinus stellaris*) main peripheral blood cells. Diff-Quick stain and optic microscopy 100x using immersion oil. M, monocyte; FEG, fine-eosinophilic granulocyte; CEG, coarse-eosinophilic granulocyte; L, lymphocyte; T, thrombocyte; E, erythrocyte (mature); IE, immature erythrocyte; N, neutrophil; GT, granulated thrombocyte.

males (median 2.12 mmol/l) and subadult females (median 1.86 mmol/l) showed no significant differences ($p = 0.295$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted), thus revealing that differences in cholesterol between sexes were stronger in adult animals. No statistically significant differences were detected when comparing total cholesterol levels between adult males vs. subadult males ($p = 0.850$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted) nor between adult females vs. subadult females ($p = 0.120$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted). Except total cholesterol, no statistically significant differences in any other parameter were detected between sexes. Variations in plasma chemical values between aquaria were only statistically significant for ALP ($p < 0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted). Correlation between size (using the determined morphometric measurements: weight, TL, and SVL) and biochemical parameters was low ($R^2 < 0.150$). Despite this low correlation, statistically significant differences were found for GGT between adult and subadult shark ($p < 0.05$; Mann-Whitney *U* test).

DISCUSSION

Aquaria allow for the achievement of safe, efficient, and economic study of elasmobranchs, as well as procurement of important information and expansion of knowledge in many areas of elasmobranch biology and medicine (11, 28).

Hematology

Median PCV (0.17 l/l) values were within ranges of those reported in previous studies with elasmobranchs, which show typically low values in healthy elasmobranchs and important variations between species (aquarium-maintained Bamboo Shark (*Chiloscyllium plagiosum*) (0.13 l/l), aquarium-maintained Smooth Dogfish (*Mustelus canis*) (0.24 l/l), and free-ranging Bonnethead Shark (*Sphyrna tiburo*) (0.22 l/l) (16, 29, 30). Median TS (58 g/l) were also similar to other elasmobranch species such as the free-ranging Bonnethead Shark (63 g/l),

TABLE 3 | Blood chemistry reference intervals for Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) under human care.

Analyte (unit)	*n*	Mean	SD	Median	Min	Max	RI	LRL	URL
ALP (U/l)	92	7.8	2.2	7.7	4.1	13.8	4.2–13.0	4.1–4.6	11.7–13.8
AST (U/l)	88	8.0	3.5	7.6	3.0	17.2	3.3–17.1	3.0–3.5	15.3–17.2
BUN (mmol/l)	94	281.9	12.5	281.6	256.0	315.7	261.2–305.0	256.0–265.0	302.4–315.7
Ca (mmol/l)	89	3.97	0.20	3.97	3.52	4.62	3.59–4.47	3.52–3.64	4.37–4.62
Chol (mmol/l)	93	2.07	0.74	2.04	0.60	4.04	1.02–3.91	0.60–1.10	3.68–4.04
Cl (mmol/l)	86	233.5	10.0	233.0	213.0	259.0	215.2–259.0	213.0–218.4	254.0–259.0
Fe (μmol/l)	94	3.79	1.34	3.79	1.27	7.00	1.74–6.93	1.27–2.17	6.48–7.0
GGT (U/l)	91	0.9	0.8	0.6	0.0	2.8	0.0–2.6	0.0–0.1	2.5–2.8
Gluc (mmol/l)	90	0.89	0.23	0.87	0.23	1.44	0.47–1.44	0.44–0.52	1.34–1.44
K (mmol/l)	94	3.8	0.4	3.8	2.8	4.8	2.9–4.6	2.8–3.1	4.4–4.8
Na (mmol/l)	92	244.7	11.1	243.0	224.0	272.0	227.7–271.0	224.0–230.0	269.0–272.0
Phos (mmol/l)	94	1.58	0.26	1.58	1.00	2.13	1.13–2.10	1.00–1.19	2.03–2.13
TP (g/l)	94	25.0	4.0	24.0	19.0	36.0	20.0–35.0	19.0–20.0	33.0–36.0
Trig (mmol/l)	90	1.17	0.65	0.97	0.39	3.44	0.49–3.35	0.39–0.55	2.51–3.44

n, number of individuals; SD, standard deviation; RI, reference intervals; LRL, 90% confidence interval of the lower reference limit; URL, 90% confidence interval of the upper reference limit; ALP, alkaline phosphatase; AST, aspartate aminotransferase; BUN, blood urea nitrogen; Ca, calcium; Chol, total cholesterol; Cl, chloride; GGT, gamma-glutamyl transferase; Gluc, glucose; Fe, iron; Na, sodium; Phos, phosphorus; K, potassium; TP, total proteins; Trig, triglycerides. Reported GGT values were under the linear range of detection of the chemistry analyzer (3-1200 U/l).

the free-ranging Southern Stingray (*Dasyatis americana*) (56 g/l) and the aquarium-maintained Spotted Eagle Ray (*Aetobatus narinari*) (57 g/l) (8, 16, 31). Variations in elasmobranch RBC counts across species have been associated with differences in physiological activity (32). Median RBC counts (177.50 x 10^9 erythrocytes/l) were similar to those obtained in other non-obligate ram-ventilating benthic elasmobranchs such as the Winter Skate (*Leucoraja ocellata*) (200.0 x 10^9 erythrocytes/l), and lower than those reported in pelagic elasmobranch species such as the Cownose Ray (*Rhinoptera bonasus*) (511.2 x 10^9 erythrocytes/l) and other obligate ram-ventilating Carcharhinid sharks such as the Sandbar Shark (*Carcharhinus plumbeus*) (402.0 x 10^9 erythrocytes/l) and the Blacktip Shark (*Carcharhinus limbatus*) (476.0 x 10^9 erythrocytes/l) (10, 32–34). Capture-related alterations in PCV and RBC counts should be also considered in elasmobranchs, as an increase in PCV and RBC has been reported in different shark species during exercise and after exposure to anoxic conditions, which have been associated to RBC release from hematopoietic organs into the peripheral blood (35).

Former hematological studies with elasmobranchs also showed important variations in leucocyte differential counts between the different elasmobranch species (10, 15). Lymphocytes, monocytes, FEG, and CEG appear to be present in all the studied elasmobranch species, though their proportions in the leukocyte differential counts vary greatly across shark and ray species (13, 36, 37). In our study, median proportion of the major leukocyte types was similar to other Carcharhinid sharks, with lymphocytes as the predominant WBC with 38.0% of all leukocytes, followed by CEG with 20.0%, FEG with 6.0%, monocytes with 2.0%, and neutrophils with 2.0%. As previously described in other Carcharhinid species, the Nursehound Shark had granulated thrombocytes, which in an attempt to assist the standardization of hematological analysis in elasmobranchs, were classified as granulocytes and represented 28.5% of all leukocytes (30). Granulated thrombocytes have also been reported as the most frequent granulocyte in other Carcharhinid sharks such as the aquarium-maintained Sandbar Shark, with a median percentage of 21% in the differential count, followed by CEG (11.0%), FEG (7.0%), and neutrophils (6.5%); lymphocytes were also the predominant peripheral leukocyte (50.0%) and with monocyte production occurring only in small pro-portions (3.0%) (13). Previous studies also described 2 types of thrombocytes in other elasmobranchs, including the Smallspotted Catsharks, the Torpedo Ray (*Torpedo spp.),* and the Port Jackson Shark (*Heterodontus portusjacksoni*) (24, 38, 39). However, GT seem to be absent in other Non-Carcharhinid elasmobranch species such as the aquarium-maintained Cownose Ray and the aquarium-maintained Whale Shark (*Rhincodon typus*), where FEG have been reported as the most frequent peripheral granulocyte (36, 37). Granulated thrombocytes do not have a clear mammalian equivalent cell and their specific role in elasmobranchs remains unknown (30, 35). Similar to Nursehound Shark, some other species such as the aquarium-maintained Smooth Dogfish, the Sandbar Shark, and the Whale Shark also produce a granulocyte type, classified as neutrophil, in which the granules do not take up stain (13, 37). Basophils were not detected in Nursehound Shark peripheral blood smears. Basophils, described as extremely rare or absent in some elasmobranch species, are also not included in the differential counts of Carcharhinid sharks such as the Sandbar Shark and the aquarium-maintained Smooth Dogfish (10, 13, 30). Interpreting leukocyte differential counts in elasmobranchs in challenging, as the clinical implications of the leukocyte types is not fully understood. Leukocytosis has been reported in elasmobranchs suffering from stress and inflammation related to

trauma, bacterial, fungal or parasitic infections (35). Monocytes and FEG obtained from the Nurse Shark (*Ginglymostoma cirratum*) have demonstrated phagocytic activity *in vitro*, and despite immature granulocytes are described as a normal finding in blood smears from clinically healthy elasmobranchs, a left-shift in leukocyte differential counts has been also described in elasmobranchs suffering from infectious and inflammatory pathologies (35, 40).

Total leukocyte counts (median 8.26 x 109 cells/l) were kept within the previously reported values for other elasmobranch species such as the aquarium-maintained Whale Shark (5.1 x 109 cells/l) and the Blacktip Reef Shark (*Carcharhinus melanopterus*) (13.7 x109 cells/l) (15, 39, 41). As a reference, blood samples collected from injured female Nursehound Shark with moderate reproductive bite wounds at Oceanogràfic Aquarium, which were not included in this study, provided examples of data outside the determined RI for the species. For instance, an adult Nursehound Shark (2.7 kg, 84 cm TL and 40 cm SL) had increased WBC counts (21.34 x 109 cells/l) and FEG percentage (23%). WBC counts and FEG percentages have been described to increase in fish suffering from infectious or inflammatory diseases and stress (42, 43). However, these increased values for the studied species would still be considered within range if hematological values were extrapolated from median WBC counts (min-max) previously determined for the aquarium-maintained Smooth Dogfish (15.3 (10.5–23.9) x 109 cells/l), the Sandbar Shark (22.1 (17.2–26.7) x 109 cells/l), the Grey Nurse Shark (*Carcharias taurus*) and the Tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) (16.3 (4.5–40.5) x 109 cells/l) (33, 44). The large differences detected in hematological values across elasmobranch species, including leukocyte differential counts, RBC counts, and WBC counts, illuminate the limitations of inter-specific extrapolation when working with sharks and rays and the need for further studies determining hematological RV in a wide range of elasmobranch species.

Blood Chemistry

Statistically significant variations in plasma chemical values were only detected across aquaria for ALP, with significantly higher ALP in animals sampled from Bioparc Gijón Aquarium (median 10.9 U/l) compared to Museo Marítimo del Cantábrico (5.6 U/l) and Finisterrae Aquarium (median 7.3 U/l) ($p < 0.05$, Dunn's test, Bonferroni-adjusted). Variations were not significant when compared to Oceanogràfic of Valencia (median 7.8 U/l) and Sevilla Aquarium (median 7.9 U/l). Alkaline phosphatase activity is involved in the mineralization of both bony and cartilaginous skeletons (27, 45). Different factors could have contributed to the observed differences in ALP values as variations related to diet, growth, and skeletal development have been reported in elasmobranchs (12, 27). Bioparc Gijón Aquarium was the only aquarium supplementing their animals with Calfostonic® powder (CALFOSTONIC, Industrial Veterinaria, S.A, 08950 Esplugues de Llobregat, Spain) which is rich in calcium, phosphorus, and vitamin D3 (cholecalciferol), among other analytical components. Alkaline phosphatase activity has proven to increase 2–3-folds in chicks after the administration of vitamin D3, and interactions between vitamin D and calcium metabolism have been described which could have indirectly affected ALP metabolism in the Nursehound Shark (46). Another factor to consider in the evaluation of ALP variations is the effect of capture-related stress, as ALP levels have been associated with tissue damage in severely stressed fish during long and intense capture procedures (>50 min), showing a positive relationship with capture time, although the differences observed in our study are less probably related to this as all procedures were consistently short (41). Median ALP values reported in this study (7.7 U/l) were kept within the general ALP range described for elasmobranchs and previously reported values for other elasmobranch species such as the free-ranging Bull Shark (*Carcharhinus leucas*) (median 2 U/l), the free-ranging Bonnethead Shark (median 5 U/l), the free-ranging Grey Nurse Shark (median 20 U/l), and the aquarium-maintained Cownose Ray (median 34 U/l) (12, 34, 42). Variations in diet components, environmental parameters, capture time and age can also lead to alterations in calcium and phosphorus, though no significant differences in these analytes were detected between aquaria in this study and median values (3.97 and 1.58 mmol/l, respectively) were kept within values previously reported in wild-caught Cownose Rays, Southern Stingrays, Bonnethead Shark, and the aquarium-maintained Smooth Dogfish (8, 16, 30, 36, 43).

Median GGT levels were significantly higher in shark classified as adults (0.7 U/l) compared to subadults (0.4 U/l) ($p < 0.05$; Mann-Whitney U test). This enzyme, which is present in cell membranes, contributes to maintain intracellular homeostasis and is a physiological biomarker of hepatobiliary disfunction, increasing in sharks with bile accumulation (27, 44). Variations of GGT with increasing age have been described not only in mammals, but also in other shark species such as the free-ranging Grey Nurse Shark, with lower GGT values in juvenile (0–4 U/l) compared to adult individuals (1–8 U/l) (27, 47). Despite being under the linear range of detection (3–1,200 U/l), RI determined for GGT activity in this study (0.0–2.6 U/l) were similar to those previously determined in other shark species such as the free-ranging Blue Shark (*Prionacea glauca*) (0–2 U/l) and the free-ranging Scalloped Hammerhead (*Sphyrna lewini*) (0–4 U/l) (27).

Creatine kinase values determined in this study were below the instrument range (< 10 U/l). Reported plasma CK values vary greatly between the different studies involving elasmobranchs; median CK was 80.5 U/l in wild-caught southern stingrays, values ranged from 18 to 735 U/l in wild-caught Bonnethead Sharks, low levels (2–13 U/l) were described in Smooth Dogfish under human care, and CK levels under the limit of detection (<4 U/l) were also reported in aquarium-maintained Cownose Rays (8, 16, 30, 34). Important differences between studies and elasmobranch species have also been de-scribed for AST; Nursehound Shark median AST values (7.6 U/l) were under those reported in wild-caught Atlantic Sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) (22.5 U/l) and Bonnethead Shark (39.0 U/l), though very close to those of wild-caught Spiny Dogfish (7.0 U/l) and aquarium maintained Smooth Dogfish (10.6 U/l) (15, 30). In this study, LDH values were below the instrument range (<25 U/l). This is consistent with the low LDH levels, frequently under the limit

of detection, reported in other elasmobranch species such as wild-caught Bonnethead Shark (<5 U/l), aquarium-maintained Smooth Dogfish (<10 U/l), and Cownose Ray (<4 U/l) (16, 30, 34). Previous studies have shown that CK, AST, and LDH enzymes, normally found intracellularly, significantly increase in plasma after the capture and transport of elasmobranchs, indicating cell disruption and potential necrosis, and suggesting the presence of muscle damage in elasmobranchs (48). The mentioned differences highlight the need to carefully describe capture procedures and sampling technique when establishing blood RV in elasmobranchs to avoid capture-related stress effects on analytical data (12). Former studies already demonstrated the importance of using well-defined standard procedures when establishing RI in elasmobranchs, including restraint and sampling methods which are fast and efficient, to reduce capture-related stress artifacts on analytical data (12, 49). Due to the short sampling procedure required for sample collection during this study, and as anesthesia and chemical sedation have shown to affect stress-related blood variables in sharks, tonic immobility was selected in this study as the restraint method of choice (50). Tonic immobility is described as an effective immobilization method in sharks for non-painful, short handling procedures, reducing the chances of trauma and avoiding the complications associated with chemical immobilization (22). Despite tonic immobility has also been described to produce physiological changes in elasmobranchs when maintained in this state for extended periods of time, the quick sampling procedure developed in this study is considered the least invasive and has been used for blood collection in different physiological, hematological and plasma chemical studies with elasmobranchs, including sharks from the family *Scyliorhinidae* (12, 14, 22, 50, 51). As previously described in other catshark species, placing Nursehound Shark in a dorsoventral decubitus rapidly induced a state of tonic immobility (<1 min), which allowed the safe and efficient handling of the animals; the mild sedation produced during tonic immobility was rapidly reversed (<1 min) when shark were turned ventrodorsally after sampling (22). In the design of this study, blood collection was performed prior to morphological measurement to decrease time to blood collection and therefore capture-related effects on blood analytics (49). The same capture and animal handling protocol was used for all shark included in this study, and blood collection and sample processing was performed by the same researcher and sample equipment for all animals in an attempt to reduce possible variations in the obtained analytical values. Blood RV provided in this studycould serve as a useful tool for researchers or members of animal care and welfare committees evaluating the effect of capture, transport, handling, and different experimental procedures on the analytical values of this species.

Slight non-statistically significant variations in glucose values were detected across aquaria as median levels were higher in Oceanogràfic Aquarium (0.91 mmol/l) than in Finisterrae Aquarium (0.83 mmol/l), Bioparc Gijón Aquarium (0.80 mmol/l), Museo Marítimo del Cantábrico (0.85 mmol/l), and Sevilla Aquarium (0.86 mmol/l). Previous studies have determined that glucose can decrease by 5–7% per hour in unprocessed blood samples due to glycolysis (52). Variations in processing time (always under 90 min) could have contributed to the variations in glucose values obtained in this study and should be considered when determining glucose RV in elasmobranchs. Previous studies reported low glucose values as a normal finding in healthy elasmobranchs and obtained similar values to those provided in this study (14). Other factors including the influence of hyperactivity and stress associated with capture and handling should also be considered when determining glucose values, though interpretation should be performed with caution in elasmobranchs due to the important physiological and metabolic differences compared to other aquatic vertebrates (14, 53, 54). Further studies evaluating the effect of handling and tonic immobility on plasma chemical values are needed in the Nursehound Shark to allow an accurate interpretation of variations produced in this analyte.

Electrolyte values (calcium, chloride, sodium, and potassium) obtained in this study were similar to those previously reported in other elasmobranchs maintained under human care such as the Smooth Dogfish, the Cownose Ray, and the Southern Stingray (14, 30, 34). No statistically significant differences in electrolyte values were detected in this study between sexes nor developmental stages. Median BUN value reported in this study (281.6 mmol/l) were lower than those for Spiny Dogfish (350.35 mmol/l) and cownose rays under human care (363.10 mmol/l) (14, 30). Variations in BUN within different elasmobranch species have been previously described, with BUN values normally high in healthy elasmobranchs (8). In addition, elasmobranch BUN is directly influenced by nutritional status, as these animals can transform ammonia into urea (21, 55). To avoid imbalances in analyte measurements, individualswere fasted for a minimum 24 h period; this could have influenced lower BUN values, as previous studies using Spiny Dogfish showed a significant increase in BUN 20 h after feeding (21). Furthermore, BUN values were closer to those reported in wild-caught Cownose Ray following transport (304.96 mmol/l), an stressful procedure in which animals normally do not eat (36). It should be also considered that previous physiological studies with elasmobranchs reported a significant increase in plasma electrolytes, together with a decrease in BUN values after a stressful stimulus such as an 18 min period of aerial exposure (50). In the mentioned study, urea did not decrease significantly right after the aerial exposure, though it was significantly reduced 5 h after the stressful procedure. Urea is the main organic osmolyte in marine elasmobranchs, and the decreased BUN values in marine elasmobranchs has been linked to the increased permeability of the gills produced during the acute-stress response, which improves gas exchange and allows the passive diffusion of ions (56). This mechanism leads to an increase in plasma osmolarity, with increased levels of calcium, chloride, sodium and potassium in plasma, together with a decrease in BUN, which is mainly eliminated in the gills in exchange with sodium (50, 56). These variations also illuminate the importance of registering and considering environmental conditions, diet, and sampling procedures and time to blood collection used in studies measuring blood RV

in elasmobranchs. In this study, although slight variations were observed in calcium, chloride, sodium, potassium, and BUN between aquaria, differences were not statistically significant ($p > 0.05$; Kruskal-Wallis, Bonferroni-adjusted), likely due to the similar environmental and management conditions and equal sampling protocols.

Plasma total cholesterol values were significantly higher in males (median 2.17 mmol/l) when compared to females (median 1.71 mmol/l) ($p < 0.01$). Important variations in cholesterol and lipoproteins have been described according to species, season, and reproductive status in elasmobranchs, also showing higher cholesterol levels in male Small-spotted Catshark when compared to females (12, 57). Statistical comparison between animals classified as adult females vs. adult males also showed significant differences ($p < 0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted), but the difference between subadult males and subadult females was not significant ($p = 0.295$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted). Similar to cholesterol, variations in plasma triglyceride levels have been reported in elasmobranchs related to sexual maturation, reproduction, and food availability (58). Although former studies with free-ranging Small-spotted Catshark described significantly higher plasma triglycerides in females compared to male shark associated with vitellogenesis, no significant differences in triglyceride levels were detected in our study between sexes (57). Despite reproductive behavior including copulation was observed between adults, and females were laying fertile eggs throughout the year in all aquaria (except for Bioparc Gijón Aquarium), shark included in the study were not individually identified and thus it was not possible to determine which females were carrying eggs. Therefore, we were unable to evaluate differences between inactive and cycling females. Nursehound Shark had similar plasma triglyceride (median 0.97 mmol/l) and total cholesterol (2.05 mmol/l) levels compared to those previously reported in their close relative the Small-spotted Catshark (1.27 mmol/l and 2.85 mmol/l, respectively) and in other elasmobranchs under human care such as the Spotted Eagle Ray (0.89 mmol/l and 2.56 mmol/l, respectively) and were higher than those reported in free-ranging Grey Nurse Shark (0.30 mmol/l and 1.40 mmol/l, respectively) (12, 14, 31, 34, 58). The lowest triglyceride and cholesterol values observed in free-ranging elasmobranchs compared to those under human care could indicate a lower energy deficit in animals maintained un aquaria, which are regularly fed, suggesting that triglyceride levels could turn into a useful indicator for health assessments (14, 36, 59).

In our study, no significant differences were detected between animals sampled from the different aquaria for total cholesterol or triglycerides ($p > 0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted). Correlation coefficient between weight and triglyceride levels, as well as between triglyceride levels and total cholesterol levels was very low ($R^2 = 0.004$ and 0.005, respectively). Caution should be taken when interpreting cholesterol levels in fish, as this molecule is a precursor of steroidal hormones, an increased values have been reported after stressful stimuli such as aerial exposure or anesthesia for procedures over 5 min (60). The absence of significant variations in total cholesterol and triglyceride levels across the sampled aquaria would support the absence of significant differences in body condition within the studied individuals, as well as suggest that the sampling protocol developed in this study was consistent, reducing capture-related stress and its effects on analyte values. In this study, we were unable to evaluate possible differences in hematology and plasma chemistry linked to seasonal variations, as all animals were sampled during the same season (summer). Further studies sampling Nursehound Shark in different seasons and using individually identified animals, will allow for the classification of females according to their reproductive stage, and will help to better understand some of these variations in analytical values related to gestation in this species.

CONCLUSIONS

Hematology and plasma chemistry data provided in this study can be used as a valuable health assessment tool for nursehounds under human care. These results will contribute to the limited baseline data available for professionals working with catsharks and serve to increase our understanding of blood analytics for future *in situ* and *ex situ* studies of elasmobranchs.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat of Valencia (project reference ID OCE-22-19).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study design: PM-E and DG-P. Data acquisition: PM-E, CR-S, TA-A, and MV-T. Data processing: PM-E and CS. Preparation of the manuscript: PM-E. Revision of the manuscript: DG-P, CR-S, and TE. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

Funding for this study was provided by the Complutense University of Madrid Predoctoral Contract (PME; CT63/19-CT64/19) and the Fundación Oceanogràfic (Under the project reference number OCE-22-19).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the team of professionals working at Finisterrae Aquarium, Ac-uario de Gijón, Museo Marítimo del Cantábrico, Acuario de Sevilla and Oceanogràfic

Valencia for their great help provided to develop this study. A special thanks to Dr. Ames for the English grammar revision of this manuscript, to Zoetis Spain S.L.U and Abaxis Inc., for their technical support and for supplying part of the equipment needed for the completion of this study.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.909834/full#supplementary-material

REFERENCES

1. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, et al. Reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* (2012) 41:441–53. doi: 10.1111/vcp.12006
2. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol.* (2009) 38:288–98. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00179.x
3. Lumsden JH, Mullen K, McSherry BJ. Canine hematology and biochemistry reference values. *Can J Comp Med.* (1979) 43:125.
4. Lumsden JH, Rowe R, Mullen K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. *Can J Comp Med.* (1980) 44:32.
5. O'Brien M, Murphy MG, Lowe JA. Hematology and clinical chemistry parameters in the cat (*Felis domesticus*). *J Nutr.* (1998) 128:2678S—9S. doi: 10.1093/jn/128.12.2678S
6. Gräsbeck R, Fellman J. Normal values and statistics. *Scand J Clin Lab Invest.* (1968) 21:193–5. doi: 10.3109/00365516809076984
7. *Species360 Zoological Information Management System (ZIMS).* (2022). Available online at: https://www.species360.org/serving-conservation/citation-guidelines/ (accessed November 19, 2021).
8. Cain DK, Harms CA, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *J Zoo Wild Med.* (2004) 35:471–6. doi: 10.1638/03-107
9. Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg EH, Jeffery U, et al. ASVCP guidelines: principles of quality assurance and standards for veterinary clinical pathology (version 30): developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Vet Clin Pathol.* (2019) 48:542–618. doi: 10.1111/vcp.12810
10. Walsh CJ, Luer CA. Elasmobranch hematology: identification of cell types and practical applications. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. *Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives*. Ohio: Ohio Biological Survey (2004). p. 307–323.
11. Smale MJ, Jones RT, Correira JP, Henningsen AD, Crow GL, Garner R. Research on elasmobranchs in public aquariums. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives.* Columbus: Ohio Biological Survey (2004). p. 533–541.
12. Otway NM. Serum biochemical reference intervals for free-living sand tiger sharks (*Carcharias taurus*) from east Australian waters. *Vet Clin Pathol.* (2015) 44:262–74. doi: 10.1111/vcp.12254
13. Arnold J. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. *Vet Clin Pathol.* (2005) 34:115–23. doi: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00023.x
14. Grant KR, Campbell TW, Grant K. Hematology and plasma biochemistry value differences between acclimated and recently captive female southern stingrays (*Dasyatis americana*). *JZAR.* (2020) 8:59–66. doi: 10.19227/jzar.v8i1.254
15. Haman KH, Norton TM, Thomas AC, Dove ADM, Tseng F. Baseline health parameters and species comparisons among free-ranging Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae*), bonnethead (*Sphyrna tiburo*), and spiny dogfish (*Squalus acanthias*) sharks in Georgia, Florida, and Washington, USA. *J Wild Dis.* (2012) 48:295–306. doi: 10.7589/0090-3558-48.2.295
16. Harms C, Ross T, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. *Vet Clin Pathol.* (2002) 31:111–5. doi: 10.1111/j.1939-165X.2002.tb00289.x
17. Ebert DA, Dando M. *Field Guide to Sharks, Rays & Chimaeras of Europe and the Mediterranean*. Plymouth: Wild Nature Press (2021). p. 306–309.
18. Finucci B, Derrick D, Pacoureau N. *Scyliorhinus stellaris* (*Nursehound*). *The IUCN Red List of Threatened Species 2021.* (2021). doi: 10.2305/IUCN.UK.2021-2.RLTS.T161484A124493465.en (accessed March 22, 2022).
19. Koob TJ. Elasmobranchs in the public aquarium: 1860 to 1930. In: Smith MD, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. *The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives.* Columbus: Ohio Biological Survey (2004). p. 1–15.
20. García-Salinas P, Gallego V, Asturiano JF. Reproductive anatomy of chondrichthyans: notes on specimen handling and sperm extraction. II Sharks and Chimaeras. *Animals.* (2021) 11:2191. doi: 10.3390/ani11082191
21. Kajimura M, Walsh PJ, Mommsen TP, Wood CM. The dogfish shark (*Squalus acanthias*) increases both hepatic and extrahepatic ornithine urea cycle enzyme activities for nitrogen conservation after feeding. *Physiol Biochem Zool.* (2015) 79:602–13. doi: 10.1086/501060
22. Scarponi V, Gennari E, Hughes W. Physiological response to capture stress in endemic Southern African catsharks (family *Scyliorhinidae*). *J Fish Biol.* (2021) 99:186–96. doi: 10.1111/jfb.14710
23. Lawrence MJ, Raby GD, Teffer AK, Jeffries KM, Danylchuk AJ, Eliason EJ, et al. Best practices for non-lethal blood sampling of fish *via* the caudal vasculature. *J Fish Biol.* (2020) 97:4–15. doi: 10.1111/jfb.14339
24. Morrow W. Pulsford A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula L*) by electron microscopy. *J Fish Biol.* (1980) 17:461–75. doi: 10.1111/j.1095-8649.1980.tb02779.x
25. Dixon WJ. Processing data for outliers. *Biometrics.* (1953) 9:74–89. doi: 10.2307/3001634
26. le Boedec K. Sensitivity and specificity of normality tests and consequences on reference interval accuracy at small sample size: a computer-simulation study. *Vet Clin Pathol.* (2016) 45:648–656. doi: 10.1111/vcp.12390
27. Johnson M, st. Aubin D. *Tissue Distribution and Serum Levels of Selected Enzymes in Five Species of Sharks: Sphyrna lewini, Prionace glauca, Carcharhinus taurus, C. plumbeus* and *Isurus oxyrinchus. IAAAM Proceedings.* (2015). Available online at: https://www.vin.com/doc/?id=6696240 (accessed January 5, 2022).
28. Garner MM. A retrospective study of disease in elasmobranchs. *Vet Pathol.* (2013) 50:377–89. doi: 10.1177/0300985813482147
29. Parkinson LA, Alexander AB, Campbell TW. Variability in hematology of white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*) in different living environments. *Zoo Biol.* (2017) 36:284–8. doi: 10.1002/zoo.21371
30. Persky ME, Jason Williams J, Burks RE, Bowman MR, Ramer JC, Proudfoot JS. Hematologic, plasma biochemistry, and select nutrient values in captive smooth dogfish (*Mustelus canis*). *J Zoo Wildl Med.* (2012) 43:842–51. doi: 10.1638/2012-0002R1.1
31. Greene W, Brookshire G, Delaune AJ. Hematologic and biochemical summary statistics in aquarium-housed spotted eagle rays (*Aetobatus narinari*). *J Zoo Wild Med.* (2018) 49:912–24. doi: 10.1638/2017-0203.1
32. Graham MS, Turner JD, Wood CM. Control of ventilation in the hypercapnic skate *Raja ocellata*: I. Blood and extradural fluid. *Resp Physiol.* (1990) 80:259–77. doi: 10.1016/0034-5687(90)90088-G
33. Brill R, Bushnell P, Schroff S, Seifert R, Galvin M. Effects of anaerobic exercise accompanying catch-and-release fishing on blood-oxygen affinity of the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*, Nardo). *J Exp Mar Biol Ecol.* (2008) 354:132–43. doi: 10.1016/j.jembe.2007.10.011
34. Ferreira CM, Field CL, Tuttle AD. Hematological and plasma biochemical parameters of aquarium-maintained cownose rays. *J Aquat Anim Health.* (2010) 22:123–8. doi: 10.1577/H09-048.1
35. Arnold JE, Delaune A. Schalm's veterinary hematology. In: Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*, Seventh Edition. Hoboken, NJ: Wiley (2022). p. 1166–1175.

36. Cusack L, Field CL, Hoopes L, McDermott A, Clauss T. Comparison of pre- and postquarantine blood chemistry and hematology values from wild-caught cownose rays (*Rhinoptera bonasus*). *J Zoo Wild Med.* (2016) 47:493–500. doi: 10.1638/2015-0267.1
37. Dove A, Arnold J, Clauss T. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark Rhincodon typus. *Aquat Biol.* (2010) 9:177–183. doi: 10.3354/ab00252
38. Stokes EE, Firkin BG. Studies of the peripheral blood of the port jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. *Br J Haematol.* (1971) 20:427–35. doi: 10.1111/j.1365-2141.1971.tb07054.x
39. Pica A, Lodato A, Grimaldi MC, della Corte F. Morphology, origin and functions of the thrombocytes of Elasmobranchs. *Ach Ital Anat Embriol.* (1990) 95:187–207.
40. Hyder SL, Cayer ML, Pettey CL. Cell types in peripheral blood of the nurse shark: an approach to structure and function. *Tissue Cell.* (1983) 15:437–55. doi: 10.1016/0040-8166(83)90075-7
41. Wells RMG, McIntyre RH, Morgan AK, Davie PS. Physiological stress responses in big gamefish after capture: Observations on plasma chemistry and blood factors. *Compa Biochem Physiol A Physiol.* (1986) 84:565–71. doi: 10.1016/0300-9629(86)90366-X
42. Manire C, Hueter R, Hull E, Spieler R. Serological changes associated with gill-net capture and restraint in three species of sharks. *Trans Am Fish Soc.* (2001) 130:1038–48. doi: 10.1577/1548-8659(2001)130<1038:SCAWGN>2.0.CO;2
43. Viñuela J, Ferrer M, Recio F. Age-related variations in plasma levels of alkaline phosphatase, calcium and inorganic phosphorus in chicks of two species of raptors. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* (1991) 99:49–54. doi: 10.1016/0300-9629(91)90233-3
44. Wosnick N, Chaves AP, Niella YV, Takatsuka V, Hazin FHV, Nunes JLS, et al. Physiological impairment as a result of bile accumulation in an apex predator, the tiger shark (*Galeocerdo cuvier Péron* & Lesueur, 1822). *Animals.* (2020) 10:2030. doi: 10.3390/ani10112030
45. Omelon S, Georgiou J, Variola F, Dean MN. Colocation and role of polyphosphates and alkaline phosphatase in apatite biomineralization of elasmobranch tesserae. *Acta Biomater.* (2014) 10:3899–910. doi: 10.1016/j.actbio.2014.06.008
46. Norman AW, Mircheff AK, Adams TH, Spielvogel A. Studies on the mechanism of action of calciferol III. Vitamin D-mediated increase of intestinal brush border alkaline phosphatase activity. *Biochim Biophys Acta.* (1970) 215:348–59. doi: 10.1016/0304-4165(70)90034-6
47. Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Age-related changes on serum ggt activity and the assessment of ethanol intake. *Alcohol Alcohol.* (2006) 41:522–7. doi: 10.1093/alcalc/agl052
48. Renshaw GMC, Kutek AK, Grant GD, Anoopkumar-Dukie S. Forecasting elasmobranch survival following exposure to severe stressors. *Comp Biocehm Physiol A Mol Integr Physiol.* (2012) 162:101–12. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.08.001
49. Cliff G, Thurman GD. Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* (1984) 78:167–73. doi: 10.1016/0300-9629(84)90111-7
50. Ruiz-Jarabo I, Paullada-Salmerón JA, Jerez-Cepa I, Neto JBG, Bystriansky JS, Mancera JM. Acute Stress in lesser-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) promotes amino acid catabolism and osmoregulatory imbalances. *Animals.* (2022) 12:1192. doi: 10.3390/ani12091192
51. Brooks EJ, Sloman KA, Liss S, Hassan-Hassanein L, Danylchuk AJ, Cooke SJ, et al. The stress physiology of extended duration tonic immobility in the juvenile lemon shark, *Negaprion brevirostris* (Poey 1868). *J Exp Mar Biol.* (2011) 409:351–60. doi: 10.1016/j.jembe.2011.09.017
52. Turchiano M, Nguyen C, Fierman A, Lifshitz M, Convit A. Impact of blood sample collection and processing methods on glucose levels in community outreach studies. *J Environ Public Health.* (2013) 2013:256151. doi: 10.1155/2013/256151
53. Skomal GB, Mandelman JW. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: a review with a focus on the secondary response. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* (2012) 162:146–55. doi: 10.1016/j.cbpa.2011.10.002
54. Speers-Roesch B, Treberg JR. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* (2010) 155:417–34. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.09.031
55. Wood C, Bucking C, Fitzpatrick J, Nadella S. The alkaline tide goes out and the nitrogen stays in after feeding in the dogfish shark, *Squalus acanthias*. *Resp Physiol Neurobiol.* (2007) 159:163–170. doi: 10.1016/j.resp.2007.06.008
56. Wood C, Part P, Wright PA. Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). *J Exp Biol.* (1995) 198:1545–1558. doi: 10.1242/jeb.198.7.1545
57. Garcia-Garrido L, Muñoz-Chapuli R, de Andres A. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. *J Fish Biol.* (1990) 36:499–509.doi: 10.1111/j.1095-8649.1990.tb03552.x
58. Valls E, Navarro J, Barría C, Coll M, Fernández-Borràs J, Rotllant G. Seasonal, ontogenetic and sexual changes in lipid metabolism of the small-spotted catshark (Scyliorhinus canicula) in deep-sea free-living conditions. *J Exp Marine Biol Ecol.* (2016) 483:59–63. doi: 10.1016/j.jembe.2016.07.001
59. Gallagher AJ, Wagner DN, Irschick DJ, Hammerschlag N. Body condition predicts energy stores in apex predatory sharks. *Conserv Physiol.* (2014) 2:cou022. doi: 10.1093/conphys/cou022
60. Bolasina SN. Cortisol and hematological response in Brazilian codling, *Urophycis brasiliensis* (Pisces, Phycidae) subjected to anesthetic treatment. *Aquacult Int.* (2006) 14:569–575. doi: 10.1007/s10499-006-9055-0

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Morón-Elorza, Rojo-Solis, Steyrer, Álvaro-Álvarez, Valls-Torres, Encinas and García-Párraga. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Artículo 7. Increasing the Data on Elasmobranch Plasma Protein Capillary Zone Electrophoresis: Electrophoretogram Description and Reference Values in the Undulate Skate (*Raja undulata*) and the Nursehound Shark (*Scyliorhinus stellaris*) Maintained Under Human Care.

- **Revista:** BMC Veterinary Research
- **Impacto:** Q1 II=0.61 SJR Vet Sci 2021; Q1 II=2.792 JCR Vet Sci 2021
- **Autores:** Pablo Morón Elorza, Carlos Rojo Solís, Christine Steyrer, Teresa Álvaro Álvarez, Mónica Valls Torres, Javier Ortega, Teresa Encinas y Daniel García Párraga.
- **Metodología:**
  - **Tipo de estudio:** estudio prospectivo.
  - **Animales empleados:** 48 ejemplares de raya mosaico (*Raja undulata*) clínicamente sanos, mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia, y 62 ejemplares de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) clínicamente sanos, mantenidos en: Oceanogràfic de Valencia, Aquarium Finisterrae, Bioparc Gijón Acuario, Museo Marítimo del Cantábrico, Acuario de Sevilla.
  - **Parámetros explorados:** este estudio describe los valores de electroforesis de proteínas plasmáticas de dos especies de elasmobranquio, determina intervalos de referencia, y realiza una comparación entre tiburones y rayas.

Resultados: Este estudio es el primero en analizar los electroforetogramas de proteínas plasmáticas utilizando electroforesis de zona capilar en elasmobranquios, y el primero en definir valores de referencia para el tiburón alitán y la raya mosaico. Los electroforetogramas de la raya mosaico mostraron siete fracciones consistentes y que se repitieron en todos los animales, mientras que los del tiburón alitán presentaron nueve fracciones. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, etapas de desarrollo, ni entre subgrupos en la raya mosaico. En el tiburón alitán, el porcentaje de la fracción 5 resultó significativamente mayor en animales juveniles en comparación con los adultos, mientras que la concentración y el porcentaje de la fracción 6 resultó significativamente mayor en adultos. El porcentaje correspondiente a la fracción 4 fue significativamente superior en machos respecto a hembras. No se detectó migración de proteínas en la región correspondiente a la albúmina en ninguna de las dos especies, y se detectaron diferencias interespecíficas estadísticamente significativas para los porcentajes y concentraciones de todas las fracciones del electroforetograma entre las dos especies estudiadas.

Morón-Elorza *et al. BMC Veterinary Research* (2022) 18:380
https://doi.org/10.1186/s12917-022-03478-z

BMC Veterinary Research

RESEARCH Open Access

Increasing the data on elasmobranch plasma protein electrophoresis: electrophoretogram reference values determination in the undulate skate (Raja Undulata) and the nursehound shark (Scyliorhinus stellaris) maintained under human care

Pablo Morón-Elorza[1,2*], Carlos Rojo-Solís[3], Christine Steyrer[4], Teresa Álvaro-Álvarez[3], Mónica Valls-Torres[3], Javier Ortega[5,6], Teresa Encinas[1] and Daniel García-Párraga[2]

Abstract

Background This study determined plasma protein electrophoresis (PPE) reference intervals in two elasmobranch species: the undulate skate (*Raja undulata*) and the nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*), using a reference population of 48 undulate skates (27 males, 21 females) and 62 nursehounds (32 males, 30 females), considered to be clinically healthy. Plasma samples were analyzed using capillary zone electrophoresis (CZE).

Results The undulate skate electrophoretogram resembled those previously reported in other batoids and could be divided into seven consistent fractions. No statistically significant differences were detected between sexes and developmental stages. The nursehound electrophoretogram was similar to that previously described in other shark species and could be divided into eight consistent fractions. Fraction 5% was significantly higher in juvenile nursehounds when compared to adults, while fraction 6 concentration and percentage were significantly higher in adults. Fraction 4% was higher in males than in females. Albumin band was not detected, and pre-albumin was negligible in both studied species. Alpha-globulins were predominant in the undulate skate, while beta-globulins were predominant in nursehounds. Statistically significant differences were found in all electrophoretogram fraction percentages and concentrations between the two species.

Conclusion To the authors knowledge, this is the first study reporting PPE values in undulate skates and nursehounds, and the first study using CZE in elasmobranch plasma. These findings can serve as a primary reference for health monitoring in both species and will add to the limited data available on PPE in elasmobranchs.

*Correspondence:
Pablo Morón-Elorza
p-moron@hotmail.com

Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords Plasma, electrophoretogram, Chondrichthyan, Capillary zone electrophoresis, Catshark, Globulin, Aquarium research, Sebia

Background

Rising standards and expectations for high-quality aquatic animal husbandry and veterinary medical care have required more professionals to become involved in the husbandry and clinical management of elasmobranchs [1]. This has induced an improvement in veterinary standards for sharks, rays, skates, and sawfish, supported by the advancement in modern veterinary medicine and technology, which increased our capacity to understand and monitor elasmobranch health [2, 3]. Preventive health management programs are increasingly being implemented in elasmobranchs maintained in public aquaria, and population health studies in free-ranging elasmobranch populations are also being progressively performed [4–8]. As part of these programs, routine examinations including detailed physical exams and blood analyses are rising in importance [4]. Although studies determining baseline reference intervals for common hematology and plasma biochemistry analytes are increasing both in free-ranging and aquarium-maintained elasmobranchs, baseline plasma protein electrophoresis (PPE) values have only been determined in very few elasmobranch species [3–5, 9]. In addition, due to the challenges associated to working with sharks and rays, previous studies determining PPE reference intervals (RI) in these species were limited by relatively low sample sizes (frequently under 30–40 individuals). These previous studies reported high interspecific variability however, thus illuminating the need for further studies to accurately evaluate variations in electrophoretogram fractions [3, 4, 9].

If possible, PPE analysis should be included in the routine health evaluation of elasmobranchs, as disease diagnosis in this group of animals can be challenging and the clinical application of PPE for health evaluation and disease diagnosis is useful, not only in mammal and avian species, but also in elasmobranchs [3, 9–11]. Variations in plasma protein values can indicate a subclinical disease before the animal shows clinical symptoms [4]. Moreover, together with the serum protein changes that can be seen in plasma chemistry analysis, PPE has been shown to be a beneficial testing method as it can be used to evaluate variations in plasma protein trends without the need for species-specific reagents and can more accurately quantitate lipoproteins, providing valuable information for assessing ongoing inflammatory processes [11, 12].

Due to the currently limited information on PPE in elasmobranchs, the goal of our study was to describe and determine RI for plasma protein electrophoretograms in two elasmobranch species frequently maintained under human care in Europe: the undulate skate (*Raja undulata*) and the nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*). Both species are medium-sized, oviparous, and benthic, with a similar geographical distribution (Northeast Atlantic continental shelf and the Mediterranean Sea) [13, 14]. Despite both species are frequently maintained in European aquaria due to their easy husbandry and handling compared to other elasmobranch species, studies involving these species are still relatively limited. To our knowledge, baseline PPE reference values have not yet been published for any skate and Scyliorhinid shark species. This study aimed to evaluate interspecific differences, as well as intraspecific differences in electrophoretogram values which could be related to differences in sex and developmental stage.

Methods

Animals

This study used heparinized blood plasma samples obtained during group veterinary health exams performed in 49 undulate skates (28 males and 21 females, 41 subadults and 8 adults) maintained at Oceanogràfic Aquarium of Valencia (Carrer d'Eduardo Primo Yúfera, 1B, Valencia 46,013, Spain; www.oceanografic.org) as well as 64 nursehounds (32 males and 32 females, 23 subadults and 41 adults) maintained in five different Spanish aquaria: Oceanogràfic Aquarium of Valencia, Finisterrae Aquarium (P.º Marítimo Alcalde Francisco Vázquez, 34, A Coruña 15,002, Spain; www.coruna.gal/mc2/es/aquarium-finisterrae), Bioparc Gijón Aquarium (Playa De Poniente, S/N, Gijón 33,212, Spain; www.acuariogijon.es); Museo Marítimo del Cantábrico (Av. de Severiano Ballesteros, s/n, Santander 39,004, Spain; www.museosdecantabria.es/museo-maritimo), and Sevilla Aquarium (Muelle de las Delicias, s/n, Sevilla 41,012, Spain; www.acuariosevilla.es). Sharks and skates were classified as subadults or adults based on size, using previously published adult size ranges, and sex was determined based on the presence/absence of claspers [15–17]. Sample collection during veterinary evaluations in undulate skate and nursehound populations for the purpose of this study was approved by the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat Valenciana under the project reference OCE-22-19.

Environmental conditions

All sampled animals were maintained in tanks equipped with life support systems which included sand filters, protein fractionator, de-gas tower, biological filtration, ultra-violet (UV) and/or ozone disinfection. Tanks were

supplied with natural sea water collected from coastal waters of the Mediterranean Sea in Oceanogràfic Aquarium and from the Atlantic Ocean in the rest of aquaria, previously processed via sand filters and/or UV disinfection. Water temperature ranged from 17 to 19 °C; salinity was kept between 34.5 and 37 g/l; pH ranged from 7.8 to 8.1; redox was maintained between 200 and 350 mV; ammonia, nitrite, and nitrate were kept below 0.01, 0.05, and 100 ppm, respectively. Ambient air temperature ranged from 16 to 24 °C. All sharks were sampled during summer (August 2021) and all skates were sampled during winter (February 2021). Animals were fed once daily, four to six days per week, and their diet consisted of thawed pieces of hake (*Merluccius spp.*), squid (*Loligo spp.*), prawn (*Penaus spp.*), herring (*Clupea spp.*), mackerel (*Scomber spp.*), and mussel (*Mytilus spp.*).

Sample collection and processing

For blood collection, sharks and skates were captured using a rubber net, carefully handled, and placed in a dorsal decubitus to induce tonic immobility [18]. A volume of one ml peripheral blood was collected for routine veterinary clinical examination via venipuncture of the caudal hemal arch, using a 23- to 25-gauge needle attached to a 1–2 ml syringe [19, 20]. A ventral approach of the hemal arch was used in skates and a lateral approach was used in nursehounds while animals were manually restrained in water, with their head and gills submerged while the caudal third was brought outside of the water during sampling to avoid salt water contamination of the samples After blood collection, animals were weighed using a crane scale (GRAM CR 150-S, Gram Pre-cision S.L., l'Hospitalet de Llobregat 08907, Spain) and measures were taken for total length (snout to tip of the tail; TL, in cm) using a flexible nylon tape measure.

Blood samples were immediately placed in lithium heparin tubes (AQUISEL® 1 ml 12×55 mm REF: 1,501,406) and maintained at 4 °C until centrifugation. Heparin tubes were centrifuged within 60 min from collection at a centrifugation speed of 448 g (2000 rpm) for 6 min at room temperature (24 °C) using a portable centrifuge (Digital angle centrifuge 2615/1 Nahita-Blue, 100 mm rotor radius; LABOQUIMIA, Lardero 26,140, Spain). Plasma was collected using a micropipette and transferred to 1.5 ml Eppendorf tubes, which were frozen and stored at -18 °C until processing as previous studies have demonstrated that a single freeze-thaw cycle does not produce statistically significant changes in PPE fractions [21]. Shark and skate plasma samples were thawed and processed for protein capillary zone electrophoresis (CZE) analysis within two months from blood collection using a Microcapillary Minicap Protein 6 Flex-Piercing (Sebia® Ref. 1232 v.7.48, Sebia Hispania S.A., Barcelona 008028, Spain). Before introducing the samples for electrophoresis analysis, a 1:40 ratio dilution (10 µl plasma to 390 µl Buffer) was performed using Capillarys Urine Dialysis Buffer (Sebia® Ref. 2013, Sebia Hispania S.A., BarCelona 08028, Spain) following indications provided by the team of Sebia Hispania S.A., which was also previously diluted at 50:50 ratio using distilled water following manufacturer recommendations. Absolute fraction values (g/l) were determined by multiplying the percentages for each fraction by total protein concentrations measured using a Beckman Coulter® Chemistry Analyzer (A91961-AU480 Chemistry Analyzer, Beckman Coulter S.L.U., Alcobendas 28,108, Spain). The coefficient of variation (CV) was always under 8% or all fractions studied in each one of the studied species. Samples were selected to form part of the RI after the detailed evaluation of every animal's medical history and the completion of physical examinations (which included a hematological and biochemical analysis) to evaluate the condition of each individual sampled. For this study, we divided the electrophoretogram into several fractions following the guidelines established in previous studies with elasmobranchs, which already defined five different fractions in ray and shark species [3, 4, 9, 22, 23]. Caution was taken to delete the injection peak and the end delimiter produced by the urine buffer before electrophoretogram interpretation and division into fractions for its analysis. As done in previous PPE studies with elasmobranchs, and in the absence of studies defining which proteins correspond to each electrophoretogram fraction, the classification of the different fractions as pre-albumin, alpha-, beta-, and gamma-globulins, was made based on their similarity in migration properties with respect to other taxa [11]. The further division of protein fractions migrating in the alpha- and beta-globulin regions into several subfractions was possible as the different peaks in the curve were consistent and reproducible among all the individuals sampled. Any abnormality in an animal's medical history, as well as in the thorough external examination and bloodwork, excluded the affected individual from the reference population. All sharks and skates were fasted for a minimum period of 24 h before sampling to avoid possible imbalances in PPE results [24].

Statistical analyses

Reference intervals were determined using the RefVal adv. 2.0 Excel add in and the MedCalc® statistical software [25]. Following the recommended guidelines published by the American Society of Veterinary Clinical Pathology, Dixon's outlier range statistics and Tukey tests were used for the identification of outliers [26, 27]. If an outlier was detected in one electrophoretogram fraction, the entire data set from that animal was eliminated as all fraction percentages would be affected. Statistical analyses were then rerun for all samples. Total protein

and plasma protein fractions were analysed for normality. Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests with Lilliefors corrections were used to determine Gaussian distribution. We established a p-value of 0.20 as a cut off value for Shapiro Wilk and a p-value of 0.26 as a cut off value for Kolmogorov-Smirnov tests instead of 0.05, following the previously established recommendations for RI determination using small sample sizes [28]. Non-parametric 90% confidence intervals (CI) were calculated using a bootstrap method. To evaluate differences between sexes (male vs. female) and developmental stage (adult vs. subadult) a non-parametric (Mann-Whitney U test) was used for non-normally distributed data, and a parametric test (Student's t-test) was used for data with a normal distribution. Furthermore, differences between subgroups (adult female vs. adult male vs. subadult female vs. subadult male) were evaluated using a Kruskal-Wallis test and Dunn's post hoc tests with Bonferroni corrections (for non-normally distributed data) or an ANOVA (for data showing a normal distribution); significance for these tests was set at $p<0.05$. Statistical comparison between sexes in adult skates and comparison involving unhealthy individuals was not possible due to the small sample size. For interspecific comparison, due to the different number of consistent electrophoretogram fractions observed in undulate skates (seven fractions) and nursehounds (eight fractions), electrophoretograms were divided for both species into: pre-albumin, alpha-, beta-, and gamma-globulin fractions, wherein total alpha- and beta-globulin fractions were calculated as the sum of the corresponding alpha- and beta-sub-fractions. Once total alpha- and beta-globulin fractions were calculated, interspecific statistical comparison was performed using a Mann-Whitney U test. Alpha-2-/Beta-globulin ratio was calculated in undulate skate by dividing fraction 3 by the sum of the fractions 4, 5, and 6; and in nursehound sharks by dividing the sum of fractions 3 and 4 by the sum of fractions 5, 6, and 7. Statistical comparison for this ratio between species was performed using a Mann-Whitney U test. The statistical software package RStudio® (Version 1.2.504; Rstudio Team, 2020. Boston 02210, USA; ww.rstudio.com) and SPSS Statistics 25.9 (IBM Corp New York, USA; www.ibm.com) were used for statistical analyses.

Results

Two adult female nursehounds were excluded from the study during the preliminary physical examination due to the presence of conspecific bite wounds. One adult male undulate skate was also excluded during the physical examination due to the presence of a laceration in the oral cavity which affected the lower jaw and evident alterations in hematological and plasma chemical values. Two juvenile skates which were apparently healthy upon physical examination, presented outliers in their electrophoretograms and were eliminated from the reference population. The remaining 62 sharks (32 males and 30 females, 23 subadults and 39 adults) and 48 skates (27 males and 21 females, 41 subadults and 7 adults) were considered clinically healthy, and their plasma samples were analyzed for RI determination. All animals showed a fast recovery after sampling and no clinical signs were detected in any of the animals one month after sampling. Median (min-max range) body weight was 2.43 (0.7–7.4) kg in nursehounds and 1.3 (0.1–4.8) kg in undulate skates. Median (range) total length was 76.0 (51.0-113.0) cm in nursehounds and 51.3 (31.5–81.0) cm in skates.

The undulate skate electrophoretogram resembled those previously reported in other batoids, such as the cownose ray (*Rhinoptera bonasus*) and could be divided into seven consistent fractions (migrating in regions considered equivalent to pre-albumin, alpha-1, alpha-2, beta-1, beta-2, beta-3, and gamma globulins) [3]. Descriptive statistics for PPE parameters in the undulate skate are shown in Table 1. A comparison for electrophoretogram values in undulate skates between sexes is provided in Table 2, and a comparison between developmental stages is provided in Table 3. No statistically significant differences were detected between sexes (males vs. females), developmental stages (adults vs. subadults) ($p>0.05$; Mann-Whitney U test), nor between subgroups (adult female vs. subadult female vs. adult male vs. subadult male) ($p>0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted).

The nursehound electrophoretogram was similar to that previously described in other shark species and could be divided into eight consistent fractions (migrating in the regions and considered equivalent to pre-albumin, alpha-1, alpha-2.1, alpha-2.2, beta-1, beta-2, beta-3, beta-4, and gamma globulins). Descriptive statistics for PPE parameters in the nursehound are presented in Table 4. Fraction 5% was significantly higher in juvenile nursehounds (median 30.70%) when compared to adults (median 29.03%) ($p=0.038$; Mann-Whitney U test), while fraction 6 concentration and percentage was significantly higher in adults (3.55 g/l* and 14.32%) when compared to juveniles (2.87 g/l* and 10.91%) ($p<0.01$; Mann-Whitney U test or *Student's t-test). Fraction 8 concentration and percentage were also significantly higher in adult nursehounds (median 1.48 g/l and 6.38%) compared to juveniles (median 1.05 g/l and 4.65%) ($p<0.01$; Student's t-test). Statistically significant differences were also detected between sexes, as fraction 4% was higher in males (median 27.70%) than in females (median 26.85%) ($p=0.030$; Mann-Whitney U test), with no statistically significant differences between subgroups ($p>0.05$; Dunn's test, Bonferroni-adjusted). A comparison for electrophoretogram fraction values between

Table 1 Reference intervals for plasma protein electrophoresis fractions in the undulate skate (*Raja undulata*), using the Sebia Minicap Protein 6 Flex-Piercing.

Analyte (unit)	n	Mean	SD	Median	Min	Max	RI	LRL	URL	Distr	Method	P
TP (g/l)	48	29.33	3.19	29.00	22.00	36.00	22.23–35.78	22.00-24.45	34.78-36.00	G	P	0.254
Fraction 1 (%)	48	0.45	0.24	0.40	0.10	1.00	0.12–0.98	0.10–0.20	0.90-1.00	NG	NP	< 0.01
Fraction 2 (%)	48	12.98	5.10	12.75	4.40	24.20	4.47–23.93	4.40–5.14	20.74–24.20	G	P	0.423
Fraction 3 (%)	48	42.65	3.17	43.15	36.10	48.90	36.21–48.68	36.10-36.97	46.70–48.90	G	P	0.408
Fraction 4 (%)	48	33.36	3.78	32.40	24.30	42.30	24.84–42.05	24.30–28.40	38.90–42.30	G	P	0.879
Fraction 5 (%)	48	4.84	1.54	4.60	2.30	8.40	2.30–8.40	2.30–2.86	7.83–8.40	NG	NP	< 0.01
Fraction 6 (%)	48	3.88	1.54	3.50	1.40	8.30	1.51–8.17	1.40-2.00	7.03–8.30	NG	NP	0.031
Fraction 7 (%)	48	1.83	0.55	1.95	0.80	3.10	0.82–3.10	0.80–0.92	2.50–3.10	G	P	0.222
Fraction 1 (g/l)	48	0.13	0.07	0.11	0.03	0.32	0.04–0.31	0.03–0.05	0.26–0.32	NG	NP	< 0.01
Fraction 2 (g/l)	48	3.77	1.47	3.70	1.20	7.99	1.28–7.59	1.20–1.64	5.83–7.99	G	P	0.358
Fraction 3 (g/l)	48	12.54	1.92	12.30	8.62	17.24	8.92–16.99	8.62–10.04	16.02–17.24	NG	NP	0.149
Fraction 4 (g/l)	48	9.80	1.68	9.61	5.83	14.81	6.13–14.58	5.83–7.90	12.95–14.81	NG	NP	0.011
Fraction 5 (g/l)	48	1.40	0.43	1.30	0.69	2.44	0.72–2.44	0.69–0.87	2.32–2.44	NG	NP	< 0.01
Fraction 6 (g/l)	48	1.14	0.49	1.00	0.39	2.74	0.43–2.68	0.39–0.62	1.95–2.74	NG	NP	< 0.01
Fraction 7 (g/l)	48	0.54	0.18	0.55	0.22	0.90	0.23–0.90	0.22–0.26	0.85–0.90	NG	NP	0.199
Alpha-2-/Beta-globulin ratio	48	1.03	0.12	1–01	0.82	1.33	0.82–1.32	0.82–0.88	1.24-1.33	NG	NP	0.173

n, number of individuals; SD, standard deviation; RI, reference intervals; LRL, 90% confidence interval of the lower reference limit; URL, 90% confidence interval of the upper reference limit (90% confidence intervals of the limits determined nonparametrically used a bootstrap method); Distr, distribution; P, *p*-value calculated using Saphiro-Wilk test (cut off value was set at 0.20); G, Gaussian; NG, non-Gaussian; P, parametric; NP, non-parametric TP, total proteins in plasma

Table 2 Plasma protein electrophoresis comparison between female and male undulate skates (*Raja undulata*) maintained under human care. No statistically significant differences were detected between sexes (p > 0.05; Mann-Whitney U test or *Student's t-test)

	Undulate skate (*Raja undulata*)										
	Female (n = 21)					**Male (n = 27)**					
Analyte (unit)	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**P**
TP (g/l)	29.62	3.37	30.00	22.00	35.00	29.11	3.09	28.00	24.00	36.00	0.589*
Fraction 1 (%)	0.49	0.23	0.40	0.20	0.90	0.43	0.24	0.40	0.10	1.00	0.461
Fraction 2 (%)	12.63	4.70	11.40	5.20	21.30	13.61	5.34	13.40	4.40	24.20	0.338*
Fraction 3 (%)	43.03	2.85	43.30	37.20	47.20	42.37	3.43	42.10	36.10	48.90	0.483*
Fraction 4 (%)	32.80	3.43	32.10	26.70	38.90	33.65	4.04	33.70	24.30	42.30	0.550*
Fraction 5 (%)	4.97	1.76	4.60	2.30	8.40	4.53	1.21	4.50	2.30	7.60	0.228
Fraction 6 (%)	4.30	1.57	3.90	2.10	8.30	3.57	1.46	3.40	1.40	7.30	0.100
Fraction 7 (%)	1.79	0.43	1.90	0.90	2.40	1.84	0.64	1.90	0.80	3.10	0.917*
Fraction 1 (g/l)	0.15	0.08	0.13	0.05	0.32	0.13	0.07	0.11	0.03	0.26	0.448
Fraction 2 (g/l)	3.71	1.35	3.58	1.64	5.88	0.39	1.55	3.75	1.20	0.80	0.435*
Fraction 3 (g/l)	12.79	2.01	12.90	8.62	16.07	1.35	1.87	11.89	9.94	17.24	0.313
Fraction 4 (g/l)	9.69	1.34	9.60	7.31	12.75	9.85	1.92	9.60	5.83	14.81	0.987
Fraction 5 (g/l)	1.45	0.49	1.34	0.69	2.44	1.31	0.33	1.23	0.81	2.13	0.101
Fraction 6 (g/l)	1.30	0.58	1.09	0.63	2.74	1.03	0.38	0.96	0.39	1.82	0.146
Fraction 7 (g/l)	0.53	0.15	0.58	0.24	0.72	0.54	0.20	0.53	0.22	0.90	0.519

n, number of individuals; SD, standard deviation; TP, total proteins in plasma

Table 3 Plasma protein electrophoresis comparison between adult and subadult undulate skates (*Raja undulata*) maintained under human care. No statistically significant differences were detected between sexes ($p > 0.05$; Mann-Whitney U test or *Student's t-test)

	Undulate skate (*Raja undulata*)										
	Adult (n = 7)					**Subadult (n = 41)**					
Analyte (unit)	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**P**
TP(g/l)	28.71	1.89	28.00	26.00	32.00	29.44	3.37	29.00	22.00	36.00	0.584*
Fraction 1 (%)	0.40	0.15	0.40	0.20	0.60	0.46	0.25	0.40	0.10	1.00	0.722
Fraction 2 (%)	12.16	2.64	11.20	9.20	17.20	13.12	5.42	12.8	4.40	24.2	0.649*
Fraction 3 (%)	41.97	3.13	42.80	36.10	44.80	42.77	3.21	43.20	36.60	48.9	0.544*
Fraction 4 (%)	33.40	2.77	33.90	28.90	36.10	33.35	3.96	32.30	24.30	42.3	0.974*
Fraction 5 (%)	5.53	1.50	6.20	3.50	7.60	4.72	1.53	4.60	2.30	8.40	0.219
Fraction 6 (%)	4.64	1.42	4.60	1.90	6.10	3.75	1.54	3.50	1.40	8.30	0.057
Fraction 7 (%)	1.90	0.80	2.10	0.90	3.10	1.82	0.50	1.90	0.80	3.10	0.731*
Fraction 1 (g/l)	0.12	0.05	0.11	0.05	0.19	0.14	0.08	0.12	0.03	0.30	0.650
Fraction 2 (g/l)	3.49	0.75	3.58	2.58	4.82	3.81	1.56	3.72	1.20	8.00	0.594*
Fraction 3 (g/l)	12.07	1.46	11.98	10.11	14.34	12.63	1.99	12.42	8.62	17.2	0.526
Fraction 4 (g/l)	9.57	0.76	9.75	8.09	10.44	9.84	1.80	9.60	5.83	14.8	0.988
Fraction 5 (g/l)	1.58	0.42	1.61	0.98	2.13	1.37	0.43	1.29	0.69	2.40	0.225
Fraction 6 (g/l)	1.34	0.44	1.29	0.55	1.95	1.11	0.50	0.95	0.39	2.70	0.082
Fraction 7 (g/l)	0.55	0.23	0.62	0.25	0.87	0.54	0.17	0.54	0.22	0.90	0.770

n, number of individuals; SD, standard deviation; TP, total proteins in plasma

sexes is provided in Table 5, and a comparison between developmental stages in provided in Table 6.

As previously reported in PPE studies with elasmobranchs, albumin band was not detected in undulate skates and in nursehounds, and proteins migrating in the pre-albumin region were negligible in both species [3, 9]. Alpha-globulins were predominant in the undulate skate, while beta-globulins were predominant in nursehounds. Gamma-globulin fraction was easily identified in both species, with values close to those previously reported in other elasmobranch species. Statistically significant differences were found in all electrophoretogram fraction percentages and concentrations between undulate skates and nursehounds ($p < 0.05$; Mann-Whitney U test). A representative PPE profile from a clinically healthy undulate skate and a clinically healthy nursehound is presented in Fig. 1. A comparison between the two studied elasmobranch species is provided in Table 7

Table 4 Reference intervals for plasma protein electrophoresis fractions in nursehounds (*Scyliorhinus stellaris*), using the Sebia Minicap Protein (E) 6 Flex-Piercing.

Analyte (unit)	n	Mean	SD	Median	Min	Max	RI	LRL	URL	Distr	Method	P
TP (g/l)	62	24.66	4.22	23.50	19.00	36.00	19.58–34.28	19.00–20.00	32.00–36.00	NG	NP	< 0.01
Fraction 1 (%)	62	0.74	0.35	0.64	0.21	1.50	0.30–1.49	0.22–0.31	1.43–1.50	NG	NP	< 0.01
Fraction 2 (%)	62	1.98	0.73	1.81	0.80	3.90	0.82–3.73	0.80–1.09	3.27–3.90	NG	NP	0.017
Fraction 3 (%)	62	9.99	1.88	10.15	5.60	14.50	6.19–13.79	5.51–6.85	13.13–14.53	NG	NP	0.200
Fraction 4 (%)	62	26.62	3.46	27.16	16.60	33.68	17.61–33.58	16.60–20.40	31.39–33.68	NG	NP	0.011
Fraction 5 (%)	62	28.79	3.86	29.72	19.80	34.99	19.97–34.80	19.80–22.68	34.04–34.99	NG	NP	< 0.01
Fraction 6 (%)	62	13.22	3.16	12.69	7.68	19.66	8.06–19.65	7.68–9.21	19.21–19.66	NG	NP	0.038
Fraction 7 (%)	62	13.25	4.32	12.97	5.56	24.80	5.56–24.05	5.56–6.87	21.44–24.80	NG	NP	0.200
Fraction 8 (%)	62	5.40	1.59	5.40	1.80	8.10	2.19–8.64	1.66–2.79	8.06–9.24	NG	NP	0.200
Fraction 1 (g/l)	62	0.18	0.09	0.17	0.04	0.42	0.05–0.40	0.05–0.07	0.32–0.42	NG	NP	0.071
Fraction 2 (g/l)	62	0.49	0.21	0.43	0.19	1.17	0.22–1.03	0.19–0.25	0.89–1.17	NG	NP	0.014
Fraction 3 (g/l)	62	2.46	0.63	2.23	1.13	4.06	1.19–3.74	0.96–1.41	3.50–3.99	NG	NP	0.200
Fraction 4 (g/l)	62	6.59	1.55	6.10	4.14	10.06	4.27–9.88	4.14–4.79	9.49–10.06	NG	NP	< 0.01
Fraction 5 (g/l)	62	7.12	1.68	6.77	4.67	11.09	4.67–10.94	4.67–4.86	10.19–11.09	NG	NP	0.037
Fraction 6 (g/l)	62	3.25	0.90	3.10	1.69	5.75	1.44–5.05	1.11–1.76	4.71–5.38	NG	NP	0.200
Fraction 7 (g/l)	62	3.22	1.07	3.09	1.22	6.82	1.31–6.32	1.22–1.85	5.05–6.82	NG	NP	0.200
Fraction 8 (g/l)	62	1.35	0.51	1.29	0.52	2.57	0.32–2.37	0.14–0.52	2.17–2.55	NG	NP	0.182
Alpha-2-/ Beta-globulin ratio	62	0.67	0.12	0.67	0.35	1.06	0.50–1.09	0.50–0.52	0.89–1.29	NG	NP	< 0.01

n, number of individuals; SD, standard deviation; RI, reference intervals; LRL, 90% confidence interval of the lower reference limit; URL, 90% confidence interval of the upper reference limit (90% confidence intervals of the limits determined nonparametrically used a bootstrap method); Distr, distribution; P, p-value determined using a Kolmogorov-Smirnov normality test with Lilliefors corrections (cut off value was set at 0.26); G, Gaussian; NG, non-Gaussian; P, parametric; NP, non-parametric TP, total proteins in plasma.

Table 6 Plasma protein electrophoresis comparison between adult and subadult nursehounds (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care. Bold font indicates statistically significant differences between sexes ($p < 0.05$; Mann-Whitney U test)

	Nursehound (*Scyliorhinus stellaris*)										
	Adult (n = 39)					**Juvenile (n = 23)**					
Analyte (unit)	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**P**
TP (g/l)	24.92	4.46	24.00	19.00	36.00	24.22	3.84	23.00	20.00	3.30	0.781
Fraction 1 (%)	0.70	0.34	0.62	0.22	1.49	0.81	0.37	0.74	0.31	1.50	0.294
Fraction 2 (%)	2.04	0.71	1.81	0.80	3.60	1.89	0.76	1.78	0.84	3.90	0.332
Fraction 3 (%)	9.71	1.90	10.15	5.60	14.00	10.47	1.81	10.15	6.77	14.50	0.182
Fraction 4 (%)	26.19	3.34	26.96	16.60	31.20	27.36	3.61	27.30	18.70	33.68	0.315
Fraction 5 (%)	**28.07**	**3.77**	**29.03**	**19.80**	**34.34**	**30.00**	**3.79**	**30.70**	**23.10**	**34.99**	**0.038**
Fraction 6 (%)	**14.32**	**2.91**	**14.38**	**9.60**	**19.66**	**11.37**	**2.70**	**10.91**	**7.68**	**19.20**	**< 0.01**
Fraction 7 (%)	13.12	5.00	13.49	5.56	24.80	13.46	2.94	12.61	9.97	22.30	0.754
Fraction 8 (%)	**5.85**	**1.54**	**6.28**	**1.80**	**8.10**	**4.64**	**1.41**	**4.65**	**2.30**	**7.70**	**< 0.01**
Fraction 1 (g/l)	0.18	0.09	0.17	0.05	0.36	0.20	0.09	0.18	0.07	0.43	0.461
Fraction 2 (g/l)	0.52	0.23	0.49	0.19	1.17	0.45	0.19	0.41	0.24	0.94	0.308
Fraction 3 (g/l)	2.43	0.67	2.31	1.34	4.06	2.53	0.57	2.57	1.69	3.98	0.493
Fraction 4 (g/l)	6.55	1.60	6.18	4.37	10.06	6.65	1.50	6.02	4.14	9.65	0.560
Fraction 5 (g/l)	7.01	1.66	6.66	4.67	10.33	7.32	1.74	6.97	4.86	11.09	0.450
Fraction 6 (g/l)	**3.55**	**0.91**	**3.40**	**1.92**	**5.75**	**2.72**	**0.59**	**2.87**	**1.69**	**4.03**	**< 0.01**
Fraction 7 (g/l)	3.21	1.25	2.99	1.22	6.82	3.23	0.67	3.14	2.19	4.46	0.475
Fraction 8 (g/l)	**1.48**	**0.53**	**1.57**	**0.52**	**2.57**	**1.12**	**0.39**	**1.05**	**0.55**	**2.00**	**< 0.01**

n, number of individuals; SD, standard deviation; TP, total proteins in plasma

Table 7 Plasma protein electrophoresis comparison between the undulate skate (Raja undulata) and the nursehound (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care. Distribution was non-Gaussian for all represented parameters ($p < 0.05$; Kolmogorov-Smirnov normality test). Statistically significant differences were detected between species for all the studied parameters ($p < 0.01$; Mann-Whitney U test)

	Undulate skate (*Raja undulata*) **(n = 48)**					**Nursehound** (*Scyliorhinus stellaris*) **(n = 62)**					
Analyte (unit)	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**Mean**	**SD**	**Median**	**Min**	**Max**	**P**
TP (g/l)	29.33	3.19	29.00	22.00	36.00	24.66	4.22	23.50	19.00	36.00	**< 0.01**
Pre-albumin (%)	0.44	0.24	0.40	0.10	1.00	0.74	0.35	0.64	0.22	1.50	**< 0.01**
Alpha-globulin (%)	55.85	3.79	56.40	46.90	61.90	38.60	4.31	38.59	25.20	51.90	**< 0.01**
Beta-globulin (%)	41.89	3.73	41.30	35.80	50.80	55.26	4.02	55.30	45.20	67.90	**< 0.01**
Gamma-globulin (%)	1.82	0.55	1.90	0.80	3.10	5.40	1.59	5.40	1.80	8.10	**< 0.01**
Pre-albumin (g/l)	0.13	0.07	0.11	0.03	0.32	0.18	0.09	0.17	0.05	0.43	**< 0.01**
Alpha-globulin (g/l)	16.37	2.02	16.16	11.77	20.27	9.55	2.12	8.91	6.60	14.67	**< 0.01**
Beta-globulin (g/l)	12.29	1.79	12.19	8.83	16.52	13.59	2.28	13.16	10.49	19.69	**< 0.01**
Gamma-globulin (g/l)	0.53	0.18	0.54	0.22	0.90	1.35	0.51	1.29	0.52	2.57	**< 0.01**

n, number of individuals; SD, standard deviation; TP, total proteins in plasma. Please note: Pre-albumin was considered fraction 1 in undulate skates and nursehounds. To allow interspecific comparison, alpha-globulin fraction was calculated as the sum of fractions 2 and 3 (equivalent to alpha-1 and alpha-2-globulins) in undulate skates, and fractions 2, 3 and 4 (equivalent to al-pha-1, alpha-2.1 and alpha-2.2 globulins) in nursehounds. Beta-globulin fraction was calculated as the sum of fractions 4, 5 and 6 (equivalent to beta-1, beta-2, and beta-3-globulins) in undulate skates, and fractions 5, 6 and 7 (equivalent to beta-1, beta-2, and beta-3-globulin fractions) in nursehounds. Gamma-globulin fraction represented fraction 7 in skates and fraction 8 in nursehounds.

Discussion

To the authors knowledge, this is the first study evaluating PPE in elasmobranchs using CZE. Previous studies with elasmobranchs used Agarose Gel Electrophoresis (AGE), which is still the most prevalent method used in veterinary settings. However, CZE, due to its higher accuracy and easiness of use through automatization, is increasingly replacing AGE as a research and diagnostic tool for PPE analysis in many species including marine animals [29]. CZE has proven to consistently resolve electrophoretogram protein fractions that are frequently not differentiated by using AGE [30]. Previous studies evaluating PPE in sharks and rays divided these species' electrophoretograms into five fractions equivalent to pre-albumin, albumin, alpha-, beta-, and gamma-globulins. Our study was able to classify the electrophoretograms into seven consistent fractions in the undulate skate and eight in the nursehound shark, which was consistent across all the animals sampled [3–5, 9, 31]. This division of the fractions into smaller ones was based on previous findings from cownose rays [3]. In this study, CZE allowed the classification of the proteins migrating

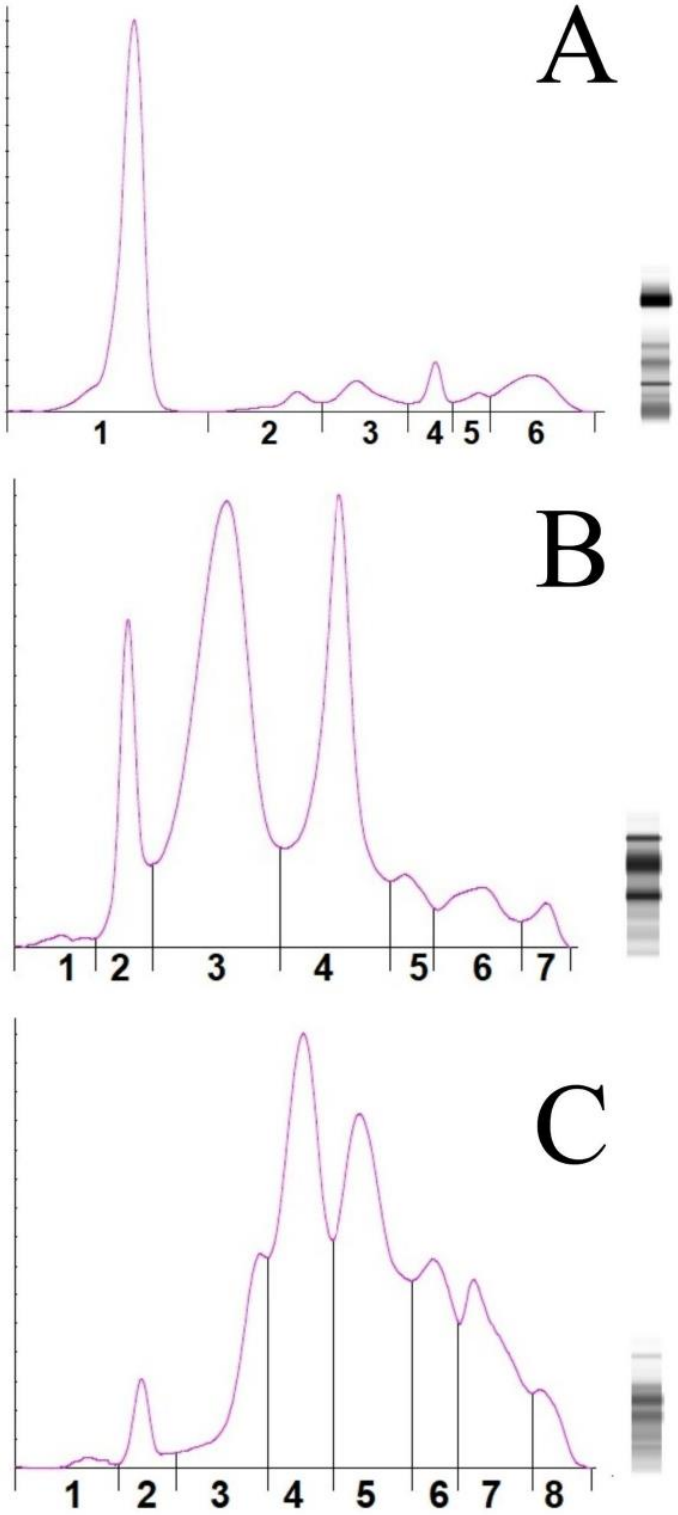


Fig. 1 (**A**) Representative plasma protein electrophoretogram of a human control. Six consistent fractions are identified. Fractions one to six are equivalent to albumin, alpha-1, alpha 2, beta-1, beta-2, and gamma globulins. (**B**) Representative plasma protein electrophoretogram of a clinically healthy undulate skate (*Raja undulata*). Seven consistent fractions are identified in the species. Fractions one to seven are equivalent to pre-albumin, alpha-1, alpha 2, beta-1, beta-2, beta-3, and gamma globulins. (**C**) Representative plasma protein electrophoretogram of a clinically healthy nursehound (*Scyliorhinus stellaris*). Eight consistent fractions are identified in the species. Fractions one to eight are equivalent to pre-albumin, alpha-1, alpha-2.1, alpha 2.2, beta-1, beta-2, beta-3, and gamma globulins. The bands on the right of each electrophoretogram correspond to a digital gel electrophoresis representation for plasma each sample.

in the alpha- and beta-globulin regions into several subfractions which were consistent throughout the sampled population of the study. Although further studies are warranted to completely understand the composition and clinical implications of the different sub-fractions, the possibility of dividing the electrophoretogram into several small consistent fractions will allow for more accurate interpretation of the variations occurring in the electrophoretogram [21, 29, 30].

In this study, significant interspecific variations were found for plasma total proteins between the two studied species: median 29.00 g/l in undulate skates and 23.50 g/l in nursehounds ($p<0.01$; Mann-Whitney U test). Significant variations in plasma total protein values have been previously described between different elasmobranch species, with median 23.00 g/l in the Atlantic sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*), 28.00 g/l in the bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*), and 21.00 g/l in the spiny dogfish (*Squalus acanthias*) [5].

Our PPE study revealed low quantities of proteins migrating in the pre-albumin region of the electrophoretogram for undulate skates (median 0.44% and 0.13 g/l) and nursehounds (median 0.64% and 0.17 g/l), which may contain high-density proteins as described in other elasmobranchs, and which we characterized as "Fraction 1" following the classification established in previous PPE studies with elasmobranchs in an effort to standardize electrophoretogram fractions for these species [3, 22]. Low percentages and concentrations for fraction 1 agree with previous PPE studies with elasmobranchs which also reported similar values for this fraction: 1.30% and0.30 g/l in the Atlantic sharpnose shark, 0.71% and0.20 g/l in the bonnethead shark [5].

In this study, a lipoprotein fraction migrating in the albumin region was not detected in undulate skates or nursehounds. The presence of albumin in elasmobranchs is currently being questioned, with previous PPE studies reporting negligible protein percentages and concentrations in the albumin band in bamboo sharks (*Chiloscyllium Plagiosu*m) and bonnethead sharks [5, 9]. Furthermore, a study examining plasma samples from eight Chondrichthyan species using agarose gel electrophoresis (AGE) and cellulose acetate electrophoresis found albumin to be absent in all species studied, including sharks and skates, and suggested that most elasmobranch species do not have detectable levels of non-esterified fatty acids (and the respective binding proteins), binding proteins to long-chain fatty acids instead [32].

Plasma proteins migrating in the alpha-globulin region formed two consistent electrophoretogram fractions (fraction 2 and 3; named alpha-1 and alpha-2 globulin fractions) in the undulate skate, and three consistent fractions (fractions 2, 3 and 4; named alpha-1, alpha-2.1 and alpha-2.2 globulin fractions) in the nursehound shark. Proteins migrating in this region in different avian, reptile, and mammal species, have been characterized as alpha-2 macroglobulin, hapto-globulin, and ceruloplasmin; though the composition of these fractions in elasmobranchs has not been yet determined [4, 22]. As previously described in other elasmobranchs species such as the blacknose shark (*Carcharhinus acronotus*), the blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*), the bull shark (*Carcharhinus leucas*), the lemon shark (*Negaprion brevirostris*), the sandbar shark (*Carcharhinus plumbeus*), the tiger shark (*Galeocerdo cuvier*), the cownose ray, the bamboo shark and the bonnethead shark, alpha-1 fraction was smaller than alpha-2 fraction also in undulate skates and nursehounds [3, 4, 9, 23]. Fraction 2 (equivalent to alpha-1 globulin) was significantly higher in undulate skates (median 12.75%, 1.47 g/l) compred to nursehounds (median 1.81% and 0.43 g/l), s both values between those reported for this fraction in other elasmobranch species such as the sand tiger shark (0.28% and 0.13 g/l), amboo shark (median 1.42% and 1.00 g/l) o bonnethead shark (4.82%, 2.80 g/l) showgreat interspecific variations. Proteins migrating in the alpha-2 region could be divided into two well-defined and preserved subfractions in nursehounds (equivalent to alpha 2−1 and 2−2 globulin fractions) while this subdivision was not observed in undulate skates. In addition, fraction 3 (equivalent to alpha-2 globulin) was also higher in undulate skates than in nursehounds (median 43.15% and 12.30 g/l) ompared to the sum of fractions 3 (alpha-2.1 globulins) and 4 (alpha-2.2 globulins) (median 37.31% and 8.33 g/l). ignificant interspecific variations have been described in alpha-2 globulins between the different elasmobranchs, with median values ranging from 12.0% to 7.2 g/l in ownose rays, 26.31% and 15.0 g/l inthe sand tiger shark, and 36.22% and 22.80 g/l i the bonnethead shark [3–5, 31].

The sum of fractions 5, 6 and 7 (equivalent to beta-1, beta-2, and beta-3 fractions of the beta-globulin migrating fraction), was the largest electrophoretogram globulin fraction in nursehounds (median 55.3%, 13.16 g/l), consistent with previous studies in other shark species such as the sand tiger shark which reported median 61.40% and 35.0 g/l values for beta-globulins. Undulate skates showed lower values in the beta-globulin migrating fraction (the sum of fractions 4, 5 and 6; equivalent to beta-1, beta-2 and beta-3 fractions), with median 41.30% and 12.19 g/l; these values were also lower than those previously reported in other batoid species such as the cownose ray (median 68.4%, 38.3 g/l). In mammals, beta-globulin fraction is mainly composed of transferrin and beta-lipoproteins, though can also include immunoglobulins, complement proteins, and acute phase proteins. In previous studies with elasmobranchs, proteins migrating

in the fraction equivalent to beta-globulins have been hypothesized to be very-low-density lipoproteins and low-density lipoproteins [11, 22, 32].

The last fraction (fraction 7 in skates and fraction 8 in sharks) was well-defined in both species, migrated in the mammalian gamma-globulin fraction range, and consisted of median 1.90% and 0.54 g/l in undulate skates and 5.40% and 1.29 g/l in nursehounds. This fraction seems to be more preserved and showed similar levels across the different elasmobranch species, with 6.67% and 0.38 g/l in the sand tiger shark, 4.35% and 1.00 g/l in the Atlantic sharpnose shark, 3.60% and 1.00 g/l in the bonnethead shark and 4.76% and 1 g/l in the spiny dogfish [5, 31]. As demonstrated in previous studies with fish (including elasmobranch), this band may be useful to identify the immunoglobulin M response in this group of animals [3, 33].

Our results also showed significant interspecific differences between the two studied elasmobranch species when electrophoretograms were classified as four fractions (migrating in the regions of prealbumin, alpha-, beta-, and gamma-globulins) ($P<0.01$; Mann-Whitney U test). This finding agrees with previous articles, which also report statistically significant interspecific differences for fractions 1, 2, 3, 4 and 5 between the Atlantic sharpnose shark, the bonnethead shark, and the spiny dogfish [5]. The marked interspecific differences for plasma protein and PPE fractions baseline values showed in this study possibly reflect species-specific differences in lipoprotein composition in elasmobranchs, revealing the need for further PPE studies involving different orders and families of elasmobranchs using the same methodology (capillary zone electrophoresis) to allow for a more accurate interspecific comparison and a reliable electrophoretogram interpretation in this group of animals.

Our study shows statistically significant differences ($p<0.01$; Mann-Whitney U test) for alpha-2-/beta-globulin ratio between the undulate skate (median 1.01) and the nursehound (median 0.67). These interspecific differences coincide with previous studies performed with elasmobranchs, which also showed important variations for bonnethead and nurse shark fraction 3:4 ratio (equivalent to alpha-2-/beta-globulin ratio) in samples obtained from clinically healthy bonnethead sharks (mean 0.78) and clinically healthy nurse sharks (mean 0.23) [4, 22]. Previous studies performed with elasmobranchs revealed variations in fraction 3 (equivalent to alpha-2-globulins) linked to different clinical conditions, such as a decrease observed in bonnethead sharks with inflammatory pathologies. The ratio of fraction 3 to fraction 4 also decreased significantly in clinically unhealthy bonnetheads in comparison to clinically healthy individuals [4]. Because of this, further PPE studies with elasmobranchs should focus in providing species-specific values for this ratio, as well as analyzing its clinical use for the health evaluation and the disease diagnosis in this group of animals.

It must be taken into account that both species evaluated in this study are benthic, have a similar metabolism, behavior, reproduction (oviparous), and geographical distribution [13, 14, 16, 17]. In addition, all animals included in this study had been maintained under human care in very similar environmental conditions, all samples have been collected by the same team of professionals and have been processed in the same laboratory following the same methodology. Because of this, the significant differences observed between the undulate skate and the nursehound in this study suggest that greater differences can be expected in the PPE of pelagic elasmobranch species, animals from tropical regions at different water temperatures and metabolic rates, free-living populations with highly variable environmental and physiological conditions (including reproductive status), animals suffering from different pathologic conditions, as well as samples collected using different sampling techniques and sample processing protocols. Despite previous studies with avian plasma have demonstrated that a single freeze-thaw cycle does not produce statistically significant changes in PPE fractions, there are currently no studies evaluating the effect of freezing on elasmobranch PPE analysis [21]. A limitation to this study is that the impact of freezing could not be determined, and it is possible that the freeze-thaw cycle to which plasma samples were exposed affected the electrophoretograms. Further studies evaluating the impact of different freezing temperatures, periods, and freeze-thaw samples in aquatic animal species are needed to precisely interpret plasma protein electrophoretograms.

Another limitation to our study was the lack of a large number of diseased undulate skates and nursehounds for statistical comparison with the healthy sample population used for these species. However, the objective of this study was not to evaluate variations in the electrophoretogram associated to illness, but to determine baseline values in clinically healthy individuals. Further studies including much larger sample sizes of undulate skate and nursehounds under various pathological processes should study the causes of variation in the alpha-2 globulin region (fraction 3 in undulate skates and fraction 3 and 4 in nursehounds), as well as Alpha-2-/Beta-globulin ratio, which will allow for a more accurate interpretation of electropherogram variations associated with different diseases in these species.

In our study, no statistically significant differences were detected between sexes and developmental stages in the undulate skate, although statistically significant differences were detected in nursehounds: fraction 4%

was significantly higher in males (median 27.58%) than in females (median 26.85%) ($p=0.03$; Mann-Whitney U test). However, this difference, even if statistically relevant, remains very tiny and even not relevant on concentration values. Despite variations in some electrophoretogram fractions have been related to sex and season in humans and domestic animal species, previous PPE studies with elasmobranchs did not detect statistically significant variations related to sex in different shark species including the blacknose, the blacktip, the nurse, bull, lemon, sandbar, and the tiger shark [11, 22, 23]. Fraction 4 (equivalent to beta-globulins) resulted significantly higher in female bamboo shark compared to male individuals, though the study did not determine shark reproductive status and the protein composition of this fraction [9]. It should be also considered that, in our study, all undulate skates were sampled during the same season (February 2021 – winter), while all sharks were sampled during August 2021 – summer, and therefore the effect of season could not be evaluated for each species. Another point to consider is that most of the skates sampled in this study were juveniles. As such, it was not possible to compare variations between sexes in the adult skate population due to the low number of clinically healthy adult skates available for sampling. In addition, statistically significant variations were also detected in nursehounds between developmental stages in fractions 5 ($p=0.033$; Mann-Whitney U test), 6 ($p<0.01$; Mann-Whitney U test) and 8 ($p<0.01$; Student's t-test) percentages. Three out of the four fractions showing statistically significant differences in nursehounds (fractions 4, 5 and 6) belonged to the proteins migrating in the beta-globulin region (equivalent to beta-1, beta-2, and beta-3 globulin fractions). Beta-globulins consist of multiple fractions, which include sex-hormone-binding globulins, and which have been described to vary between the different developmental and reproductive stages with reported statistically significant differences between male and female bamboo sharks [9]. Furthermore, the remaining fraction showing statistically significant differences in nursehound (fraction 8), corresponded to proteins migrating in the gamma-globulin region, which has been considered to represent IgM in teleost and has also been described to vary significantly not only during infection, but also with age and season in different animal species [11]. While our study followed ASVCP guidelines for the determination of reference values in clinically healthy populations, it is important to consider that within the few PPE studies performed with elasmobranchs, there is sometimes a mix of healthy and diseased individuals, which should be reflected and considered as this can significantly influence the reliability of the values provided [3–5, 9, 22, 23]. Understanding which electrophoretic changes are related with sex or developmental stage in elasmobranchs is key for the correct interpretation of plasma protein fraction values and to differentiate which abnormalities are due to ongoing pathologic processes or to physiological variations. Despite the potential of PPE as an analytical tool for health evaluation in elasmobranchs, further detailed studies are needed to better understand the electrophoretic patterns during elasmobranch development, physiological states, between sexes, and most importantly, during illness.

Conclusion

The baseline values provided in this study for clinically healthy undulate skates and nursehound sharks will contribute to the limited data available on elasmobranch plasma protein electrophoresis analysis, and thus will aid in the clinical evaluation and health management of elasmobranchs. Further studies including a larger number of undulate skates and nursehounds suffering from different pathologies will help further our understanding and more accurate interpretation of plasma protein electrophoretograms for these species. In addition, due to the significant variations observed in PPE across elasmobranch species, further studies involving different elasmobranch species are necessary for a reliable interspecific electrophoretogram comparison and interpretation.

Acknowledgements

The authors thank the veterinary and aquarists working at Oceanogràfic Aquarium, Finisterrae Aquarium, Bioparc Acuario de Gijón, Museo Marítimo del Cantábrico and Sevilla Aquarium for their help and support with this study. To Dr. Ames for the English grammar revision of this manuscript, to the team of professionals working at Sebia Hispania S.A. for providing us with the urine buffer and for their great help with graph analysis, and particularly to Alex Busquets for his great dedication and assistance during sample processing. A special thank you to Dr. Carolyn Cray and to Dr. Nicole I Stacy for their help and advice during electrophoretogram interpretation.

Author contributions

Study design, PM-E, and DG-P; data acquisition, PM-E, CR, TA, MV; data processing, PM-E, CS, JO; preparation of the manuscript, PM-E; revision of the manuscript, DG-P, CR-S, TE, CS, JO. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This project was funded by Fundación Oceanogràfic under the project reference number OCE.22.19 and by a fellowship award from Universidad Complutense de Madrid (PME; CT63/19-CT64/19). The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Data availability

Data used to develop this study is available upon request to the authors.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All animal handling and sample collection procedures have been designed in agreement with the Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare for Veterinary Journals, the EU Directive 2010/63/EU and Spanish RD 53/2013 for animal experiments and have been approved by the Animal Care and Welfare Committee at Oceanogràfic of Valencia and the Generalitat of Valencia under the project reference ID OCE-22-19. This study followed and is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Consent for publication
Not applicable.

Competing interests
The authors declare no competing interests.

Author details
[1]Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain
[2]Fundación Oceanogràfic de la Comunitat Valenciana, C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic) 1B, 46013 Valencia, Pablo, Spain
[3]Veterinary Services, Carlos Rojo-Solís, Teresa Álvaro-Álvarez, Mónica Valls-Torres, Oceanogràfic. Ciudad de las Artes y las Ciencias. C/ Eduardo Primo Yúfera (Científic), 1B, 46013 Valencia, Spain
[4]Lionsrock Big Cat Sanctuary, Bethlehem, South Africa
[5]VISAVET Health Surveillance Centre, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain
[6]Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid, Spain

Received: 30 June 2022 / Accepted: 11 October 2022
Published online: 29 October 2022

References

1. Stoskopf MK. Shark Health Management. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editors. Elasmobranchs Husbandry Manual II: Recent Advances in the Care of Sharks, Rays and their Relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017. pp. 245–54.
2. Dove A, Arnold J, Clauss T. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark Rhincodon typus. Aquat Biol. 2010;9:177–83.
3. Cray C, Rodriguez M, Field C, McDermott A, Leppert L, Clauss T, et al. Protein and cholesterol electrophoresis of plasma samples from captive cownose ray (*Rhinoptera bonasus*). J Vet Diagn Invest. 2015;27:688–95.
4. Hyatt MW, Field CL, Clauss TM, Arheart KL, Cray C. Plasma protein electrophoresis and select acute phase proteins in healthy bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*) under managed care. J Zoo Wildl Med. 2016;47:984–92.
5. Haman KH, Norton TM, Thomas AC, Dove ADM, Tseng F. Baseline health parameters and species comparisons among free-ranging Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae*), bonnethead (*Sphyrna tiburo*), and spiny dogfish (*Squalus acanthias*) sharks in Georgia, Florida, and Washington, USA. J Wildl Dis. 2012;48:295–306.
6. Otway NM. Serum biochemical reference intervals for free-living Sand Tiger sharks (Carcharias taurus) from east Australian waters. Vet Clin Pathol. 2015;44:262–74.
7. Grant KR, Campbell TW, Grant K. Hematology and plasma biochemistry value differences between acclimated and recently captive female southern stingrays (*Dasyatis americana*). JZAR. 2020. https://doi.org/10.19227/jzar.v8i1.254.
8. Cain DK, Harms CA, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). J Zoo Wildl Med. 2004;35:471–6.
9. Krol L, Allender M, Cray C, George R. Plasma proteins and selected acute-phase proteins in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). J Zoo Wildl Med. 2014;45:782–6.
10. Smale MJ, Jones RT, Correira JP, Henningsen AD, Crow GL, Garner R. Research on Elasmobranchs In Public Aquariums. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and their Relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004. pp. 533–41.
11. Cray C. Protein electrophoresis of non-traditional species: A review. Vet Clin Pathol. 2021;50:478–94.
12. Jacobsen S, Kjelgaard-Hansen M, Hagbard Petersen H, Jensen AL. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. Vet J. 2006;172:315–9.
13. Finucci B, Derrick D, Pacoureau N. Nursehound (*Scyliorhinus stellaris*). The IUCN Red List of Threatened Species 2021. 2021. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-2.RLTS.T161484A124493465.en. Accessed 22 Feb 2022.
14. Coelho R, Bertozzi M, Ungaro N, Ellis J. Undulate Skate (*Raja undulata*). The IUCN Red List of Threatened Species. 2009. https://www.iucnredlist.org/species/161425/5420694. Accessed 18 Jun 2022.
15. Coelho R, Erzini K. Age and growth of the undulate ray, *Raja undulata*, in the Algarve (southern Portugal). J Mar Biol Assoc UK. 2002;82:987–90.
16. Coelho R, Erzini K. Reproductive aspects of the undulate ray, *Raja undulata*, from the south coast of Portugal. Fish Res. 2006;81:80–5.
17. Ebert DA, Dando M. Field Guide to Sharks, Rays & Chimaeras of Europe and the Mediterranean. Plymouth: Wild Nature Press; 2021.
18. Henningsen AD. Tonic immobility in 12 elasmobranchs: Use as an aid in captive husbandry. Zoo Biol. 1994;13:325–32.
19. Walsh CJ, Luer CA. Elasmobranch Hematology: Identification of Cell Types and Practical Applications. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editors. Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays, and their Relatives. Ohio: Ohio Biological Survey; 2004. pp. 307–23.
20. Lawrence MJ, Raby GD, Teffer AK, Jeffries KM, Danylchuk AJ, Eliason EJ, et al. Best practices for non-lethal blood sampling of fish via the caudal vasculature. J Fish Biol. 2020;97:4–15.
21. Cray C, Rodriguez M, Zaias J. Protein electrophoresis of psittacine plasma. Vet Clin Pathol. 2007;36:64–72.
22. AtallahBenson L, XXXMerly L, Cray C, Hammerschlag N. Serum Protein Analysis of Nurse Sharks. J Aquat Anim Health. 2020;32:77–82.
23. Shinder SL, Cray C, Hammerschlag N, Merly L. Serum protein electrophoresis reference intervals for six species of wild-sampled sharks in South Florida. Integr Comp Biol. 2022. https://doi.org/10.1093/ICB/ICAC063.
24. Kajimura M, Walsh PJ, Mommsen TP, Wood CM. The Dogfish Shark (*Squalus acanthias*) Increases both Hepatic and Extrahepatic Ornithine Urea Cycle Enzyme Activities for Nitrogen Conservation after Feeding. Physiol Biochem Zool. 2015;79:602–13.
25. MedCalc. Statistical Software version 19.2.6 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; https://www.medcalc.org; 2020).
26. Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg EH, Jeffery U, et al. ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0): Developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. Vet Clin Pathol. 2019;48:542–618.
27. Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, et al. ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Vet Clin Pathol. 2012;41:441–53.
28. le Boedec K. Sensitivity and specificity of normality tests and consequences on reference interval accuracy at small sample size: a computer-simulation study. Vet Clin Pathol. 2016;45:648–56.
29. Zaias J, Bossart GD, Cray C. Comparison of Agarose Gel Electrophoresis and Capillary Zone Electrophoresis Methods Using Serum from Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Aquat Mamm. 2021;47:146–52.
30. Gili C, Bonsembiante F, Bonanni R, Giordano A, Ledda S, Beffagna G, et al. Detection of hereditary bisalbuminemia in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821): Comparison between capillary zone and agarose gel electrophoresis. BMC Vet Res. 2016;12:1–7.
31. Hoopes LA, Clauss T, Wetherbee BM, Fox DA. Baseline health and nutritional parameters of wild Sand Tigers *Carcharias taurus* sampled in Delaware Bay. J Aquat Anim Health. 2022. https://doi.org/10.1002/AAH.10156.
32. Metcalf VJ, Gemmell NJ. Fatty acid transport in cartilaginous fish: Absence of albumin and possible utilization of lipoproteins. Fish Physiol Biochem. 2005;31:55–64.
33. Karsten A, Rice C. Serum IgM levels against select marine bacteria in the Atlantic sharpnose shark (*Rhizoprionodon terraenovae*) from three estuaries. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2006;143:355–61.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DISCUSIÓN INTEGRADORA

VI DISCUSIÓN INTEGRADORA

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral son novedosos y útiles, y están dirigidos a cubrir las necesidades clínicas de los profesionales que trabajan diariamente con elasmobranquios, incluyendo veterinarios, investigadores, biólogos y acuaristas, entre otros. El presente trabajo sirve como ejemplo de la necesidad de una base científica aplicada a la clínica, que se hace más evidente en el manejo clínico de animales exóticos (y en especial de especies acuáticas), donde el empirismo todavía es una práctica habitual. Se trata de un buen ejemplo de aplicación del principio "from bench to bed", que hace referencia a cómo desde el laboratorio y mediante un abordaje científico, se pueden aportar datos de gran utilidad para el clínico y el paciente. Este principio o área de trabajo aplicado de la farmacología es muy satisfactorio e importante, al aportar unos conocimientos que son de gran utilidad para mejorar el manejo farmacoterapéutico, el cual está muchas veces limitado en especies animales no convencionales.

La posibilidad de trabajar en el campo de la medicina de tiburones y rayas es muy estimulante, pese a que muchas veces el estudio y la interpretación de resultados es difícil debido a la escasez de estudios de referencia; por ello, esta tesis puede considerarse pionera en un campo todavía muy poco explorado. Así, este trabajo de tesis ha generado aportaciones tanto experimentales, como de conocimientos fisiológicos-básicos, y aportaciones clínicas en el campo de la medicina de estas especies.

En cuanto a las aportaciones metodológicas, se ha desarrollado un modelo experimental aplicable a especies acuáticas en las que hasta el momento no se habían realizado estudios como los incluidos en esta memoria. Estos experimentos son los primeros estudios farmacocinéticos con meloxicam publicados en tiburones y en rayas verdaderas (orden *Rajiformes)*. En ellos se evalúan las principales vías de administración en elasmobranquios; su metodología y diseño experimental han demostrado ser eficaces y seguros, pudiendo ser replicables para la realización de futuros protocolos similares con diferentes principios activos o especies de elasmobranquio. La realización de estudios que impliquen un manejo frecuente y prolongado de tiburones es un reto, ya que estos animales, al igual que los peces óseos, son muy sensibles al estrés de captura y pueden sufrir complicaciones fisiológicas y traumatismos asociados al manejo. El diseño experimental y la metodología descritas en esta tesis han demostrado ser eficaces para la realización de estudios que impliquen la administración de sustancias y extracción de

sangre frecuente en tiburones y rayas, sin haber detectado alteraciones clínicas o bajas en ninguno de los animales utilizados, y habiendo podido reintroducir todos los animales empleados en los estudios farmacocinéticos en sus tanques de origen tras su finalización.

Las aportaciones fisiológicas-básicas de este trabajo son muy amplias, incrementando los conocimientos, todavía muy limitados, en cuanto a la analítica sanguínea de tiburones y rayas, y generando valores de referencia para dos especies de elasmobranquio de los que todavía no existían valores reportados y que son muy habituales en acuarios. Pese a los riesgos que supone la extrapolación de valores de referencia, es importante resaltar el valor de los intervalos aportados en esta tesis como modelos, dada la escasez de valores de referencia en elasmobranquios, y hasta que se publique información detallada de otras especies.

Por último, las aportaciones clínicas pueden dividirse en dos campos fundamentales y bien diferenciados: el tratamiento médico farmacoterapéutico, con la aportación de bases farmacocinéticas que permitirán mejorar los protocolos terapéuticos y regímenes de dosificación en este grupo de animales (Capítulo I); y el diagnóstico, con la aportación de datos de base en cuanto a hematología, bioquímica plasmática y electroforesis de proteínas (Capítulo II).

Aportaciones terapéuticas

Como se ha podido apreciar a lo largo de esta Tesis Doctoral, en comparación con otras especies, se dispone de muy pocos estudios farmacológicos que aporten una base científica para el uso racional en peces de la mayoría de los principios activos disponibles en el arsenal terapéutico del veterinario clínico de animales acuáticos. Para ampliar esta evidencia científica, por un lado, se ha realizado el estudio farmacocinético completo del meloxicam en el tiburón, cuyas propiedades cinéticas han sido también evaluadas en la raya mosaico, teniendo en cuenta las vías de administración más prácticas en estos animales. La realización de estudios farmacocinéticos completos no es habitual en especies no domésticas, en las que muchas veces la administración del fármaco por las diferentes vías y la toma repetida de muestras requerida para la determinación de las concentraciones plasmáticas en el tiempo se hace inviable o muy difícil. En esta tesis

estudiamos las propiedades farmacocinéticas del meloxicam tras su administración por vía intravenosa, intramuscular y oral a diferentes dosis en el tiburón alitán, lo que nos permitió establecer cuál era la vía y dosificación más apropiada para la especie. Una vez identificadas la vía y la dosis que presentaban un perfil cinético más adecuado, (que resultó ser la administración del meloxicam 1.5 mg/kg por vía IM), se completaron los estudios realizados, que hasta ahora habían sido con dosis únicas, con un estudio de dosificación múltiple atendiendo al uso más frecuente que se hace de estos fármacos en la clínica diaria en acuarios públicos. Se seleccionó el tiempo interdosis basándose en los parámetros farmacocinéticos de eliminación, que se estableció en 24 h. Como se ha explicado a lo largo de este trabajo, el establecimiento de tiempos menores a 24 h entre administraciones intramusculares, debido la captura y manejos frecuentes necesarios para la administración del fármaco, sería contraproducente en la mayoría de elasmobranquios. La determinación de regímenes de dosis múltiple que mantengan concentraciones terapéuticas en el plasma de estos animales es de especial interés en acuarios, al estar los animales controlados y facilitar así la dosificación repetida.

Los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral muestran importantes variaciones para los parámetros cinéticos del meloxicam entre el tiburón alitán y la raya mosaico, que también difieren de los valores publicados en otras especies de peces (tanto teleósteos como condrictios). Estas variaciones mencionadas entre las especies de peces están reflejadas en la Tabla 5. El meloxicam es rápidamente absorbido tras la administración intramuscular en todas las especies de peces estudiados, con una T_{max} siempre por debajo de las 3 h. Si comparamos los valores farmacocinéticos obtenidos en el tiburón alitán con los estudios farmacocinéticos publicados previamente con meloxicam en peces, apreciamos diferencias interespecíficas significativas en la C_{max}, T_{max} y $t_{1/2\beta}$. Tras la administración intramuscular a dosis única del meloxicam (tanto a dosis 0.5 mg/kg como 1.5 mg/kg), el tiburón alitán mostró una absorción y una eliminación más lentas, con una C_{max} más baja y una $T_{1/2\beta}$ mucho más prolongada, lo que permitió proponer periodos interdosis más largos y factibles que los que se habían descrito para la tilapia (*Orechromys spp*.), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y la raya amarilla (*Urobatis jamaicensis*). Curiosamente, la absorción y eliminación del meloxicam en la raya mosaico, fueron las más rápidas descritas en elasmobranquios, con valores de T_{max} y $t_{1/2\beta}$ más cortos que los reportados en la raya amarilla, y mucho menores que los obtenidos en el tiburón alitán tras la administración de la misma dosis (1.5 mg/kg) en esta tesis, utilizando el mismo

diseño experimental. Estos resultados muestran variaciones importantes en la eliminación de meloxicam, no sólo entre especies de peces, sino también entre especies de elasmobranquios. Las tres especies estudiadas hasta la fecha pertenecen a diferentes órdenes (la raya mosaico pertenece al orden *Rajiformes*, la raya amarilla al orden *Myliobatiformes* y el tiburón alitán al orden *Carcharhiniformes*), que son los tres principales órdenes de elasmobranquio mantenidos en acuarios a nivel mundial [297]. Se necesitan futuros estudios para determinar el motivo de esta importante variación interespecífica, pudiendo deberse a diferencias en la absorción del fármaco, la unión a proteínas plasmáticas o las vías de biotransformación [197]. Existen diversos procesos que podrían estar implicados de manera individual o conjuntamente en las diferencias mencionadas anteriormente en los parámetros de PK, ya que las peculiaridades anatómicas, fisiológicas y ambientales pueden influir en gran medida en el comportamiento de los fármacos administrados a los peces [26,298].

Un estudio realizado previamente en la pintarroja (*Scyliorhinus canicula*), una especie de tiburón escilorrínido muy relacionado con el tiburón alitán, mostró que su tasa metabólica era más baja que la de los peces óseos, lo que podría ralentizar la eliminación de los fármacos y producir los parámetros cinéticos de eliminación más largos observados en el tiburón alitán en comparación con la tilapia y la trucha arcoíris [171]. Dentro de los elasmobranquios, el tamaño y la composición del hígado también varían entre las diferentes especies, lo que, unido a la exposición de los hepatocitos, puede producir importantes diferencias en la cinética de eliminación de los fármacos [35,299]. El meloxicam se metaboliza principalmente en el hígado a través de las enzimas CYP: se conoce que la actividad de las enzimas del CYP de los peces difiere de la de los mamíferos y que existen incluso diferencias en el sistema de metabolización CYP entre especies de peces, con diferente sensibilidad y actividad enzimática de sus isoformas enzimáticas [197,204,224,225,242,243]. Este complejo enzimático es posiblemente uno de los factores limitantes para las tasas de metabolización y eliminación del meloxicam, por lo que las variaciones interespecíficas en esta enzima serían una de las posibles explicaciones para los diferentes parámetros cinéticos observados entre las especies de peces estudiadas [300]. En un futuro, sería interesante realizar un estudio sobre el metabolismo del meloxicam, conocer sus metabolitos y descartar o confirmar la posible actividad farmacológica de los mismos.

Tabla 5. Recopilación de parámetros farmacocinéticos del meloxicam administrado a dosis única en las diferentes especies de peces estudiadas.

Especie	Trucha Arcoíris (*O.mykiss*)			Tilapia (*Oreochromys spp.*)			Raya Amarilla (*U.jamaicensis*)		Tiburón Alitán (*S.stellaris*)			Raya Mosaico (*R.undulata*)	
Dosis (mg/kg)	1.0			1.0			1.0	2.0	0.5			1.5	1.5
Vía	IV	IM	PO	IV	IM	PO	IM	PO	IV	IM	PO	IM	IM
Estadística	MG			MG		$\overline{X}$	MG		$\overline{X}$			$\overline{X}$	$\overline{X}$
Cmax (µg/ml)	7.97*	2.97	0.84	9.48*	1.95	0.07	1.29	0.42	2.05*	0.38	ND	0.81	1.84
Tmax (h)	-	1.12	1.78	-	0.63	2.00	0.53	13.12	-	2.68	ND	2.58	1.50
AUCinf (h·µg/ml)	21.47	16.84	4.61	11.26	5.72	0.40	11.66	17.36	11.37	5.98	ND	15.52	11.43
MRT(h)	4.24	6.45	5.13	1.43	2.71	4.11	-	-	15.01	16.07	ND	23.40	5.37
$t_{1/2\beta}$ (h)	3.63	4.55	2.95	1.36	1.80	1.91	5.75	60.81	10.71	11.27	ND	15.97	3.55
Vd (l/kg)	0.20	-	-	0.13	0.45	6.87	-	-	0.67	0.79	ND	-	-
Cle(l/h·kg)	0.05	-	-	0.09	0.17	2.49	-	-	0.05	0.05	ND	-	-
F (%)	-	78.45	21.48	-	51.0	-	-	-	-	56.22	-	-	-
C_{pico} (µg/ml) †	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.50	-
C_{valle} (µg/ml) †	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.76	-
Fuente	[295]			[142]		[294]	[296]		[304]			[302,303]	[301]

*C_{max}, concentración máxima; * indica C_0, concentración máxima tras administración IV; T_{max}, tiempo requerido hasta alcanzar la concentración máxima; AUC_{inf}, área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito; MRT, tiempo medio de residencia del fármaco en sangre; $t_{1/2\beta}$, semivida de eliminación; Vd, volumen de distribución; Cle, aclaramiento; IV, intravenoso; IM, intramuscular; PO, oral; ND, no detectado; $\overline{X}$, media aritmética, MG; media geométrica. † Administración a dosis múltiple q24 h.*

También han de tenerse en cuenta la posible influencia de las varaciones en la salinidad/ osmolalidad del agua en la tasa de eliminación, así como las diferencias anatómicas y fisiológicas presentes a nivel renal entre los peces y el resto de vertebrados [50]. Como se comenta en la introducción de esta tesis, los riñones de los peces tienen una mayor tasa de filtración y diferente selectividad de filtración, secreción y reabsorción, lo que puede influir en las tasas de eliminación de fármacos como el meloxicam, que se elimina parcialmente por la orina [173,182,245]. También se han encontrado diferencias importantes en la estructura y organización renal entre peces marinos y de agua dulce, presentando las especies marinas menor densidad de glomérulos, que además son más pequeños y tienen una tasa de filtración más baja [53,98]. La realización de estudios farmacocinéticos con meloxicam en ejemplares mantenidos a distintas salinidades (incluyendo especies marinas de teleósteo) ayudaría a comprender cómo las diferencias en la salinidad y la función renal podrían estar influyendo en la eliminación del meloxicam. Por otro lado, el alto índice de retención de urea de los elasmobranquios respecto al resto de vertebrados puede también interferir decisivamente con el comportamiento cinético de múltiples sustancias y dar lugar a importantes diferencias entre los elasmobranquios y otras especies de vertebrados [55]. Futuros estudios farmacocinéticos comparativos con especies de elasmobranquio de agua dulce como las rayas de la familia *Potamotrygonidae*, que poseen niveles de urea mucho más bajos a los elasmobranquios marinos, permitirían evaluar el impacto del índice de retención de urea sobre las propiedades cinéticas de los xenobióticos [305,306].

Además de reflejar las importantes diferencias interespecíficas existentes, los resultados cinéticos aportados en los trabajos incluidos en esta tesis tienen un importante significado y utilidad clínica. Por un lado, la ausencia de concentraciones plasmáticas detectables en el tiburón alitán tras la administración oral del meloxicam, utilizando diferentes dosis (0.5 y 1.5 mg/kg) y protocolos de administración (que incluyeron la ingesta voluntaria del fármaco en un trozo de pescado, así como la administración forzada del fármaco) es de gran importancia a nivel clínico. Ya había sido reportado en elasmobranquios que la administración de algunos sedativos y anestésicos como el haloperidol o el midazolam, que son efectivos al administrarse por vía IV, no habían sido efectivos por vía oral incluso a dosis de hasta cinco veces superiores a las utilizadas IV, lo que podría sugerir una absorción errática o comprometida por la vía oral en estos animales [15]. Pese a que la administración de meloxicam por vía oral (frente a las vías IM e IV) ha dado resultados

farmacocinéticos inciertos en reptiles, aves, y peces óseos (con biodisponibilidades pequeñas y gran variabilidad individual), la administración de meloxicam por esta vía está empíricamente indicada en elasmobranquios y se realiza de manera frecuente en acuarios [138,165,211,294]. Sin embargo, los resultados aportados por esta tesis muestran que, por lo menos en el tiburón alitán, la administración por esta vía podría no estar cubriendo las necesidades terapéuticas de los animales. Este hallazgo resalta las limitaciones existentes en el banco de datos actual en cuanto a farmacoterapéutica de elasmobranquios. Se deben dirigir esfuerzos hacia encontrar un fármaco antiinflamatorio o presentación que produzca concentraciones plasmáticas suficientes para permitir el desarrollo de regímenes posológicos por vía oral en estos animales. También sería de gran interés la evaluación del efecto de la alimentación sobre la cinética de los distintos principios activos administrados por vía oral en estos animales, debido a las características únicas de su sistema digestivo.

Además de la absorción variable de la vía oral en estos animales, otro factor importante que puede estar produciendo la nula o muy limitada biodisponibilidad oral del meloxicam en peces es el posible efecto de eliminación presistémica o fenómeno de primer paso hepático. De hecho, un efecto de primer paso hepático puede anular la biodisponibilidad oral aunque el producto se haya absorbido bien [52]. En todas las especies estudiadas, una vez el meloxicam es absorbido, sufre una metabolización principalmente hepática, que lo transforma en varios metabolitos considerados inactivos [202,204,224]. Teniendo en cuenta el enorme hígado presente en elasmobranquios (llegando a suponer el 25 % del peso corporal), la eliminación presistémica mediante el sistema porta-hepático, podría haber sido responsable de la ausencia de niveles plasmáticos de meloxicam. Una manera de comprobar esto sería buscar la presencia o ausencia de metabolitos de fase I después de la administración oral. La concentración del meloxicam y su metabolito 5'Hydroxy-desmethyl-meloxicamin ya han sido estudiadas en la tilapia tras la administración oral de 1 mg/kg, resultando en niveles muy bajos (C_{max} = 0.072 y 0.137 µg/ml, respectivamente), con concentraciones tisulares no detectables de su metabolito [294]. La realización de futuros estudios que determinen las concentraciones plasmáticas y tisulares del meloxicam y sus metabolitos en elasmobranquios permitirá comprender si sucede un efecto de primer paso hepático en lugar de una absorción insuficiente del fármaco tras su administración oral. Sin embargo, se debe considerar que, si bien estos estudios permitirían conocer mejor sus propiedades cinéticas, las aplicaciones clínicas de su

determinación continuarían limitadas a la comparación de la actividad farmacológica de los metabolitos encontrados, ya que los metabolitos conocidos actualmente no son farmacológicamente activos [202].

Como se puede apreciar en la Tabla 5, la biodisponibilidad del meloxicam tras la administración IM en las distintas especies de peces es buena, estando por encima del 50 %, aunque es inferior a la reportada en mamíferos, en los que frecuentemente es superior al 90 % [142,304]. La explicación más plausible de la biodisponibilidad reducida del meloxicam en peces en comparación con mamíferos podría radicar en las características especiales del músculo y tejido conjuntivo de los peces: el músculo de los peces está formado por secciones de fibras musculares paralelas separadas por colágeno, con niveles más altos de colágeno tipo V que el de los mamíferos [142]. La diferente estructura, menor tensión y elasticidad del músculo y tejido conectivo de los peces favorecen la salida de las sustancias administradas a través del punto de inyección, como ha sido también descrita en elasmobranquios [35]. Pese a que en todos los estudios incluidos en esta tesis se ejerció presión en el punto de inyección tras la administración IM del meloxicam para disminuir las posibilidades de salida del fármaco, no se puede descartar que parte de la solución administrada se haya perdido al liberar a los animales en el tanque [301,304,307]. El objetivo de los estudios incluidos en esta tesis era replicar de la manera más fiable posible los protocolos habituales de administración IM en la clínica de elasmobranquios, aunque sería interesante probar el uso de un sellador en el punto de administración que impida por completo la pérdida del fármaco. También se podrían realizar estudios de administración IM con tintes específicos e inocuos, para ver el porcentaje de dosis administrada que se puede llegar a perder tras la administración por esta vía. Estos trabajos permitirían evaluar los efectos que la pérdida de fármaco por fuga podría causar en los parámetros cinéticos.

Por otra parte, los parámetros prolongados de cinética de eliminación obtenidos en el tiburón alitán tras la administración IM de meloxicam a dosis de 1.5 mg/kg, unidos a las concentraciones plasmáticas relativamente altas y mantenidas en el tiempo, sugieren que este fármaco podría utilizarse en regímenes posológicos de dosis múltiple. Sus características prometedoras para la administración con este tipo de régimen terapéutico quedan confirmadas en el estudio farmacocinético realizado administrando meloxicam a

1.5 mg/kg IM cada 24 h. Los resultados obtenidos tras la administración IM del meloxicam en el tiburón alitán, diferentes a los publicados hasta el momento para el resto de especies de peces, apoyarían la realización de futuros estudios cinéticos con meloxicam en otras especies del orden *Carcharhiniformes*. Dentro de este orden, sería de gran interés el estudio de otros elasmobranquios bentónicos más allá del tiburón alitán, así como de especies pelágicas; además de especies de distintas regiones ecuatoriales y templadas con distinta temperatura del agua y metabolismo, que permitirían evaluar las posibles influencias de estos factores sobre el comportamiento cinético del fármaco.

Frente a los buenos resultados obtenidos para la utilización del meloxicam a dosis múltiple en el tiburón alitán, algo muy distinto se ha encontrado en la raya mosaico: sus parámetros cinéticos de absorción y eliminación más rápida desaconsejan la utilización de regímenes posológicos de dosis múltiple en esta especie. Los valores de $t_{1/2\beta}$ y MRT relativamente cortos (media 3.55 y 5.37 h, respectivamente) obtenidos en esta especie, sugerirían la administración repetida del fármaco con periodos interdosis inferiores a las 6 h, lo que sería contraproducente en peces debido a los riesgos y complicaciones asociadas con su captura tan frecuente [33,142]. Sin embargo, la rápida absorción del meloxicam (T_{max} 1.50 h) y sus altas concentraciones plasmáticas (C_{max} 1.84 µg/ml) en la raya mosaico, posibilitan la utilización del meloxicam como fármaco antiinflamatorio y analgésico de elección en procedimientos esporádicos, cortos y dolorosos en estos animales, tales como la realización de curas, una cirugía o la toma de una biopsia.

Otro punto a considerar, y que podría alargar la $t_{1/2\beta}$ y MRT del meloxicam tras la administración IM, sería la utilización de formulaciones de liberación prolongada. Previamente se han utilizado formulaciones inyectables de meloxicam de liberación prolongada que han conseguido producir una cinética de eliminación más alargada en el tiempo en mamíferos [214,308]. Aunque las formulaciones de meloxicam de liberación prolongada aún no han sido evaluadas en peces óseos ni cartilaginosos, dada la buena absorción y la rápida eliminación del meloxicam tras la administración IM de la formulación convencional de meloxicam en peces, la utilización de este tipo de formulaciones permitiría establecer periodos interdosis más prolongados, beneficiando al manejo terapéutico de estos animales.

Un parámetro importante también a considerar en la cinética de eliminación tan rápida es el posible efecto del sistema portal renal en los parámetros cinéticos del meloxicam en

los estudios realizados. En un esfuerzo por replicar los lugares de inyección indicados con mayor frecuencia en la terapéutica de los peces, en todos los estudios cinéticos con meloxicam realizados hasta la fecha, se administró el fármaco en la musculatura epaxial de la mitad caudal de los animales, lo que impedía eludir una posible eliminación presistémica a través del sistema porta renal [142,294,296,301,302,304,307]. El sistema porta renal permite que la sangre de la región caudal en peces drene directamente a los riñones; lo que podría aumentar la excreción renal pre sistémica del fármaco y modificar así su comportamiento cinético y la llegada del principio activo al resto del organismo [50,52]. Una futura línea de investigación que podría aportar resultados interesantes para la farmacoterapéutica del meloxicam en peces sería el estudio del efecto del lugar de administración sobre los parámetros cinéticos. Quizás la administración en el tercio craneal del cuerpo en peces, al escapar de la eliminación presistémica, produjera unos parámetros cinéticos más favorables para el uso clínico del meloxicam en peces.

La principal limitación para la interpretación de los resultados obtenidos con meloxicam en esta tesis es la ausencia de datos de farmacodinamia que permitan realizar un estudio cinético-dinámico con este fármaco en elasmobranquios. Viendo que la extrapolación de protocolos farmacoterapéuticos está muy limitada en peces, el primer paso para el establecimiento de regímenes posológicos seguros y eficaces en estos animales es la realización de estudios farmacocinéticos. Sin embargo, aunque estos estudios nos proporcionan una base científica orientativa sobre cómo enfocar los regímenes posológicos, estos no estarán completos sin la realización de estudios farmacodinámicos y de eficacia, que avalen la utilización clínica del fármaco en la especie. La realización de futuros trabajos en esta línea de investigación es uno de los objetivos de continuidad en nuestro grupo de trabajo.

Por otra parte, el establecimiento de una metodología fiable para el estudio farmacocinético en tiburones y rayas, abre la puerta a la realización de estudios con otras moléculas y principios activos que están mostrando resultados clínicos prometedores en peces óseos, tales como el antiinflamatorio robenacoxib, y que podrían ser de gran utilidad también en elasmobranquios [162]. Las posibilidades de investigación y estudio farmacocinético en tiburones y rayas, pese a encontrarse todavía en un estado inicial, son muy amplias. Para garantizar que el propio procedimiento experimental sea seguro, se deben complementar los estudios cinéticos con pruebas que garanticen su seguridad,

tanto a nivel de dosis del fármaco utilizado y sus posibles efectos secundarios, como los posibles efectos adversos ocasionados por el propio procedimiento experimental. Se debe por tanto incluir un control estricto de la analítica de los animales. Las posibilidades de investigación y estudio farmacocinético en tiburones y rayas, pese a encontrarse todavía en un estado inicial, son enormes.

Con el objetivo de complementar estos estudios y garantizar la fiabilidad y seguridad del procedimiento experimental, en esta tesis se han evaluado las alteraciones en la analítica sanguínea producidas durante el estudio farmacocinético del meloxicam a dosis alta (1.5 mg/kg), para descartar que éste produzca efectos adversos en los animales. Estas analíticas permitieron además controlar el efecto producido por el manejo requerido para el desarrollo de un estudio farmacocinético en elasmobranquios. Hasta la realización de esta tesis, no se habían realizado estudios farmacocinéticos completos en tiburones y se desconocían las posibles implicaciones que el manejo frecuente requerido para la toma de muestras podría tener en sus parámetros hematológicos y bioquímicos. Una limitación de estos estudios es que los parámetros analizados, pese a ser los utilizados de manera complementaria a estudios farmacocinéticos para evaluar toxicidad, no evalúan completamente el efecto del AINE sobre la función renal. Se requieren futuros estudios fisiológicos y de farmacodinamia que realicen una medición del flujo renal y su distribución en el córtex renal, junto con la toma de biopsias renales mediante endoscopia para la determinación de los niveles de fármaco en tejido, y la realización de un análisis histopatológico completo (con especial interés en la detección de posible isquemia en los túbulos renales por falta de flujo). La medición del flujo renal y su distribución en el córtex renal, así como la detección de isquemia mediante histopatología en los túbulos renales por falta de flujo y la reducción de la excreción de sodio serán de gran utilidad para la evaluación de los efectos adversos del meloxicam a nivel renal [165,271,290]. Estos estudios aportarán información de gran interés e importancia para el uso de este grupo de fármacos de forma segura en elasmobranquios. Otra limitación importante para la utilización de la analítica sanguínea de elasmobranquios para evaluar la seguridad de un procedimiento experimental es la ausencia de valores de referencia fiables en la mayoría de las especies de elasmobranquio, así como la difícil interpretación de las variaciones producidas en la analítica asociadas a las diferencias interespecíficas en este grupo de animales.

Aportaciones al diagnóstico clínico

Los datos hemáticos, bioquímicos y de electroforesis de proteínas descritos en el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*) en el presente trabajo, ponen en evidencia las importantes diferencias en la analítica sanguínea entre especies de elasmobranquio y están discutidas de manera detallada en los artículos publicados. Una de las principales limitaciones en el avance del conocimiento y mejora de la interpretación de los valores de analítica sanguínea en elasmobranquios es la escasez de estudios científicos que utilicen poblaciones de referencia grandes y homogéneas [47,72]. Como se evidencia en los artículos incluidos en el segundo capítulo de esta tesis, debido a las dificultades que supone el trabajar con elasmobranquios, el pequeño número de ejemplares mantenidos *ex situ* bajo cuidado humano disponibles y los desafíos técnicos y económicos asociados con el estudio de elasmobranquios *in situ*, la mayoría de estudios que aportan valores analíticos en elasmobranquios lo hacen utilizando grupos muestrales pequeños (mayoritariamente por debajo de 10-30 individuos) y heterogéneos, que no permiten la adecuada comparación entre géneros, edades, distintos estados fisiológicos o patológicos [58,62,72,82,83,86]. Como se puede apreciar en las Tablas 6, 7 y 8, los estudios incluidos en esta tesis rompen con esta dinámica, utilizando poblaciones de referencia grandes y homogéneas (43-48 rayas mosaico y 60-94 tiburones alitán), gracias a la colaboración entre diferentes acuarios, lo que permite la determinación de valores de referencia más fiables y precisos. Tras el análisis de los parámetros de referencia obtenidos en las dos especies evaluadas en esta tesis, volvemos a resaltar que la interpretación de los resultados hematológicos de los elasmobranquios está todavía muy limitada por las distintas poblaciones de células hemáticas entre especies, unido al desconocimiento de las funciones celulares e implicaciones de las variaciones en su morfología y porcentajes [49,72,80,83,84].

Para facilitar una comparación rápida entre especies, y por ser la distribución de los datos no normal, en las Tablas 6, 7 y 8 se muestran únicamente la mediana y los valores mínimos y máximos para cada uno de los parámetros (la estadística descriptiva completa, que incluye media, mediana, desviación estándar, valores mínimos y máximos, intervalos de referencia y rangos, puede encontrarse en los artículos publicados e incluidos en resultados). Estas tablas facilitan la visión conjunta de los resultados de las dos especies estudiadas y la discusión integrada de los mismos.

Lo primero que hay que destacar es que se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$; Prueba U de Mann-Whitney) para todos los parámetros hematológicos, bioquímicos y de electroforesis de proteínas entre ambas especies. Esto reafirma las diferencias interespecie dentro de los elasmobranquios y la necesidad de conocer los valores de los parámetros para cada especie.

Existen múltiples factores tanto intrínsecos como extrínsecos, que pueden contribuir a las diferencias interespecíficas en la analítica de los elasmobranquios, y que se han abordado en detalle en la introducción de esta tesis. Se ha de tener en cuenta que tanto el alitán como la raya mosaico son especies bentónicas, que presentan un metabolismo, comportamiento, reproducción (ambas son especies ovíparas), y distribución similares [23,27,31,32,309]. Además, en el caso de los animales muestreados durante esta tesis, todos habían sido mantenidos bajo cuidado humano en unas condiciones ambientales muy similares, los muestreos habían sido realizados por el mismo equipo de profesionales y las muestras habían sido procesadas en el mismo laboratorio y siguiendo el mismo procedimiento. Por todo esto, las grandes diferencias observadas en los estudios incluidos en esta tesis, utilizando condiciones experimentales homogéneas y con dos especies de vida muy similar, inducen a esperar mayores diferencias en los parámetros basales de: especies pelágicas de elasmobranquios, animales de regiones tropicales con diferente temperatura del agua y metabolismo, poblaciones de vida libre o con unas condiciones ambientales y fisiológicas muy variables. Además, pueden también encontrarse diferencias cuando se tomen muestras utilizando protocolos de extracción y procesado distintos.

Comenzando por el estudio comparativo de los principales valores hematológicos entre el tiburón alitán y la raya mosaico, en la Tabla 6 se aprecian unos valores de hematocrito que, aunque presentan diferencias estadísticamente significativas entre ambas especies, representan valores cercanos si los comparamos con los obtenidos en otras especies de elasmobranquio pelágicas, como el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) (con 22 % de hematocrito) o la raya águila moteada (*Aetobatus narianari*) (28 %) [82,86]. Los valores de las medianas de hematocrito en alitán (17 %) y raya mosaico (15 %), pese a ser inferiores a los de la mayoría de elasmobranquios estudiados, son superiores a los determinados en el tiburón bambú de puntos blancos (*Chiloscyllium plagiosum*) (13 %), otra especie bentónica [310]. Los niveles de sólidos totales (58 y 70 g/l, respectivamente)

también muestran importantes variaciones interespecie e interestudio, pero están próximos a los valores previamente reportados en otras especies de elasmobranquio [81–83,116].

En los recuentos totales de eritrocitos, los valores de ambas especies son similares a los previamente descritos en especies bentónicas como la raya manchada americana (*Raja ocellata*) (200 x 10^3/µl) y la raya látigo de espina (*Dasyatis sabina*) (219 x 10^3/µl) [47,85]. Los recuentos totales de glóbulos blancos en elasmobranquios, como se ha explicado en la introducción de esta tesis, muestran grandes variaciones entre especies, estando influenciadas por los recuentos de los diferentes morfologías y tipos de granulocitos presentes en estas especies. Los valores más altos de leucocitos en el tiburón alitán (8.3 x 10^3/µl) en comparación con la raya mosaico (4.2 x 10^3/µl) están influenciados por la presencia de trombocitos granulados en el tiburón alitán. Estos, siguiendo las indicaciones previas y en un esfuerzo por asistir en la estandarización de los recuentos celulares en elasmobranquios, fueron considerados un cuarto tipo de granulocito y fueron incluidos en los recuentos totales de este tipo de células [49,90]. Los valores para los recuentos totales de leucocitos están próximos a los números previamente descritos en otras especies de elasmobranquio [82,92,94,95,116].

En cuanto a las poblaciones de células sanguíneas, se ha podido observar que, si bien el recuento de glóbulos rojos se mantiene, con pequeñas diferencias significativas entre especies, las poblaciones de glóbulos blancos difieren en gran medida entre las especies de nuestro estudio y de otros previamente publicados en elasmobranquios, tanto a nivel de tipología, como de morfología y número. Así, a la hora de analizar las diferencias en los recuentos diferenciales, es necesario destacar las importantes diferencias en cuanto a las poblaciones de granulocitos presentes entre las dos especies. El tiburón alitán produce cuatro tipos de granulocitos: granulocitos de gránulos eosinófilos finos (FEG), granulocitos de gránulos eosinófilos gruesos (CEG), neutrófilos y trombocitos granulados o “granulocito tipo 4”; mientras que la raya mosaico parece producir únicamente FEG y CEG. En el tiburón alitán, al igual que en otros tiburones carcharínidos como el tiburón gris (*Carcharhinus plumbeus*), los porcentajes de FEG fueron superiores a los de CEG, mientras que en la raya mosaico, de manera similar a como ocurre en otras especies de rayas y tiburones no carcharínidos, los FEG fueron el granulocito predominante [80,82,86,92].

Tabla 6. Principales parámetros hematológicos en el tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) y la raya mosaico (Raja undulata) utilizando una población de referencia de animales clínicamente sanos mantenidos en acuarios públicos bajo cuidado humano. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados (p < 0.01; prueba U de Mann-Whitney).

Especie (n)	*Scyliorhinus stellaris (94)*			*Raja undulata (43)*			*P*
EST	Me	Min	Max	Me	Min	Max	-
Htc (%)	17	14	21	15	10	21	< 0.01
ST (g/l)	58	50	68	70	56	80	< 0.01
GR (10^3/µl)	177	122	240	250	170	340	< 0.01
GB (10^3/µl)	8.3	4.9	14.5	4.2	1.63	10.71	< 0.01
L (%)	38	27	54	59	41	76	< 0.01
FEG (%)	6	1	14	29	11	45	< 0.01
CEG (%)	20	12	33	11	4	18	< 0.01
N (%)	2	0	6	ND	ND	ND	< 0.01
B (%)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-
GT (%)	28	12	40	ND	ND	ND	< 0.01
M (%)	2	0	7	1	0	6	< 0.01
L (10^3/µl)	3.24	1.55	6.55	2.50	1.08	5.84	< 0.01
FEG (10^3/µl)	0.55	0.09	1.32	1.20	0.31	3.53	< 0.01
CEG (10^3/µl)	0.63	0.68	3.67	0.5	0.06	1.35	< 0.05
N (10^3/µl)	0.18	0.00	0.56	-	-	-	< 0.01
B (10^3/µl)	0.0	-	0.00	-	-	-	-
GT (10^3/µl)	2.33	0.75	4.50	-	-	-	< 0.01
M (10^3/µl)	0.23	0.00	0.65	0.10	0.00	0.35	< 0.01
REF	[93]			[311]			

*n, número de individuos incluidos en el estudio; EST, estadística; Me, mediana; Min, valor mínimo; Max, valor máximo; P, p-valor; Htc, hematocrito; ST, sólidos totales; GR, glóbulos rojos; GB, glóbulos blancos; L, linfocitos; FEG, granulocitos eosinófilos de gránulos finos "fine eosinophilic granulocyte"; CEG, granulocito eosinófilo de gránulos gruesos "coarse eosinophilic granulocyte"; N, neutrófilos; B, basófilos; GT, trombocitos granulados; M, monocitos; ND, no detectado; REF, referencia. *Nótese que en algunas especies los granulocitos están combinados porque el artículo no hace distinción.*

Más allá de los granulocitos, ambas especies presentaron altos porcentajes de linfocitos (que al igual que en el resto de las especies de elasmobranquio estudiadas, fueron el leucocito predominante), siendo su porcentaje mayor en la raya mosaico que, como ya hemos comentado, carece de trombocitos granulados y neutrófilos. Los monocitos, al igual que en todas las especies de elasmobranquio estudiadas, presentaron bajos porcentajes y recuentos totales en el alitán y la raya mosaico (Tablas 2 y 6) [47,82,90,92,94,95].

Otro factor importante a tener en cuenta al realizar el análisis hematológico en elasmobranquios, y que supone una importante limitación para la estandarización y comparación de resultados entre laboratorios, son las importantes diferencias en cuanto al procesado de la sangre y el contaje. En este sentido, el tiempo transcurrido entre la extracción de sangre y la realización del frotis deberá ser lo más corto posible para evitar que se produzca agregación celular. El anticoagulante utilizado también será de gran importancia y podrá influir el análisis hematológico: la heparina y el EDTA han dado buenos resultados en tiburones y rayas, y la sangre de la mayoría de las especies puede ser mantenida por periodos de hasta 5 h [312,313]. Sin embargo, el EDTA puede producir lisis celular en algunas especies de raya [49,313]. Con el fin de elevar la osmolalidad y simular las condiciones fisiológicas de los elasmobranquios marinos, tanto los anticoagulantes como las soluciones de contaje pueden ser suplementadas con urea y cloruro sódico [47]. Otra opción para preservar las muestras de sangre obtenidas y realizar los recuentos celulares incluso un mes más tarde de la extracción consiste en introducir la sangre extraída en un tubo que contenga formalina 10 % en ratio 1:5 [47,314]. Una limitación importante para la estandarización de la hematología es que la automatización en los recuentos diferenciales todavía no es posible en elasmobranquios [49].

Pese a que se comienzan a comprender las funciones de algunos parámetros bioquímicos en elasmobranquios, la interpretación clínica de sus resultados está también fuertemente limitada por las diferencias entre especies y la ausencia de valores de referencia, además de la falta de estudios que incluyan animales enfermos y que permitan evaluar las variaciones ocurridas durante los diferentes procesos patológicos [72,83]. Los valores para los principales parámetros bioquímicos aportados por esta tesis en el tiburón alitán y la raya mosaico son un claro ejemplo de diferencias interespecíficas y cómo estas limitan la extrapolación de resultados entre especies.

Como se puede apreciar en la Tabla 7, los valores de la enzima ALP son significativamente superiores en raya mosaico (88.9 U/l) en comparación con el tiburón alitán (7.7 U/l), habiéndose mostrado previamente una gran variabilidad no sólo interespecífica (Tabla 2), sino también relacionada con la dieta y los distintos estados fisiológicos y de desarrollo dentro de la misma especie, con concentraciones entre 13 y 37 U/l en tiburones toro (*Carcharias taurus*) adultos y entre 1 y 13 U/l en juveniles de la misma especie [108]. El hecho de que las 43 rayas muestreadas fueran juveniles, como se

comenta posteriormente en esta discusión integradora, es una limitación del estudio que puede afectar a los parámetros de algunos analitos, incluida la ALP [93,109]. Pese a las diferencias interespecíficas, los valores de ALP en la raya mosaico están por encima de los valores medios descritos en otras especies de elasmobranquio como el tiburón cabeza de pala (mediana de 5 U / l), el tiburón toro (*Carcharias taurus*) (mediana de 20 U/l), la raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*) (media 34 U/l) y la raya tiburón (*Rhina ancylostoma*) (media 71.6 U/l) [62,86,315].

En alitán no se determinaron los niveles de la enzima ALT, por lo que no es posible la comparación interespecífica, siendo los niveles de este parámetro muy bajos en la raya mosaico (0.9 U/l), al igual que se ha descrito previamente en otras especies de elasmobranquios, con niveles no detectables en la raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*) o el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*), muy bajos en la raya tiburón (*Rhina ancylostoma*) (3.2 U/l) y ligeramente superiores en el cazón picudo del atlántico (*Rhizoprionodon terranovae*) (6.5 U/l) y la mielga (*Squalus acanthias*) (13.0 U/l) [82,86,107]. Los niveles de las enzimas GGT y LDH estuvieron por debajo de los límites de detección del analizador de bioquímica (< 3 U/l y < 25 U/l, respectivamente); este es un hallazgo frecuente en elasmobranquios, en los que muchos estudios no reportan valores para estos parámetros debido a los límites de cuantificación de la técnica utilizada (Tabla 2).

Mientras que los niveles de CK estaban por debajo del límite de detección (< 10 U/l) en el tiburón alitán, en la raya mosaico fueron muy elevados (alcanzando valores de hasta 2382 U/l). Se ha descrito que los niveles de esta enzima aumentan muy rápidamente en elasmobranquios tras su captura y manejo, o en situaciones de estrés, mostrando valores muy variables entre especies y estudios, que van desde concentraciones indetectables hasta concentraciones por encima de 1000 U/l [62,72,82,86,90,94,95]. Un hallazgo interesante de esta tesis respecto a la enzima CK es que, al relacionar los resultados hematológicos y bioquímicos obtenidos en los Capítulos I y II para el tiburón alitán, aunque no se detectan variaciones en la analítica sanguínea asociadas a la administración del meloxicam, se puede observar que los valores de esta enzima intracelular aumentaron significativamente tras el estudio farmacocinético. Inicialmente los animales presentaban niveles muy bajos, próximos al límite de detección (11.05 U/l en el grupo control y 18.86 en el grupo tratado con meloxicam), aumentando estas concentraciones de manera

significativa en ambos grupos tras el estudio (1134 U/l en el grupo control y 1320 U/l en el grupo administrado con meloxicam). Una futura línea de investigación consistiría en evaluar la capacidad de recuperación de los elasmobranquios tras la realización de estudios que impliquen su captura y manejo. Estos datos pueden ser de gran interés para su utilización por los comités de experimentación y bienestar animal como marcadores en la evaluación de la severidad de los procedimientos y en la propuesta de los tiempos de descanso óptimos entre estudios, que permitan asegurar la completa recuperación de los animales. Del mismo modo, podrían ser también empleados por los investigadores que trabajan con elasmobranquios para justificar la inocuidad de los procedimientos o depurar los protocolos, en caso de que produzcan efectos perjudiciales en los individuos incluidos en los experimentos. Las características fisiológicas y bioquímicas tan únicas de elasmobranquios requieren que se disponga del mayor número de datos posibles a la hora de diseñar los procedimientos experimentales que impliquen un manejo frecuente de los animales con fines de investigación. Los estudios farmacocinéticos constituyen una excelente oportunidad para recabar información sobre cómo afecta el manejo frecuente de estos animales en sus parámetros analíticos, ya que se dispone de muestras sanguíneas que pueden ser analizadas de forma complementaria a la detección del fármaco.

Otro analito que puede estar afectado por la captura y el estrés asociado a ésta es la glucosa, ya que sus niveles aumentan rápidamente tras un estímulo estresante [99]. Los niveles de glucosa determinados en el tiburón alitán (0.87 mmol/l) y en la raya mosaico (1.32 mmol/l) están por debajo de los niveles previamente determinados en otros elasmobranquios (Tabla 2), habiéndose demostrado previamente que los niveles bajos de glucosa son un hallazgo fisiológico en estos animales, debido a que tienen mecanismos de regulación del metabolismo energético muy diferentes al del resto de vertebrados, con una menor dependencia de la glucosa [62,72,315]. Se ha demostrado en un estudio previo que, en caso de inanición prolongada, los cuerpos cetónicos (pero no los ácidos grasos no esterificados) son un combustible importante para el músculo en los elasmobranquios, mientras que los ácidos grasos no esterificados (y no los cuerpos cetónicos) son un combustible importante en los teleósteos, por lo que la interpretación de los niveles de glucosa en elasmobranquios no puede realizarse basándose en los resultados de otros peces [316]. También debe tenerse en consideración que un retraso en el procesado de las muestras tras su extracción puede resultar en una disminución de los niveles de glucosa (5-7 % por hora), por lo que las muestras de sangre deben centrifugarse para separar el

plasma lo antes posible tras su extracción [317]. Los tiempos superiores de procesado en el tiburón alitán (< 90 min) en comparación con la raya mosaico (< 45 min), pueden haber producido una ligera disminución en sus respectivos valores. Es de gran importancia a la hora de aportar los datos de este parámetro, el especificar de la manera más detallada posible los protocolos de extracción y procesado de las muestras incluyendo el tiempo desde la extracción hasta la el análisis de los mismos (que debe ser lo más corto posible), ya que puede influir en sus valores.

Se encontraron también diferencias interespecíficas para los niveles plasmáticos de hierro, que fueron superiores en la raya mosaico (5.08 µmol/l) respecto al tiburón alitán (3.79 µmol/l), sin detectar ninguno de los dos estudios diferencias relacionadas con el sexo o la edad. El hierro es un metabolito primario involucrado en las reacciones de peroxidación lipídica y es importante para la fosforilación oxidativa, pudiendo ser absorbido en peces bien a través de la membrana branquial o a través de la mucosa intestinal [318]. Dado que las deficiencias en este metabolito están asociadas a una disminución en los recuentos de eritrocitos y a tasas de crecimiento reducidas, y dado que su determinación es todavía anecdótica en la analítica de elasmobranquios, parece importante determinar valores de referencia plasmáticos para este parámetro también en este grupo de animales [90,318].

Incluso los niveles de electrolitos, que deben mantenerse relativamente estables para el correcto funcionamiento fisiológico, difieren entre especies, siendo todos los electrolitos a excepción del potasio significativamente superiores en la raya mosaico (Tabla 7) [55]. Como se discute en el Artículo 5 de esta tesis, los valores superiores de electrolitos, así como del nitrógeno ureico en sangre en la raya mosaico, pueden estar relacionados con variaciones en las condiciones ambientales, tales como una mayor salinidad del agua [64]. Los niveles más altos de cloro, sodio y nitrógeno ureico en rayas pueden haber producido también que los niveles detectados de sólidos totales en plasma (descritos en la Tabla 6) fueran superiores en la raya mosaico en comparación con el tiburón alitán, ya que se ha demostrado que estas sustancias no-proteicas pueden influir en el ángulo de refracción del refractómetro manual utilizado para la determinación del parámetro [319].

Las diferencias en la frecuencia de alimentación entre las dos especies estudiadas también pueden haber contribuido a los niveles más altos de nitrógeno ureico en sangre en las rayas, así como de colesterol y triglicéridos, ya que las rayas utilizadas en este estudio

eran alimentadas *ad libitum* seis días por semana en comparación los tres días por semana de los alitanes. Una ingesta más alta puede haber sido uno de los factores que hayan llevado a mayores niveles de urea en las rayas [97]. Sin embargo, como se comenta en la introducción de esta tesis, la interpretación de los valores de nitrógeno ureico en elasmobranquios debe realizarse con cautela [44,60].

Empíricamente, se han utilizado los niveles de urea para evaluar el estado nutricional de los elasmobranquios, ya que este parámetro parece disminuir en animales emaciados [59]. Sin embargo, estudios realizados con elasmobranquios mantenidos en ayunas muestran resultados dudosos, con niveles de urea relativamente estables en la mielga (*Squalus acanthias*). Los elasmobranquios marinos sufren una pérdida continua de urea al entorno con fines de osmorregulación, principalmente a través de las branquias y en menor medida a través del riñón; estas especies son capaces de sintetizar urea mediante el catabolismo de las proteínas, con niveles de nitrógeno producidos que superan los niveles de nitrógeno perdidos incluso tras 25 días de ayuno [61]. Al contrario que en los teleósteos, que utilizan inicialmente los lípidos, seguidos de los carbohidratos y, por último, las proteínas para reponer las pérdidas derivadas del ayuno, los elasmobranquios utilizan el catabolismo de proteínas y la oxidación de aminoácidos no sólo como fuentes de energía, sino también para contribuir a la síntesis de urea y compensar su pérdida [44]. Es por esto que para la adecuada interpretación de los niveles de urea en elasmobranquios todavía se necesitan futuros estudios que evalúen el impacto de los diferentes estados fisiológicos, patológicos y las condiciones ambientales en las variaciones en los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo.

Además de la urea, en estudios previos, se ha descrito la posibilidad de utilizar los niveles de triglicéridos como indicador de la condición corporal en elasmobranquios, debido a su buena correlación [97,115]. Como se puede apreciar en la Tabla 2, mientras que los niveles de colesterol y triglicéridos del alitán están próximos a los del resto de especies estudiadas, los niveles de colesterol y triglicéridos de la raya mosaico están muy por encima de los del resto de especies, lo que podría sugerir que el régimen de alimentación *ad libitum* seis días por semana utilizada en rayas sea excesiva y podría producir un engrasamiento hepático incluso superior al deseado.

Aunque ya se ha analizado el efecto de la edad, el sexo y el estado reproductivo sobre el colesterol y los triglicéridos en teleósteos, gracias a su interés productivo en el campo de

la acuicultura, todavía se dispone de poca información relacionada con este tema en elasmobranquios [320]. Se han descrito variaciones en los niveles de colesterol relacionadas con la estación y el estado reproductivo en el tiburón pintarroja (*Scyliorhinus canicula*). Los niveles más bajos de triglicéridos y fosfolípidos en adultos que en juveniles durante el verano sugirieren que el gasto de energía asociado con la temporada de reproducción y la puesta de huevos podría disminuir las reservas de lípidos hepáticos, junto con las concentraciones de lípidos circulantes, especialmente en hembras [320]. También se ha descrito una reducción en la masa hepática y en la concentración plasmática de lípidos en hembras de tiburón toro (*Carcharias taurus*) durante la segunda mitad y la última etapa de la gestación, que se ha relacionado con una disminución de sus reservas de energía [321]. Estos hallazgos no sólo cuadrarían con los mayores niveles de colesterol y triglicéridos obtenidos en la raya mosaico (en la que la totalidad de la población estaba formada por animales juveniles) frente al tiburón alitán (en la que 54 de los 94 animales muestreados eran adultos, de los cuales, 29 eran hembras activas a nivel reproductivo), sino que explicarían también las variaciones significativas ($p < 0.05$) encontradas entre sexos para los niveles de colesterol total, con concentraciones más altas en machos (2.17 mmol/l) en comparación con hembras (1.71 mmol/l), y siendo las diferencias entre sexos todavía más marcadas al comparar machos adultos (2.36 mmol/l) frente a hembras adultas (1.53 mmol/l) [93].

Las diferencias en la dieta, la edad, los protocolos de captura y los parámetros ambientales también pueden producir variaciones en los niveles de calcio y fósforo. En nuestro caso, en los valores encontrados de Ca/P en el tiburón alitán (3.97 / 1.58 mmol/l) y la raya mosaico (4.12 / 2.13 mmol/l) no se han evidenciado estas posibles modificaciones, ya que los valores del presente trabajo están comprendidos dentro de los rangos previamente descritos en otras especies de elasmobranquio (Tabla 2).

Tabla 7. Principales parámetros bioquímicos en el tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) y la raya mosaico (Raja undulata) determinados utilizando una población de animales clínicamente sanos mantenidos en acuarios bajo cuidado humano. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados (p < 0.05; prueba U de Mann-Whitney).

Especie (n)	*Scyliorhinus stellaris (94)*			*Raja undulata (43)*			
EST	Me	Min	Max	Me	Min	Max	P
ALP (U/l)	7.7	4.1	13.8	88.9	50.2	170.7	< 0.01
ALT (U/l)	-	-	-	0.9	0.0	2.6	-
AST (U/l)	7.6	3.0	17.2	16.1	6.1	38.2	< 0.01
GGT (U/l)	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	-
LDH (U/l)	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	BLD	-
PT (g/l)	24.0	19.0	36.0	29.0	22.0	36.0	< 0.01
BUN (mmol/l)	281.6	256.0	315.7	424.6	398.5	442.8	< 0.01
Fe (µmol/l)	3.79	1.27	7.00	5.08	0.91	9.53	< 0.05
Col (mmol/l)	2.04	0.60	4.04	8.12	3.649	12.24	< 0.01
Trig (mmol/l)	0.97	0.39	3.44	2.34	2.90	9.99	< 0.01
CK (U/l)	BLD	BLD	BLD	603	29	2382	< 0.01
Glu (mmol/l)	0.87	0.23	1.44	1.32	0.52	2.09	< 0.01
Ca (mmol/l)	3.97	3.52	4.62	4.12	3.82	4.42	< 0.05
Cl (mmol/l)	233	213	259	261	249	277	< 0.01
K (mmol/l)	3.8	2.8	4.8	2.4	2.0	2.9	< 0.01
Na (mmol/l)	243	224	272	269	257	277	< 0.01
P (mmol/l)	1.58	1.00	2.13	2.32	1.48	3.06	< 0.01
REF	[93]			[311]			-

n, número de individuos incluidos en el estudio; EST, estadística; Me, mediana; Min, valor mínimo detectado; Max, valor máximo detectado; P, p-valor; BLD, valores por debajo del límite de detección; ALP, fosfatasa alcalina; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa; GGT, gamma-glutamil transferasa; LDH, lactado deshidrogenasa; PT, proteínas totales en plasma; BUN, nitrógeno ureico en sangre; Fe, hierro; Col, colesterol total; Trig; triglicéridos; CK, creatina kinasa; Glu, glucosa; Ca, calcio; Cl, cloro; K, potasio; Na, sodio; P, fósforo; REF, referencia.

En cuanto a la electroforesis de proteínas plasmáticas, pese a que se ha demostrado su utilidad clínica para la detección de algunas enfermedades en elasmobranquios, el uso de esta técnica diagnóstica en este grupo de animales se encuentra todavía en un estado inicial, habiéndose publicado valores de referencia es unas pocas especies de tiburón y raya y descrito importantes variaciones interespecíficas e inter estudio, que limitan la extrapolación de resultados entre especies [58,82,95,117].

Como se comentaba en la introducción de esta tesis, los estudios de electroforesis de proteínas realizados hasta la fecha en elasmobranquios utilizaban la técnica de

electroforesis en gel de agarosa, que permitían la identificación de 5-6 fracciones en el electroforetograma de los elasmobranquios equivalentes a: prealbúmina, albúmina (presente sólo en algunas especies), alfa-globulinas (que a su vez puede dividirse en algunas especies en globulinas alfa-1 y alfa-2), beta-globulinas, y gamma-globulinas [58,82,95,117]. En los estudios de electroforesis de proteínas con elasmobranquios englobados en esta tesis, se utilizó la técnica de electroforesis de zona capilar, una técnica más moderna, eficiente y precisa a la electroforesis en gel, constituyendo el primer estudio en publicar valores en elasmobranquios utilizando esta técnica [122]. El uso de la electroforesis de zona capilar permitió la clasificación de las lipoproteínas que migran en las regiones de globulina alfa y beta en varias subfracciones que fueron consistentes en toda la población muestreada durante el estudio. Aunque se requieren futuros estudios para poder comprender la composición proteica y las implicaciones clínicas de las diferentes subfracciones, la posibilidad de dividir el electroforetograma en varias fracciones pequeñas y consistentes permitirá una interpretación más precisa de las variaciones que pueden presentarse en el electroforetograma [122–124,322].

Como puede apreciarse en la Tabla 8, se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$; prueba U de Mann-Whitney) para todos los parámetros electroforéticos estudiados entre las dos especies evaluadas. Los valores de proteínas hallados en ambas especies se encontraron dentro de los rangos previamente descritos en otras especies de elasmobranquios (Tabla 3) [58,82,95,117]. Tanto el tiburón alitán como la raya mosaico presentaron bajos porcentajes y concentraciones de proteínas en la fracción 1 (equivalente a pre-albúmina), y que coinciden con los valores descritos previamente. En estas dos especies no se detectó una fracción de proteínas migrando en la región correspondiente a la albúmina, lo que apoya la ausencia de esta proteína en este grupo de animales, como ya había sido postulado por otros autores [82,117]. Las proteínas plasmáticas formaron dos fracciones consistentes en la región correspondiente a las globulinas-alfa (clasificadas como fracciones 2 y 3; y denominadas fracciones de globulina alfa-1 y alfa-2) en la raya mosaico, y tres fracciones consistentes (fracciones 2, 3 y 4; denominadas globulina alfa-1, alfa-2.1 y alfa-2.2) en el tiburón alitán. Esta subdivisión de la fracción 2 (alfa-globulinas) en dos diferentes subfracciones ya había sido descrita previamente en otras especies de elasmobranquio: la raya gavilán (*Rhinoptera bonasus*), el tiburón bambú de puntos blancos (*Chiloscyllium plagiosum*) y el tiburón cabeza de pala (*Sphyrna tiburo*) [58,71,117]. Sin embargo, nuestro trabajo de

tesis es el primero en dividir la fracción correspondiente a las beta-globulinas en diferentes subfracciones en elasmobranquios, estando constituida por las fracciones 5, 6 y 7 (equivalentes beta-1, beta-2, y beta-3) en el tiburón alitán, y por las fracciones 4, 5 y 6 (equivalentes a beta-1, beta-2 y beta-3) en la raya mosaico. Se apreciaron diferencias estadísticamente significativas para las subfracciones que componían la fracción beta entre ambas especies, siendo los valores mayores en el alitán, y con porcentajes y concentraciones proteicas para las beta-globulinas similares a las reportadas previamente en otras especies de elasmobranquios [58,82,95,117]. Por último, la fracción de proteínas que migró en la región del electroforetograma correspondiente a las gamma globulinas (fracción 8 en alitán y 7 en raya mosaico) se mantuvo de manera consistente en todos los animales muestreados de ambas especies. Esta fracción parece estar bien preservada y expresada en todas las especies de teleósteo y elasmobranquio estudiados previamente, si bien se han descrito también grandes variaciones interespecíficas [58,71,82,323].

Tabla 8. Valores de referencia para electroforesis de proteínas plasmáticas en el tiburón alitán (Scyliorhinus stellaris) y la raya mosaico (Raja undulata) utilizando electroforesis de zona capilar. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados (p < 0.01; prueba U de Mann-Whitney).

Especie (n)	Raya mosaico (*Raja undulata*) (n=48)			Tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) (n=62)			
EST	Me	Min	Max	Me	Min	Max	P
PT (g/l)	29.00	22.00	36.00	23.50	19.00	36.00	< 0.01
Pre-albumina (%)	0.40	0.10	1.00	0.64	0.22	1.50	< 0.01
Alfa-globulina (%)	56.40	46.90	61.90	38.59	25.20	51.90	< 0.01
Beta-globulina (%)	41.30	35.80	50.80	55.30	45.20	67.90	< 0.01
Gamma-globulina (%)	1.90	0.80	3.10	5.40	1.80	8.10	< 0.01
Pre-albumina (g/l)	0.11	0.03	0.32	0.17	0.05	0.43	< 0.01
Alfa-globulina (g/l)	16.16	11.77	20.27	8.91	6.60	14.67	< 0.01
Beta-globulina (g/l)	12.19	8.83	16.52	13.16	10.49	19.69	< 0.01
Gamma-globulina (g/l)	0.54	0.22	0.90	1.29	0.52	2.57	< 0.01

n, número de individuos incluidos en el estudio; EST, estadística; Me, mediana; Min, valor mínimo; Max, valor máximo; P, p-valor; PT, proteínas totales en plasma. Nota: la prealbúmina se consideró fracción 1 en raya mosaico y tiburón alitán. Para permitir la comparación interespecífica, la fracción de alfa-globulina se calculó como la suma de las fracciones 2 y 3 (equivalentes a alfa-1 y alfa-2-globulinas) en raya mosaico, y las fracciones 2, 3 y 4 (equivalentes a alfa-1-globulinas, alfa-2.1 y alfa-2.2 globulinas) en tiburón alitán. La fracción de beta-globulina se calculó como la suma de las fracciones 4, 5 y 6 (equivalentes a beta-1, beta-2 y beta-3-globulinas) en raya mosaico, y las fracciones 5, 6, y 7 (equivalentes a fracciones de globulina beta-1, beta-2, beta-3 y beta-4) en tiburón alitán. La fracción de gammaglobulina representó la fracción 7 en raya mosaico y la fracción 8 en tiburón alitán.

La disección del electroforetrograma en diferentes subfracciones, el análisis de la composición proteica de éstas, la comparación interespecífica, así como la interpretación de las variaciones producidas en cada una de las divisiones del electroforetograma ante las distintas variables fisiológicas y patológicas ayudarán a que esta técnica se convierta en una herramienta de gran utilidad en la evaluación del estado de salud de los elasmobranquios.

En cuanto a las limitaciones del segundo capítulo de esta tesis cabe destacar que, debido a las dificultades de obtener un mayor número de rayas mosaico que formaran un grupo homogéneo, se utilizó un tamaño muestral inferior (50 rayas mosaico) al utilizado en alitanes (94 alitanes). Pese a que ambos números están muy por encima de los tamaños poblacionales normalmente utilizados para la determinación de valores de referencia en elasmobranquios, lo ideal habría sido contar con un grupo mayor de rayas mosaico, que permitiera la determinación de intervalos de referencia todavía más precisos. Además, ha de tenerse en cuenta que, debido al pequeño número de animales adultos mantenidos en acuarios, la determinación de valores de referencia para esta especie tuvo que realizarse utilizando principalmente una población de referencia de animales juveniles clínicamente sanos (43 individuos), que se pudo comparar con los datos obtenidos de todos los adultos sanos a los que se pudo acceder (7 individuos). Esto ocurrió debido a que no es frecuente en los acuarios españoles el mantenimiento de grandes poblaciones de rayas mosaico adultas, como ocurre en el caso del tiburón alitán. Los ejemplares juveniles muestreados en esta tesis durante febrero de 2021 fueron posteriormente liberados por el Oceanogràfic de Valencia en el Mar Cantábrico (origen de los progenitores) durante la primavera de 2021, como parte de un programa de conservación en colaboración con el Museo Marítimo del Cantábrico para la recuperación de esta especie clasificada como “Amenazada” en la Lista Roja de la IUCN [32]. Es importante tener en cuenta, que pese a que la mayoría de rayas eran juveniles, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre juveniles y adultos para ningún parámetro hematológico y sólo escasos parámetros bioquímicos (únicamente ALP, BUN, colesterol total, triglicéridos, cloro, y sodio) mostraron diferencias significativas entre edades. Dado que en la mayoría de los parámetros estudiados no hubo diferencias estadísticas con los adultos, si se confirma (con un tamaño muestral mayor de adultos) la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre adultos y juveniles, los valores de referencia

obtenidos serían de utilidad clínica tanto para animales juveniles como para adultos, no siendo un limitante el sesgo de edad en la población.

Otra limitación de los estudios que aportan valores de referencia en el tiburón alitán y la raya mosaico, es que al ser los primeros estudios publicados en ambas especies y carecer de valores analíticos de animales enfermos para comparar, ambos artículos se limitan a discutir los efectos de factores intrínsecos y extrínsecos, analizando únicamente las variaciones fisiológicas de los parámetros, sin considerar los cambios patológicos. Son muy necesarios estudios que presenten valores analíticos de individuos con diferentes patologías diagnosticadas, y que posibiliten la interpretación y la correlación de las variaciones producidas en la analítica sanguínea con los procesos patológicos sufridos por los individuos. Esto ayudará en el diagnóstico de sus enfermedades y permitirá el tratamiento precoz, mejorando las posibilidades de recuperación y el éxito terapéutico. Con este fin, los acuarios y centros de investigación con especies acuáticas están comenzando a generar bancos de datos compartidos, como es el caso de la organización internacional “Species 360”, que ofrece acceso a la plataforma de software “Zoological Information Management System (ZIMS)”, en la cual se facilita la colaboración entre profesionales que trabajan con fauna silvestre (tanto terrestre como acuática) con el objetivo de la recopilar, compartir y analizar de manera conjunta los conocimientos y resultados obtenidos con estos animales, tanto *in situ* como *ex situ*. Aunque ya hay protocolos y resultados compartidos para un gran número de mamíferos, aves y reptiles (tanto terrestres como acuáticas), los datos compartidos en ZIMS para peces son todavía muy escasos, por lo que los acuarios están haciendo un esfuerzo en obtener e incorporar sus resultados a estas bases de datos colaborativas e internacionales [79]. Los resultados publicados en esta tesis ya han sido enviados al equipo de ZIMS para valorar si pueden ser incorporados a la plataforma.

Una limitación actual de estas bases de datos es la falta en la estandarización, principalmente en cuanto a metodología, de los resultados compartidos por las instituciones. Para poder generar bases de datos que sean fiables, se debe trabajar en diseñar protocolos de muestreo y procesado de muestras que permitan la estandarización de resultados. La creación de un banco europeo o internacional de analítica sanguínea en elasmobranquios y teleósteos, donde las citologías se hagan en los centros de forma estandarizada tras la extracción, pero se normalicen y sean interpretadas desde un solo

centro especializado, contribuiría enormemente a la mencionada estandarización. El análisis hematológico en tiburones y rayas depende en gran medida del entrenamiento del clínico, lo que puede llevar a resultados muy dispares. De la misma manera, la bioquímica sanguínea y la electroforesis de proteínas plasmáticas también dependerán del equipo y técnica utilizados.

Otra limitación es que los resultados analíticos presentados pertenecen únicamente a ejemplares de tiburón alitán y raya mosaico mantenidos en acuarios bajo cuidado humano. La realización de muestreos con elasmobranquios mantenidos en acuarios presenta importantes ventajas, como son el mayor control de los animales, la posibilidad de revisión de su historia clínica, actividad y comportamiento, control de la dieta, captura más rápida y manejo simplificado que resultan en menos artefactos en la analítica causados por el estrés de captura. Sin embargo, para la completa evaluación de los valores analíticos en elasmobranquios, se necesitarían estudios realizados en poblaciones de vida silvestre, en distintas regiones, con diferentes condiciones medioambientales, y que permitieran la comparación con los valores de los ejemplares mantenidos bajo cuidado humano. Además, debido a las variaciones estacionales observadas en la analítica sanguínea de los elasmobranquios, los estudios incluidos en esta tesis (tomados todos ellos en un solo momento del año), podrían enriquecerse si se muestrearan ejemplares en diferentes estaciones del año o fases del ciclo reproductivo. Los muestreos podrían beneficiarse también de la utilización de herramientas tecnológicas, como puede ser un ecógrafo, y que hubieran permitido la obtención de parámetros complementarios tales como las medidas del hígado (que se podrían utilizar como indicador de condición corporal y correlacionarse con diferentes parámetros de la analítica), el estado reproductivo y de gestación individual.

Por todo esto, los resultados aportados por este trabajo para los valores analíticos de hematología, bioquímica y electroforesis de proteínas en la raya mosaico y el tiburón alitán no se pueden considerar resultados definitivos, pero sí muy útiles para el clínico como referencia inicial. Nuestros datos se incorporarán a la todavía muy limitada lista de estudios de patología clínica realizados con elasmobranquios, que se irá completando gracias a la colaboración entre los profesionales que trabajan con estos animales y a las herramientas y especies accesibles de las que dispone cada uno. En este contexto, la labor

de los acuarios en la generación de este nuevo conocimiento que pueda redundar en la conservación y el bienestar de estas especies es muy importante.

Perspectivas de futuro

Para concluir esta discusión, es importante comentar que, de manera progresiva, se están incorporando cada vez más estudios científicos a la medicina de elasmobranquios, que incrementan y consolidan la base científica frente al empirismo que todavía hoy predomina en el manejo clínico y farmacoterapéutico de estos animales. A nuestro juicio, esta tesis abre múltiples puertas para la realización de algunos de estos estudios complementarios.

Así, tal y como se menciona a lo largo de este trabajo, sería de gran interés estudiar la influencia de las variaciones en las condiciones ambientales (principalmente temperatura del agua y salinidad) tanto sobre los parámetros de la analítica sanguínea, como en los parámetros cinéticos de los medicamentos administrados en tiburones y rayas. Todos los estudios realizados en esta tesis se llevaron a cabo manteniendo condiciones ambientales muy similares y estables, para evitar que estas pudieran influir en los parámetros determinados. La realización de estudios comparativos que muestreen elasmobranquios mantenidos en diferentes condiciones ambientales puede aportar información novedosa que ayude a la comprensión de sus mecanismos fisiológicos de adaptación al medio. Esta información también permitirá entender mejor sus procesos fisiopatológicos, y cómo éstos pueden influir a la cinética de los fármacos administrados. Algunos ejemplos consistirían en aumentar el metabolismo de los tiburones y rayas poiquilotérmicos con las variaciones en la temperatura, o bien alterar los mecanismos de eliminación del fármaco con las variaciones en la salinidad.

Esta tesis realiza un estudio farmacocinético completo del meloxicam, administrado por las diferentes vías y evaluando regímenes de administración única y múltiple, pero necesita que se realicen estudios de farmacodinamia que complementen a este trabajo. Pese a que se ha demostrado la presencia de COX-2 en peces, todavía no hay evidencias claras de que el meloxicam produzca analgesia en teleósteos y elasmobranquios, por lo que se requieren estudios de eficacia con este fármaco en este grupo de animales. Una

línea de investigación de gran interés a desarrollar consistiría en el estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias del meloxicam en peces (y específicamente en elasmobranquios) para la COX-2. Esto es especialmente significativo debido a que se han descrito variaciones importantes en cuanto a las concentraciones efectivas de meloxicam necesarias en las diferentes especies [177,209,221,268]. El establecimiento de las concentraciones plasmáticas necesarias para producir la inhibición de esta enzima y producir efecto antiinflamatorio y analgésico en estos animales, será clave para ajustar los regímenes posológicos de una manera mucho más precisa, segura y eficaz.

Las aportaciones de este Trabajo de Tesis Doctoral al crecimiento de la evidencia científica para la medicina de animales exóticos a nuestro juicio son valiosas, pero a su vez presentan algunas limitaciones comentadas en la discusión. También ponen en evidencia la escasez de base y conocimientos científicos asociados al diagnóstico y al tratamiento de enfermedades en elasmobranquios. Como se muestra en esta tesis, en una situación actual crítica para los tiburones y las rayas, en la que sus poblaciones se están viendo reducidas de manera drástica y la incidencia de enfermedades emergentes que los afectan se halla en aumento, los acuarios pueden ser grandes aliados para la preservación de la biodiversidad. Además, deben colaborar de forma asidua con las universidades y los centros de investigación en la realización de estudios científicos que permitan ampliar el conocimiento de este grupo de animales emblemáticos, pero todavía enormemente desconocidos, contribuyendo de manera directa a su medicina y a su conservación.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

VII CONCLUSIONES

PRIMERA

Los protocolos experimentales y la metodología de muestreo desarrollados durante esta tesis han demostrado ser eficientes para la realización de estudios farmacocinéticos en elasmobranquios, siendo el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*) especies modelo óptimas para estos ensayos.

SEGUNDA

El método cromatográfico utilizado para la determinación y cuantificación de meloxicam en plasma del tiburón alitán resultó adecuado para su uso en estudios de farmacocinética. Mostró una respuesta lineal en los rangos de concentración 1 a 2500 ng/ml. El límite de cuantificación fue de 15 ng/ml y el límite de detección 4 ng/ml. El valor medio de recuperabilidad del meloxicam fue 92.85 ± 5.30 % y la variabilidad intra- e interdía en las concentraciones estudiadas fue menor al 6.00 %.

TERCERA

El meloxicam administrado por vía oral a dosis única de 0.5 mg/kg y a dosis múltiple de 1.5 mg/kg cada 12 h durante 3 días no produjo concentraciones plasmáticas detectables en el tiburón alitán, por lo que la vía oral parece no ser clínicamente útil para la administración de este fármaco en la especie estudiada.

CUARTA

La cinética del meloxicam por vía intramuscular en tiburones alitanes a dosis únicas de 0.5 y 1.5 mg/kg se caracterizó por una absorción rápida (T_{max}=2.7 y 2.6 h, respectivamente) y una eliminación más prolongada ($t_{1/2\beta}$ =11.3 y 16.0 h, MRT=16.1 y 23.4 h, respectivamente). Si bien la biodisponibilidad por esta vía fue superior al 55 %, se precisaron dosis de 1.5 mg/kg para alcanzar y mantener concentraciones plasmáticas sobre los niveles terapéuticos establecidos para otras especies (0.15-0.82 μg/ml), sin observarse cambios analíticos ni efectos adversos significativos.

QUINTA

En régimen de dosis múltiple mantenido durante 7 días con administración intramuscular de 1.5 mg/kg de meloxicam cada 24 h en el tiburón alitán, se alcanzó la fase estacionaria

tras la quinta administración, con altas concentraciones pico (3.02 μg/ml) y valle (1.76 μg/ml), que estuvieron por encima de los valores terapéuticos, sin producirse acumulación del fármaco ni efectos adversos aparentes.

SEXTA

En la raya mosaico, la administración de meloxicam a dosis de 1.5 mg/kg por vía intramuscular produjo concentraciones plasmáticas máximas elevadas (C_{max}=1.84 μg/ml) tras una rápida absorción (T_{max}=1.5 h). La breve semivida de eliminación ($t_{1/2\beta}$=3.55 h) en esta especie indica que los periodos interdosis en regímenes de dosis múltiples deberían ser drásticamente reducidos. Las importantes diferencias observadas en la cinética del meloxicam entre las dos especies de elasmobranquio estudiadas revelan las limitaciones en la extrapolación de protocolos terapéuticos.

SÉPTIMA

Los valores de referencia para los principales parámetros hemáticos y bioquímicos en el tiburón alitán y la raya mosaico que se aportan en este trabajo suponen la primera referencia sólida de estos parámetros para estas dos especies. Las importantes diferencias interespecíficas encontradas en la analítica sanguínea ponen en evidencia la necesidad de futuros estudios utilizando poblaciones de gran tamaño que permitan conocer estas variaciones entre otras especies de elasmobranquios, y realizar una interpretación fiable de las pruebas clínicas en animales enfermos.

OCTAVA

La electroforesis de zona capilar, aplicada por primera vez en el estudio de las proteínas plasmáticas en elasmobranquios, permitió la clasificación del electroforetograma de la raya mosaico en siete fracciones consistentes, con predominio de las proteínas que migran a la región de las globulinas alfa. Sin embargo, en el tiburón alitán, se evidenciaron ocho fracciones, entre las que predominaron las correspondientes a las globulinas beta. En ninguna de las dos especies se detectó una banda en el electroforetograma que migrara en la región correspondiente a la albúmina.

VII CONCLUSIONS

FIRST

The experimental protocols and sampling methodology developed during this thesis have proven to be efficient for conducting pharmacokinetic studies in elasmobranchs, with the Nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*) and the Undulate skate (*Raja undulata*) being optimal model species for drug kinetic studies.

SECOND

The chromatographic method used for the determination and quantification of meloxicam in Nursehound shark plasma was suitable for its use in pharmacokinetic studies. It showed a linear response for concentrations ranging from 1 to 2,500 ng/ml. The quantification limit was 15 ng/ml and the detection limit was 4 ng/ml. The mean recovery value of meloxicam was 92.85 ± 5.30 % and the intra- and inter-day variability in the concentrations studied was under 6.00 %.

THIRD

Neither a single 0.5 mg/kg dose of orally administered meloxicam, nor multiple doses of 1.5 mg/kg every 12 h for 3 days via the same administration route produced detectable plasma concentrations in the Nursehound shark; oral administration does not appear to be clinically useful for this drug in the species studied.

FOURTH

The kinetics of intramuscular meloxicam in the Nursehound shark at single doses of 0.5 and 1.5 mg/kg were characterized by a rapid absorption (T_{max}=2.7 and 2.6 h, respectively) and longer time to elimination ($t_{1/2\beta}$ =11.3 and 16.0 h, MRT=16.1 and 23.4 h, respectively). Although the bioavailability for this route was greater than 55 %, doses of 1.5 mg/kg were required to reach and maintain plasma concentrations above therapeutic levels established for other species (0.15-0.82 μg/ml) with no analytical changes or significant adverse effects observed.

FIFTH

In a multiple-dose regimen of 1.5 mg/kg intramuscular administration of meloxicam every 24 h for 7 days in the Nursehound shark, the stationary phase was reached after the fifth injection, with peak (3.02 μg/ml) and trough (1.76 μg/ml) concentrations above therapeutic values, without producing drug accumulation or apparent adverse effects.

SIXTH

In the Undulate skate, 1.5 mg/kg intramuscular injections of meloxicam produced high peak plasma concentrations (C_{max}=1.84 μg/ml) after rapid absorption (T_{max}=1.5 h). The short elimination half-life ($t_{1/2\beta}$=3.55 h) in this species indicates that time between injections in multiple dose regimens should be drastically reduced. The important differences observed in the kinetics of meloxicam between the two elasmobranch species studied reveal the limitations of extrapolating therapeutic protocols across species.

SEVENTH

The reference values for the main hematological and biochemical parameters of the Nursehound shark and the Undulate skate in this study represent the first solid baseline of these parameters in both species. Important interspecific differences in the blood tests revealed the need for future studies using large reference populations to determine the existence of these variations among other elasmobranch species and that will allow for a reliable interpretation of clinical tests in diseased animals.

EIGHTH

Capillary zone electrophoresis, applied here for the first time in the study of plasma proteins in elasmobranchs, divided the Undulate skate electrophoretogram into seven consistent fractions with proteins predominantly migrating in the alpha globulin region. However, in the Nursehound shark, eight protein fractions were evident with beta globulins prominent. Neither species had a protein band migrating in the albumin electrophoretogram region.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Compagno L. Systematics and body form. En: Hamlett W, editor. Sharks, skates and rays: The biology of elasmobranch fishes. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press; 1999, p. 1–41.

[2] Last PR, White WT, de Carvalho MR, Séret B, Stehmann FW, Naylor GJP, editores. Rays of the world. Melbourne, VIC: CSIRO Publishing; 2016, p. 10–25. Disponible en: https://doi.org/10.1071/9780643109148

[3] Woodhead AD, editor. Nonmammalian animal models for biomedical research. Boca Raton, FL: CRC Press; 1989.

[4] Stedman NL, Garner MM. Chondrichthyes. En: Terio KA, McAloose D, st. Leger J, editores. Pathology of wildlife and zoo animals. Cambridge, MA: Academic Press; 2018, p. 1003–1018. Disponible en: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805306-5.00040-7

[5] Ebbensson SOE. On the organization of the telencephalon in elasmobranchs. En: Ebbensson SOE, editor. Comparative neurology of the telencephalon. Boston, MA: Springer; 1980, p. 1–16.

[6] Stoskopf M. Anatomy and physiology of sharks. En: Stoskopf M, editor. Fish medicine. Filadelfia, PA: Saunders; 1993, p. 749–753.

[7] Ebert DA, Compagno LJV. Biodiversity and systematics of skates (*Chondrichthyes*: *Rajiformes: Rajoidei*). Environmental Biology of Fishes 2007;80:111–124. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s10641-007-9247-0

[8] Southall EJ, Sims DW. Shark skin: a function in feeding. Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences; 2003;270:S47-S49. Disponible en: https://doi.org/10.1098/RSBL.2003.0006

[9] Carrier JC, Simpfendorfer CA, Heithaus MR, Yopak KE, editores. Biology of sharks and their relatives. Tercera edición. Boca Raton, FL: CRC Press; 2022. Disponible en: https://doi.org/10.1201/9781003262190

[10] Hamlett WC, editor. Reproductive biology and phylogeny of *Chondrichthyes*: Sharks, batoids and chimaeras. Enfield: Science Publishers, Inc.; 2005. Disponible en: https://doi.org/10.1201/9781439856000

[11] Akoev GN. Temperature sensitivity of the Ampullae of Lorenzini of elasmobranchs. En: Bligh J, Voigt K, Braun H, Brück K, Heldmaier G, editores. Thermoreception and temperature regulation. Berlin: Springer; 1990, p. 44–52.

[12] Dulvy NK, Pacoureau N, Rigby CL, Pollom RA, Jabado RW, Ebert DA, Finucci B, Pollock CM, Derrick DH, Herman KB, Sherman CS, VanderWright WJ, Lawson JM, Walls RH, Carlson JK, Charvet P, Bineesh K, Simpfendorfer CA. Overfishing drives over one-third of all sharks and rays toward a global extinction crisis. Current Biology. 2021;31:4773-4787. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.08.062

[13] Shiffman DS. Marine Conservation: Reef sharks need bigger protected areas. Current Biology. 2020;30:117–118. Disponible en: https://doi.org/10.1016/J.CUB.2019.12.050

[14] Davis R. Quarantine and prophylaxis for elasmobranchs. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004, p. 143–150.

[15] Mylniczenko N. Pharmacology of elasmobranchs: updates and techniques. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays, and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 289–302.

[16] Dehart A. Species selection and compatibility. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004, p. 15–17.

[17] Smale MJ, Jones RT, Correira JP, Henningsen AD, Crow GL, Garner R. Research on elasmobranchs in public aquariums. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D,

Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004, p. 533–541.

[18] Stoskopf MK. Shark health management. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranchs husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 245–254.

[19] Koob TJ. Elasmobranchs in the public aquarium: 1860 to 1930. En: Smith MD, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004, p. 1–15.

[20] Taylor LR. Aquariums: windows to nature. New York, NY: Pretince Hall; 1993, p. 56–85.

[21] Muñoz-Baquero M, Marco-Jiménez F, García-Domínguez X, Ros-Santaella JL, Pintus E, Jiménez-Movilla M, García-Párraga D, García-Vazquez FA. Comparative study of semen parameters and hormone profile in Small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*): aquarium-housed *vs.* wild-captured. Animals. 2021;11:2884. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ANI11102884

[22] Oceanogràfic de Valencia. El Oceanogràfic suelta 20 tiburones juveniles por primera vez en España [Internet]; 2018 [citado 18 de junio de 2022]. Disponible en: https://www.oceanografic.org/el-oceanografic-suelta-20-tiburones-juveniles-por-primera-vez-en-espana

[23] Finucci B, Derrick D, Pacoureau N. *Scyliorhinus stellaris* (Nursehound). The IUCN Red List of Threatened Species [Internet]; 2021 [citado 22 de febrero de 2022]. Disponible en: https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-2.RLTS.T161484A124493465.en

[24] Ellis JR, McCully SR, Brown MJ. An overview of the biology and status of undulate ray *Raja undulata* in the north-east Atlantic Ocean. Journal of Fish Biology 2012;80:1057–1074. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.03211.x

[25] Coelho R, Erzini K. Age and growth of the undulate ray, *Raja undulata*, in the Algarve (southern Portugal). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 2002;82:987–990. Disponible en: https://doi.org/10.1017/S0025315402006495

[26] Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. Fishes of the World. Quinta edición. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.; 2016. Disponible en: https://doi.org/10.1002/9781119174844

[27] Ebert DA, Dando M. Field Guide to Sharks, Rays & Chimaeras of Europe and the Mediterranean. Plymouth: Wild Nature Press; 2021. Disponible en: https://doi.org/10.2307/j.ctv12sdwkk

[28] Capapé C, Vergne Y, Vianet R, Guélorget O, Quignard J-P. Biological observations on the nursehound, *Scyliorhinus stellaris* (Linnaeus, 1758) (*Chondrichthyes: Scyliorhinidae*) in captivity. Acta Adriatica. 2006;47:29–36. Disponible en: http://jadran.izor.hr/acta/pdf/47_1_pdf/47_1_4.pdf

[29] Ebert DA, Bigman JS, Lawson JM. Biodiversity, life history, and conservation of northeastern pacific chondrichthyans. En: Larson SE, Lowry D, editores. Adv Mar Biol, vol. 77, Academic Press; 2017, p. 9–78. Disponible en: https://doi.org/10.1016/bs.amb.2017.07.001

[30] Serra-Pereira B, Erzini K, Figueiredo I. Using biological variables and reproductive strategy of the undulate ray *Raja undulata* to evaluate productivity and susceptibility to exploitation. Journal of Fish Biology. 2015;86:1471–1490. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jfb.12653

[31] Coelho R, Erzini K. Reproductive aspects of the undulate ray, *Raja undulata*, from the South coast of Portugal. Fish Research. 2006;81:80–85. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.fishres.2006.05.017

[32] Coelho R, Bertozzi M, Ungaro N, Ellis J. Undulate Skate (*Raja undulata*). The IUCN Red List of Threatened Species [Internet]; 2009 [citado 18 de junio de 2022]. Disponible en: https://www.iucnredlist.org/species/161425/5420694

[33] Visser M. Translating pharmacokinetic and pharmacodynamic data into practice. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 2018;21:169–182. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cvex.2018.01.001

[34] Lees P, Landoni MF, Giraundel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2004;27:479–490. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00617.x

[35] Stamper AM, Miller SM, Berzins IK. Pharmacology in elasmobranchs. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays, and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2004, p. 447–466.

[36] Stamper AM. Elasmobranchs (sharks, rays, and skates). En: West G, Heard D, Caulkett N, editores. Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. Segunda edición. Victoria: Wiley Blackwell; 2014, p. 197–201. Disponible en: https://doi.org/10.1002/9781118792919

[37] Bucking C. Feeding and digestion in elasmobranchs: Tying diet and physiology together. Fish Physiology. 2015;34:347–394. Disponible en: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801286-4.00006-X

[38] Muñóz-Chapuli R. Circulatory system: anatomy of the peripheral circulatory system. En: Hamlett W, editor. Sharks, skates, and rays. The biology of elasmobranch fishes. Baltimore: John Hopkings University Press; 1999.

[39] Leigh SC, Summers AP, Hoffmann SL, German DP. Shark spiral intestines may operate as Tesla valves. Proceedings of the Royal Society B 2021;288. Disponible en: https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1359

[40] Barrul J, Mate I. Tiburones del Mediterráneo. Barcelona: El Set-ciènces; 2002.

[41] Holmgren S, Nilsson S. Digestive system in sharks, skates and rays. En: Hamlet NC, editor. The biology of elasmobranch fish. Baltimore: John Hopkins University Press; 1999, p. 144–73.

[42] McDonagh AF, Palma LA. Heme catabolism in fish. Bile pigments in gallbladder bile of the electric torpedo, *Torpedo californicus*. Comparative Biochemistry and Physiology B Comparative Biochemistry. 1982;73:501–507. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0305-0491(82)90066-9

[43] Abeles RD, Shawcross DL, Auzinger G. Inactivation of digestive proteases by deconjugated bilirubin: the possible evolutionary driving force for bilirubin or biliverdin predominance in animals. Gut. 2007;56:1641-1642. Disponible en: https://doi.org/10.1136/gut.2007.132076

[44] Speers-Roesch B, Treberg JR. The unusual energy metabolism of elasmobranch fishes. Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular Integrative Physiology. 2010;155:417–434. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.09.031

[45] de Luliis G, Pulerà D. The shark. En: de Luliis G, Pulerà D, editores. The dissection of vertebrates: a laboratory manual. Burlington: Elsevier; 2007, p. 27–77.

[46] Culpepper E, Mylniczenko N. Stingray Anatomy and Ultrasound: Supplement to Chapter 30, Diagnostic imaging. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 303–324.

[47] Walsh CJ, Luer CA. Elasmobranch hematology: Identification of cell types and practical applications. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays, and their relatives, Ohio: Ohio Biological Survey; 2004, p. 307–323.

[48] Zang L, Shimada Y, Nishimura Y, Tanaka T, Nishimura N. A novel, reliable method for repeated blood collection from aquarium fish. Zebrafish 2013;10:425–432. Disponible en: https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0862

[49] Arnold JE, Delaune A. Elasmobranchs. En: Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, editores. Schalm's Veterinary Hematology, Séptima

edición, Wiley; 2022, p. 1166–1175. Disponible en: https://doi.org/10.1002/9781119500537

[50] Lacy ER, Reale E. The elasmobranch kidney. I. Gross anatomy and general distribution of the nephrons. Anatomy and Embryology. 1985;173:23–34. Disponible en: https://doi.org/10.1007/BF00707301

[51] Smith HW. The retention and physiological role of urea in the *Elasmobranchii*. Biological Reviews. 1936;11:49–82. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1936.tb00497.x

[52] Gibaldi M, Boyes RN, Feldman S. Influence of first-pass effect on availability of drugs on oral administration. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1971;60:1338–1340. Disponible en: https://doi.org/10.1002/JPS.2600600909

[53] Greenwell MG, Sherrill J, Clayton LA. Osmoregulation in fish: Mechanisms and clinical implications. Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice. 2003;6:169–189. Disponible en: https://doi.org/10.1016/s1094-9194(02)00021-x

[54] Miller DS, Masereeuw R, Henson J, Karnaky KJ. Excretory transport of xenobiotics by dogfish shark rectal gland tubules. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 1998;275:R697-R705. Disponible en: https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.275.3.r697

[55] Ballantyne JS. Some of the most interesting things we know, and don’t know, about the biochemistry and physiology of elasmobranch fishes (sharks, skates and rays). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2016;199:21–28. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.03.005

[56] Schoen AN, Treberg JR, Wheaton CJ, Mylniczenko N, Gary Anderson W. Energy and corticosteroid mobilization following an induced stress response in an elasmobranch fish, the North Pacific spiny dogfish (*Squalus acanthias suckleyi*). General and Comparative Endocrinology. 2021;310:113799. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113799

[57] Metcalf VJ, Gemmell NJ. Fatty acid transport in cartilaginous fish: Absence of albumin and possible utilization of lipoproteins. Fish Physiology and Biochemistry. 2005;31:55–64. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s10695-005-5124-y

[58] Cray C, Rodriguez M, Field C, McDermott A, Leppert L, Clauss T, Bossart GD. Protein and cholesterol electrophoresis of plasma samples from captive cownose ray (*Rhinoptera bonasus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2015;27:688–695. Disponible en: https://doi.org/10.1177/1040638715607293

[59] Hadfield CA, Clayton LA. Elasmobranch quarantine. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays and their relatives, Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 113–133.

[60] Kajimura M, Walsh PJ, Wood CM. The spiny dogfish *Squalus acanthias* L. maintains osmolyte balance during long-term starvation. Journal of Fish Biology. 2008;72:656–670. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01756.x

[61] Wood CF, Part P, Wright PA. Ammonia and urea metabolism in relation to gill function and acid-base balance in a marine elasmobranch, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*). Journal of Experimental Biology. 1995;198:1545–1558. Disponible en: https://doi.org/10.1242/JEB.198.7.1545

[62] Otway NM. Serum biochemical reference intervals for free-living Sand Tiger sharks (*Carcharias taurus*) from east Australian waters. Veterinary Clinical Pathology. 2015;44:262–274. Disponible en: https://doi.org/10.1111/VCP.12254

[63] Bernal D, Carlson J, Goldman KJ, Lowe CG. Energetics, metabolism and endothermy in sharks and rays. En: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR, editores. Biology of sharks and their relatives. Boca Raton, FL: CRC Press; 2012, p. 212–237. Disponible en: https://doi.org/10.1201/B11867-10

[64] Anderson WG, Taylor JR, Good JP, Hazon N, Grosell M. Body fluid volume regulation in elasmobranch fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part

A: Molecular and Integrative Physiology. 2007;148:3–13. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.018

[65] Oladele O, Olufem B, Agbato O, Jibike G, Adesiyan F. Effect of calcium (hardness of water) on the uptake of ciprofloxacin in bath-medicated African Catfish (*Clarias gariepinus*). Nigerian Veterinary Journal. 2011;31:229-234. Disponible en: https://doi.org/10.4314/nvj.v31i3.68968

[66] Speed CW, Meekan MG, Field IC, McMahon CR, Bradshaw CJA. Heat-seeking sharks: support for behavioral thermoregulation in reef sharks. Marine Ecology Progress Science. 2012;463:231–244. Disponible en: https://doi.org/10.3354/MEPS09864

[67] Thums M, Meekan M, Stevens J, Wilson S, Polovina J. Evidence for behavioural thermoregulation by the world's largest fish. Journal of the Royal Society Interface. 2013;10:1–5. Disponible en: https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0477

[68] McCosker JE. The White Shark, *Carcharodon carcharias*, has a warm stomach. Copeia. 1987;1987:195–197. Disponible en: https://doi.org/10.2307/1446052

[69] Carey FG, Kanwisher JW, Brazier O, Gabrielson G, Casey JG, Pratt HL. Temperature and activities of a White Shark, *Carcharodon carcharias*. Copeia. 1982;1982:254–260. Disponible en: https://doi.org/10.2307/1444603

[70] Dove A, Clauss T, Marancik D, Camus A. Emerging diseases of elasmobranchs in aquaria. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 263–275.

[71] Hyatt MW, Field CL, Clauss TM, Arheart KL, Cray C. Plasma protein electrophoresis and select acute phase proteins in healthy bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*) under managed care. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 2016;47:984–992. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2016-0048.1.

[72] Cain DK, Harms CA, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2004;35:471–476. Disponible en: https://doi.org/10.1638/03-107

[73] Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Veterinary Clincal Pathology. 2012;41:441–453. Disponible en: https://doi.org/10.1111/vcp.12006

[74] Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. Veterinary Clinical Pathology. 2009;38:288–298. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1939-165X.2009.00179.X

[75] Lumsden JH, Mullen K, McSherry BJ. Canine hematology and biochemistry reference values. Canadian Journal of Comparative Medicine. 1979;43:125-131. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1319907/

[76] Lumsden JH, Rowe R, Mullen K. Hematology and biochemistry reference values for the light horse. Canadian Journal of Comparative Medicine 1980;44:32-42. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7397597/

[77] O'Brien M, Murphy MG, Lowe JA. Hematology and clinical chemistry parameters in the cat (*Felis domesticus*). Journal of Nutrition. 1998;128:2678S-2679S. Disponible en: https://doi.org/10.1093/JN/128.12.2678S

[78] Gräsbeck R, Fellman J. Normal values and statistics. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation. 1968;21:193–195. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5708691/

[79] Species360 Zoological Information Management System (ZIMS) [Internet]; 2021 [citado 19 de noviembre de 2022]. Disponible en: https://zims.Species360.org

[80] Arnold J. Hematology of the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs.

Veterinary Clinical Pathology. 2005;34:115–123. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1939-165x.2005.tb00023.x

[81] Grant KR, Campbell TW, Grant K. Hematology and plasma biochemistry value differences between acclimated and recently captive female southern stingrays (*Dasyatis americana*). Journal of Zoo and Aquarium Research. 2020;8(1). Disponible en: https://doi.org/10.19227/jzar.v8I1.254

[82] Haman KH, Norton TM, Thomas AC, Dove ADM, Tseng F. Baseline health parameters and species comparisons among free-ranging Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae*), bonnethead (*Sphyrna tiburo*), and spiny dogfish (*Squalus acanthias*) sharks in Georgia, Florida, and Washington, USA. Journal of Wildlife Diseases. 2012;48:295–306. Disponible en: https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.295

[83] Harms C, Ross T, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo*. Veterinary Clinical Pathology 2002;31:111–115. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2002.tb00289.x

[84] Stacy NI, Hollinger C, Arnold JE, Cray C, Pendl H, Nelson PJ, Harvey JW. Left shift and toxic change in heterophils and neutrophils of non-mammalian vertebrates: A comparative review, image atlas, and practical considerations. Veterinary Clinical Pathology. 2022;51:18–44. Disponible en: https://doi.org/10.1111/VCP.13117

[85] Graham MS, Turner JD, Wood CM. Control of ventilation in the hypercapnic skate *Raja ocellata*: I. Blood and extradural fluid. Respiratory Physiology. 1990;80:259–277. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0034-5687(90)90088-G

[86] Ferreira CM, Field CL, Tuttle AD. Hematological and plasma biochemical parameters of aquarium-maintained cownose rays. Journal of Aquatic Animal Health. 2010;22:123–128. Disponible en: https://doi.org/10.1577/H09-048.1

[87] Morrow W, Pulsford A. Identification of peripheral blood leucocytes of the dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) by electron microscopy. Journal of Fish

Biology. 1980;17:461–475. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1980.TB02779.X.

[88] Stokes EE, Firkin BG. Studies of the peripheral blood of the Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) with particular reference to the thrombocyte. British Journal of Haematology. 1971;20:427–35. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.1971.tb07054.x

[89] Pica A, Lodato A, Grimaldi MC, della Corte F. Morphology, origin and functions of the thrombocytes of Elasmobranchs. Archivo Italiano de Anatomia ed Embriologia. 1990;95:187–207. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2102070/

[90] Persky ME, Jason Williams J, Burks RE, Bowman MR, Ramer JC, Proudfoot JS. Hematologic, plasma biochemistry, and select nutrient values in captive smooth dogfish (*Mustelus canis*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2012;43:842–851. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2012-0002r1.1

[91] Cusack L, Field CL, Hoopes L, McDermott A, Clauss T. Comparison of pre- and postquarantine blood chemistry and hematology values from wild-caught cownose rays (*Rhinoptera bonasus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2016;47:493–500. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2015-0267.1

[92] Dove A, Arnold J, Clauss T. Blood cells and serum chemistry in the world's largest fish: the whale shark *Rhincodon typus*. Aquatic Biology. 2010;9:177–183. Disponible en: https://doi.org/10.3354/ab00252

[93] Morón-Elorza P, Rojo-Solis C, Steyrer C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D Hematology and plasma chemistry reference values in Nursehound Shark (*Scyliorhinus Stellaris*) maintained under human care. Frontierns in Veterinary Sciences. 2022;0:1020. Disponible en: https://doi.org/10.3389/fvets.2022.909834

[94] Species360 Zoological Information Management System (ZIMS). Expected Test Results for *Carcharhinus melanopterus* [Internet]; 2020 [citado 1 de marzo de 2022]. Disponible en: http://zims.species360.org

[95] Species360 Zoological Information Management System (ZIMS). Expected Test Results for *Carcharias taurus* [Internet]; 2021 [citado 1 de marzo de 2022]. Disponible: http://zims.species360.org

[96] Städler G. Weitere beobachtungen über das vorkommen von harnstoff in den organen der plagiostomen. Journal für Praktische Chemie. 1859;76:58–60. Disponible en: https://doi.org/10.1002/prac.18590760113

[97] Kajimura M, Walsh PJ, Mommsen TP, Wood CM. The Dogfish Shark (*Squalus acanthias*) increases both hepatic and extrahepatic ornithine urea cycle enzyme activities for nitrogen conservation after feeding. Physiological and Biochemical Zoology. 2015;79:602–613. Disponible en: https://doi.org/10.1086/501060

[98] Wood C, Kajimura M, Bucking C, Walsh P. Osmoregulation, ionoregulation and acid-base regulation by the gastrointestinal tract after feeding in the elasmobranch (*Squalus acanthias*). Journal of Experimental Biology. 2007;210:1335–1349. Disponible en: https://doi.org/10.1242/jeb.02736

[99] Skomal GB, Mandelman JW. The physiological response to anthropogenic stressors in marine elasmobranch fishes: A review with a focus on the secondary response. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology. 2012;162:146–155. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.002

[100] Renshaw GMC, Kutek AK, Grant GD, Anoopkumar-Dukie S. Forecasting elasmobranch survival following exposure to severe stressors. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology. 2012;162:101–112. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.08.001

[101] Scarponi V, Gennari E, Hughes W. Physiological response to capture stress in endemic Southern African catsharks (family *Scyliorhinidae*). Journal of Fish Biology. 2021;99:186–196. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jfb.14710

[102] Lambert FN, Treberg JR, Anderson WG, Brandt C, Evans AN. The physiological stress response of the Atlantic stingray (*Hypanus sabinus*) to aerial exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative

Physiology. 2018;219–220:38–43. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.009

[103] Brooks EJ, Sloman KA, Liss S, Hassan-Hassanein L, Danylchuk AJ, Cooke SJ, Mandelman JW, Skomal GB, Sims DW, Suski CD. The stress physiology of extended duration tonic immobility in the juvenile lemon shark, *Negaprion brevirostris* (Poey 1868). Journal of Experimental Marine Biology. 2011;1–2:251–360. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.09.017

[104] Cliff G, Thurman GD. Pathological and physiological effects of stress during capture and transport in the juvenile dusky shark, *Carcharhinus obscurus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology. 1984;78:167–173. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90111-7

[105] Ruiz-Jarabo I, Barragán-Méndez C, Jerez-Cepa I, Fernández-Castro M, Sobrino I, Mancera JM, Aerts J. Plasma 1α-hydroxycorticosterone as biomarker for acute stress in catsharks (*Scyliorhinus canicula*). Frontiers in Physiology. 2019;10:1217. Disponible en: https://doi.org/10.3389/FPHYS.2019.01217/bibtex

[106] Anderson WG. The endocrinology of 1α-hydroxycorticosterone in elasmobranch fish: A review. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology. 2012;162:73–80. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.08.015

[107] Dvornak MJ, Joleme H, Hazeres J, Brehob S. Husbandry of Bowmouth Guitarfish, *Rhina ancylostoma*. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Mirray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: recent advances in the care of sharks, rays and their relatives, Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 67–74.

[108] Johnson M, st. Aubin D. Tissue Distribution and Serum Levels of Selected Enzymes in Five Species of Sharks: *Sphyrna lewini, Prionace glauca, Carcharhinus taurus, C. plumbeus and Isurus oxyrinchus*. Proceedings of the 46th Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine ; 2015 Abril 6-10, Chicago, IL: VIN; 2015.

[109] Viñuela J, Ferrer M, Recio F. Age-related variations in plasma levels of alkaline phosphatase, calcium and inorganic phosphorus in chicks of two species of raptors. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 1991;99:49–54. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0300-9629(91)90233-3

[110] Calabuig CP, Ferrer M, Muriel R. Blood Chemistry of Wild Brazilian Coscoroba Swans during Molt. Journal of Wildlife Diseases. 2010;46:591–595. Disponible en: https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.2.591

[111] Omelon S, Georgiou J, Variola F, Dean MN. Colocation and role of polyphosphates and alkaline phosphatase in apatite biomineralization of elasmobranch tesserae. Acta Biomaterialia. 2014;10:3899–3910. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.06.008

[112] Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Age-related changes on serum ggt activity and the assessment of ethanol intake. Alcohol. 2006;41:522–527. Disponible en: https://doi.org/10.1093/alcalc/agl052

[113] Wosnick N, Chaves AP, Niella YV, Takatsuka V, Hazin FHV, Nunes JLS, Morick D. Physiological Impairment as a Result of Bile Accumulation in an Apex Predator, the Tiger Shark (*Galeocerdo cuvier* Péron & Lesueur, 1822). Animals. 2020;10:2030. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ani10112030

[114] Garcia-Garrido L, Muñoz-Chapuli R, de Andres A v. Serum cholesterol and triglyceride levels in *Scyliorhinus canicula* (L.) during sexual maturation. Journal of Fish Biology. 1990;36:499–509. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1990.tb03552.x

[115] Gallagher AJ, Wagner DN, Irschick DJ, Hammerschlag N. Body condition predicts energy stores in apex predatory sharks. Conservation Physiology. 2014;2. Disponible en: https://doi.org/10.1093/conphys/cou022

[116] Greene W, Brookshire G, Delaune AJ. Hematologic and biochemical summary statistics in aquarium-housed spotted eagle rays (*Aetobatus narinari*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2018;49:912–924. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2017-0203.1

[117] Krol L, Allender M, Cray C, George R. Plasma proteins and selected acute-phase proteins in the whitespotted bamboo shark (*Chiloscyllium plagiosum*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2014;45:782–786. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2013-0303.1.

[118] Azim W, Azim S, Ahmed K, Shafi H, Rafi T, Luqman M. Diagnostic significance of serum protein electrophoresis. Biomedica Biochimica Acta. 2004;20:40–44. Disponible en: http://thebiomedicapk.com/articles/2.pdf

[119] Jacobsen S, Kjelgaard-Hansen M, Hagbard Petersen H, Jensen AL. Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. Veterinary Journal. 2006;172:315–319. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.04.021.

[120] Cray C, King E, Rodriguez M, Decker LS, Arheart KL. Differences in protein fractions of avian plasma among three commercial electrophoresis systems. Journal of Avian Medicine and Surgery. 2011;25:102–110. Disponible en: https://doi.org/10.1647/2010-019.1

[121] Hoopes LA, Clauss T, Wetherbee BM, Fox DA. Baseline health and nutritional parameters of wild Sand tigers *Carcharias taurus* sampled in Delaware Bay. Journal of Aquatic Animal Health. 2022;34(3):101–105. Disponible en: https://doi.org/10.1002/aah.10156

[122] Zaias J, Bossart GD, Cray C. Comparison of agarose gel electrophoresis and capillary zone electrophoresis methods using serum from Bottlenose Dolphins (*Tursiops truncatus*). Aquatic Mammals. 2021;47:146–52. Disponible en: https://doi.org/10.1578/am.47.2.2021.146

[123] Gili C, Bonsembiante F, Bonanni R, Giordano A, Ledda S, Beffagna G, Paltrinieri S, Sommer M, Gelain ME. Detection of hereditary bisalbuminemia in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*, Montagu 1821): Comparison between capillary zone and agarose gel electrophoresis. BMC Veterinary Research. 2016;12:1–7. Disponible en: https://doi.org/10.1186/s12917-016-0801-x

[124] Cray C, Rodriguez M, Zaias J. Protein electrophoresis of psittacine plasma. Veterinary Clinical Pathology. 2007;36:64–72. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00184.x

[125] Garner MM. A Retrospective study of disease in elasmobranchs. Veterinary Pathology. 2013;50:377–389. Disponible en: https://doi.org/10.1177/0300985813482147

[126] Maynard J, van Hooidonk R, Harvell CD, Eakin CM, Liu G, Willis BL, Groner AD, Heron SF, Glenn R, Reardon K, Shields J. Improving marine disease surveillance through sea temperature monitoring, outlooks and projections. Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences. 2016;371:1–11. Disponible en: https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0208

[127] Knight IT, Grimes DJ, Colwell RR. Bacterial hydrolysis of urea in the tissues of Carcharhinid sharks. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 1988;45:357–360. Disponible en: https://doi.org10.1139/f88-043.

[128] Grimes DJ, Stemmler J, Hada H, May EB, Maneval D, Hetrick FM, Jones RT, Stoskopft M, Colwell RR. Vibrio species associated with mortality of sharks held in captivity. Microbial Ecology. 1984;10:271–282. Disponible en: https://doi.org/10.1007/bf02010940

[129] Briones V, Fernández A, Blanco M, Ramiro F, de Vicente ML, García J, Goyache J. Haemorrhagic septicaemia by *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* in a black-tip reef shark (*Carcharhinus melanopterus*). Journal of Veterinary Medicine, Series B. 2010;45(1–10):443–445. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1998.tb00814.x

[130] Stidworthy M, Thornton S, James R. A review of pathologic findings in elasmobranchs: a retrospective case series. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch husbandry manual II: Recent advances in the care of sharks, rays and their relatives. Columbus: Ohio Biological Survey; 2017, p. 277–87.

[131] Yanong RPE. Fungal diseases of fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 2003;6:377–400. Disponible en: https://doi.org/10.1016/s1094-9194(03)00005-7.

[132] Fernando N, Hui SW, Tsang CC, Leung SY, Ngan AHY, Leung RWW, Groff JM, Lau SKP, Woo PCY. Fatal Fusarium solani species complex infections in elasmobranchs: the first case report for black spotted stingray (*Taeniura melanopsila*) and a literature review. Mycoses. 2015;58:422–431. Disponible en: https://doi.org/10.1111/myc.12342

[133] Smith AG, Muhvich AG, Muhvich KH, Wood C. Fatal Fusarium solani infections in baby sharks. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1989;27:83–91. Disponible en: https://doi.org/10.1080/02681218980000121.

[134] Muhvich AG, Reimschuessel R, Lipsky MM, Bennett RO. Fusarium solani isolated from newborn bonnethead sharks, *Sphyrna tiburo* (L.). Journal of Fish Diseases. 1989;12:57–62. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb01291.x

[135] Crow GL, Brock JA, Kaiser S. *Fusarium solani* fungal infection of the lateral line canal system in captive scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Hawaii. Journal of Wildlife Diseases. 1995;31:562–5. Disponible en: https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.4.562

[136] Erlacher-Reid CD, Nollens HH, Schmitt TL, St Leger J, Sunico S. Phaeohyphomycosis associated with ossification of the skill and cervical vertebrae in a swell shark (*Cephaloscyllium ventriosum*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2016;47:1081–1085. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2016-0032.1

[137] Lécu A, Herbert R, Tirmarche D, Coulier L, Hénard S. Fighting with Fusariosis Disease on Hammerhead Sharks, *Sphyrna lewini*, Griffith & Smith, 1834. Drum and Croaker The Second Shark Supplement: Edición especial Nº 3 2018:2–16. Disponible en: http://drumandcroaker.org/pdf/SharkSupplement2-2018.pdf

[138] Mylniczenko N. Appendix 1- Elasmobranch Formulary. En: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editores. Elasmobranch Husbandry Manual II, Columbus: Ohio Biological Survey; 2018.

[139] Sharp NJ, Diggles BK, Poortenaar CW, Willis TJ. Efficacy of Aqui-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. Aquaculture. 2004;236:67–83. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.005

[140] Holland KN, Wetherbee BM, Peterson JD, Lowe CG. Movements and distribution of Hammerhead Shark pups on their natal grounds. Copeia. 1993;1993:495. Disponible en: https://doi.org/10.2307/1447150

[141] Keller K. Therapeutic review: terbinafine. Journal of Exotic Pet Medicine. 2012;2:181–185. Disponible en: https://doi.org/10.1053/j.jepm.2012.02.007

[142] Fredholm D v., Mylniczenko ND, Kukanich B. Pharmacokinetic evaluation of meloxicam after intravenous and intramuscular administration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2016;47:736–742. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2015-0253.1

[143] Sostres C, Gargallo CJ, Arroyo MT, Lanas A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology. 2010;24:121–132. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.11.005

[144] Larouche CB, Limoges MJ, Lair S. Absence of acute toxicity of a single intramuscular injection of meloxicam in goldfish (*Carassius auratus auratus*): A randomized controlled trial. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2018;49:617–622. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2018-0077.1

[145] Zaccaroni A, Perez-Lopez M, de la Casa Resino I, Medri G, Ceneri F, Bertini S, Mordenti I, Cortinovis L, Sirri R, Mandrioli L. Short communication: Alteration in blood parameters by enrofloxacin in juvenile lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*, Linnaeus, 1758) after intramuscular injection. Research in

Veterinary Science. 2017;113:1–4. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.005

[146] Sneddon LU. Pain perception in fish: Indicators and endpoints. Institute for Laboratory Animal Research Journal. 2009;50:338–342. Disponible en: https://doi.org/10.1093/ilar.50.4.338

[147] Machin KL. Fish, amphibian, and reptile analgesia. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 2001;4:19–33. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S1094-9194(17)30048-8

[148] Sneddon LU. Pain in aquatic animals. Journal of Experimental Biology. 2015;218:967–976. Disponible en: https://doi.org/10.1242/JEB.088823

[149] Ruiz-Jarabo I, Paullada-Salmerón JA, Jerez-Cepa I, Neto JBG, Bystriansky JS, Mancera JM. Acute Stress in Lesser-Spotted Catshark (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) Promotes Amino Acid Catabolism and Osmoregulatory Imbalances. Animals. 2022;12:1192. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ANI12091192.

[150] Pavlidis M, Digka N, Theodoridi A, Campo A, Barsakis K, Skouradakis G, Samaras A, Tsalafouta A. Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response. Zebrafish. 2013;10:524–31. Disponible en: https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0819

[151] Chatigny F, Creighton CM, Stevens ED. Updated review of fish analgesia. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2018;57:5–12. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29402345/

[152] Serinelli I, Soloperto S, Lai OR. Pain and Pain Management in Sea Turtle and Herpetological Medicine: State of the Art. Animals. 2022;12:697. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ani12060697

[153] Neiffer DL. Anesthesia and Analgesia. En: Hadfield CA, Clayton LA, editores. Clinical Guide to Fish Medicine, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Ltd; 2021, p. 198–212. Disponible en: https://doi.org/10.1002/9781119259886.ch10

[154] Chatigny F, Kamunde C, Creighton CM, Stevens ED. Uses and doses of local anesthetics in fish, amphibians, and reptiles. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2017;56:244–53. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28535859/

[155] Steenbergen PJ, Bardine N. Antinociceptive effects of buprenorphine in zebrafish larvae: An alternative for rodent models to study pain and nociception? Applied Animal Behaviour Science. 2014;152:92–99. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.12.001

[156] Davis MR, Mylniczenko N, Storms T, Raymond F, Dunn JL. Evaluation of intramuscular ketoprofen and butorphanol as analgesics in chain dogfish (*Scyliorhinus retifer*). Zoo Biology. 2006;25:491–500. Disponible en: https://doi.org/10.1002/zoo.20105

[157] Zhuo H, Jin H, Peng H, Huang H. Distribution, pharmacokinetics and primary metabolism model of tramadol in zebrafish. Molecular Medicine Reports 2016;14:5644–5652. Disponible en: https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5956

[158] Zou J, Neumann NF, Holland JW, Belosevic M, Cunningham C, Secombes CJ, Rowley AF. Fish macrophages express a cyclo-oxygenase-2 homologue after activation. Biochemical Journal. 1999;340:153. Disponible en: https://doi.org/10.1042/0264-6021:3400153

[159] Wang T, Mai K, Ai Q. A review of cyclooxygenase-2 role in fish. Austin Journal of Nutrition and Metabolism 2016;3:1037. Disponible en: https://austinpublishinggroup.com/nutrition-metabolism/fulltext/ajnm-v3-id1037.php

[160] Yang T, Forrest SJ, Stine N, Endo Y, Pasumarthy A, Castrop H, et al. Cyclooxygenase cloning in dogfish shark, *Squalus acanthias*, and its role in rectal gland Cl secretion. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2002;283:631–637. Disponible en: https://doi.org/10.1152/ajpregu.00743.2001

[161] Bhandari K, Venables B. Ibuprofen bioconcentration and prostaglandin E2 levels in the Bluntnose minnow *Pimephales notatus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. 2011;153:251–257. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.11.004

[162] Raulic J, Beaudry F, Beauchamp G, Jalenques M, Summa N, Lair S,Youcef WA, Vergneau-Grosset C. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and toxicology study of robenacoxib in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2021;52:529–537. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2020-0130

[163] Mettam JJ, Oulton LJ, McCrohan CR, Sneddon LU. The Efficacy of Three Types of Analgesic Drugs in Reducing Pain in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Applied Animal Behavior Sciecne. 2011;133:265–274. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.06.009

[164] Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, Negele RD. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. Aquatic Toxicology. 2004;68:141–150. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.014

[165] Montesinos A, Ardiaca M, Gilabert JA, Bonvehí C, Oros J, Encinas T. Pharmacokinetics of meloxicam after intravenous, intramuscular and oral administration of a single dose to African grey parrots (*Psittacus erithacus*). Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2017;40:279–284. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvp.12350

[166] Bungay PM, Dedrick RL, Guarino AM. Pharmacokinetic modeling of the dogfish shark (*Squalus acanthias*): Distribution and urinary and biliary excretion of phenol red and its glucuronide. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. 1976;4:377–388. Disponible en: https://doi.org/10.1007/bf01062827.

[167] Zaharko DS, Dedrick RL, Oliverio VT. Prediction of the distribution of methotrexate in the sting rays *Dasyatidae sabina* and *sayi* by use of a model developed in mice. Comparative Biochemistry and Physiology Part A:

Physiology. 1972;42:183–194. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90377-5

[168] Chui YC, Addison RF, Law FCP. Toxicokinetics of 4-chlorodiphenyl ether in the skate (*Raja ocellata*) following intravenous administration. Aquatic Toxicology. 1986;8:41–49. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0166-445x(86)90071-8.

[169] Guarino AM, James MO, Bend JR. Fate and distribution of the herbicides 2,4-dichlor-phenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T) in the dogfish shark. Xenobiotica. 1977;7:623–631. Disponible en: https://doi.org/10.3109/00498257709038684.

[170] Adamson RH, Guarino AM. The effect of foreign compounds on elasmobranchs and the effect of elasmobranchs on foreign compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. 1972;42:171–82. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0300-9629(72)90376-3.

[171] Gorbi S, Pellegrini D, Tedesco S, Regoli F. Antioxidant efficiency and detoxification enzymes in spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. Marine Environmental Research. 2004;58:293–297. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.074

[172] Hunter RP, Isaza R. Concepts and issues with interspecies scaling in zoological pharmacology. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2008;39:517–526. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2008-0041.1

[173] Schattenkirchner M. Meloxicam: a selective COX-2 inhibitor non-steroidal anti-inflammatory drug. Expert Opinion on Investigational Drugs. 1997;6:321–334. Disponible en: https://doi.org/10.1517/13543784.6.3.321

[174] Naidoo V, Wolter K, Cromarty AD, Bartels P, Bekker L, McGaw L, Taggart MA, Cuthbert R, Swan GE. The pharmacokinetics of meloxicam in vultures. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2008;31:128–34. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00923.x

[175] Doig PA, Purbrick KA, Hare JE, McKeown DB. Clinical efficacy and tolerance of meloxicam in dogs with chronic osteoarthritis. The Canadian Veterinary Journal 2000;41:296–300. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10769766/

[176] Moeremans I, Devreese M, de Baere S, Croubels S, Hermans K. Pharmacokinetics and absolute oral bioavailability of meloxicam in guinea pigs (*Cavia porcellus*). Veterinary Anaesthesia and Analgesia. 2019;46:548–555. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.vaa.2018.11.011

[177] Cole G, Paul-Murphy J, Krugner-Higby L, Klauer J, Medlin S, Keuler N, Sladky KK. Analgesic effects of intramuscular administration of meloxicam in Hispaniolan parrots (*Amazona ventralis*) with experimentally induced arthritis. American Journal of Veterinary Research. 2009;70:1471–1476. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.70.12.1471

[178] Carpenter JW, Marion CJ. Exotic Animal Formulary: Quinta edición. St. Louis (Missouri 63043): Elsevier Inc; 2017.

[179] Luger P, Daneck K, Engel W, Trummlitz G, Wagner K. Structure and physicochemical properties of meloxicam, a new NSAID. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 1996;4:175–187. Disponible en: https://doi.org/10.1016/0928-0987(95)00046-1

[180] O'Neil MJ, Smith A, Hechelman PE, editores. The Merck Index: Decimotercera edición - An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co. Inc.; 2001.

[181] Olkkola KT, Brunetto A v., Mattila MJ. Pharmacokinetics of oxicam nonsteroidal anti-inflammatory agents. Clinical Pharmacokinetics. 2012;26:107–120. Disponible en: https://doi.org/10.2165/00003088-199426020-00004.

[182] Schmid J, Busch U, Trummlitz G, Prox A, Kaschke S, Wachsmuth H. Meloxicam: metabolic profile and biotransformation products in the rat. Xenobiotica. 2008;25:1219–1236. Disponible en: https://doi.org/10.3109/00498259509046678

[183] Lascelles B, McFarland JM, Swann H. Guidelines for safe and effective use of NSAIDs in dogs. Veterinary Therapeutics 2005;6:237–251. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16299670/

[184] Wooten JG, Lascelles BDX, Cook VL, Law JM, Blikslager AT. Evaluation of the relationship between lesions in the gastroduodenal region and cyclooxygenase expression in clinically normal dogs. American Journal of Veterinary Research. 2010;71:630–5. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.71.6.630

[185] Wooten JG, Blikslager AT, Ryan KA, Marks SL, Law JM, Lascelles BDX. Cyclooxygenase expression and prostanoid production in pyloric and duodenal mucosae in dogs after administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. American Journal of Veterinary Research. 2008;69:457–464. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.69.4.457

[186] Li S, Dou W, Tang Y, Goorha S, Ballou LR, Blatteis CM. Acetaminophen: Antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 2008;85:89–99. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2007.10.007

[187] Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002;99:13926–13931. Disponible en: https://doi.org/10.1073/pnas.162468699

[188] Lucas R, Warner TD, Vojnovic I, Mitchell JA, Mitchell JA. Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 2005;19:1–15. https://doi.org/10.1096/fj.04-2437fje

[189] Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy K, Busija DW. Putative Cyclooxygenase-3 Expression in Rat Brain Cells. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2003;23:1287–1292. Disponible en: https://doi.org/10.1097/01.wcb.0000090681.07515.81

[190] Cabrera DM, Janech MG, Morinelli TA, Miller DH. A thromboxane A(2) system in the Atlantic stingray, *Dasyatis sabina*. General and Comparative Endocrinology. 2003;130:157–164. https://doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00586-5

[191] Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. Pharmacological Reviews. 2004;56:387–437. Disponible en: https://doi.org/10.1124/pr.56.3.3

[192] Braga PC. Ketoprofen: i.c.v. injection and electrophysiological aspects of antinociceptive effect. European Journal of Pharmacology. 1990;184:273–280. https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90619-h

[193] Harris RC, Harris C. Interactions between COX-2 and the renin–angiotensin system in the kidney. Acta Physiologica Scandinavica. 2003;177:423–7. Disponible en: https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2003.01101.x

[194] Parkinson JF. Lipoxin and synthetic lipoxin analogs: An overview of anti-inflammatory functions and new concepts in immunomodulation. Inflammation and Allergy - Drug Targets. 2006;5:91–106. Disponible en: https://doi.org/10.2174/187152806776383125

[195] Papich MG. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in small animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. 2008;38:1243–1266. Disponible en: https://doi.org/10.1016/J.CVSM.2008.09.002

[196] Nishiyama T. Analgesic effects of intrathecally administered celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in the tail flick test and the formalin test in rats. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 2006;50:228–233. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1399-6576.2006.00921.x

[197] Davies NM, Skjodt NM. Clinical pharmacokinetics of meloxicam: A cyclo-oxygenase-2 preferential nonsteroidal anti-inflammatory drug. Clinical Pharmacokinetics. 1999;36:115–126. Disponible en: https://doi.org/10.2165/00003088-199936020-00003

[198] Beretta C, Garavaglia G, Cavalli M. COX-1 and COX-2 inhibition in horse blood by phenylbutazone, flunixin, carprofen and meloxicam: an *in vitro* analysis. Pharmacological Research. 2005;52:302–306. Disponible en: https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2005.04.004

[199] Brideau C, van Staden C, Chan CC. *In vitro* effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats. American Journal of Veterinary Research. 2001;62:1755–1760. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1755

[200] Streppa HK, Jones CJ, Budsberg SC. Cyclooxygenase selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in canine blood. American Journal of Veterinary Research. 2002;63:91–4. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.2002.63.91

[201] Mahmood KT, Ashraf M, Amin F, Ul Haq I, Ud Din Ahmad M. Pharmacokinetics of ecofriendly meloxicam in healthy goats. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2011;3:1035–1041. Disponible en: https://www.proquest.com/docview/854444845?pq-origsite=gscholar&fromopenview=true

[202] Mosher RA, Coetzee JF, Cull CA, Gehring R, Kukanich B. Pharmacokinetics of oral meloxicam in ruminant and preruminant calves. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2012;35:373–381. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01331.x

[203] Gschwend MH, Erenmemişoğlu A, Martin W, Tamur U, Kanzik I, Hincal A. Pharmacokinetic and bioequivalence study of meloxicam tablets in healthy male subjects. Arzneimittelforschung. 2007;57:264–268. Disponible en: https://doi.org/10.1055/s-0031-1296616/bib

[204] Turner P v, Chen Cheng H, Taylor Michael W. Pharmacokinetics of meloxicam in rabbits after single and repeat oral dosing. Comparative Medicine. 2006;56:63–67. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2007-0115.1.

[205] Simeone CA, Nollens HH, Meegan JM, Schmitt TL, Jensen ED, Papich MG, Smith CR. Pharmacokinetics of single dose oral meloxicam in bottlenose dolphins

(*Tursiops truncatus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2014;45:594–599. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2013-0281r1.1

[206] Miller KA, Hill NJ, Carrasco SE, Patterson MM. Pharmacokinetics and safety of intramuscular meloxicam in Zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Journal of the American Association of Laboratory Animal Science. 2019;58:589–593. Disponible en: https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-19-000032

[207] Divers SJ, Papich M, McBride M, Stedman NL, Perpinan D, Koch TF, Hernandez SM, Barron GH, Pethel M, Budsberg SC. Pharmacokinetics of meloxicam following intravenous and oral administration in green iguanas (*Iguana iguana*). American Journal of Veterinary Research. 2010;71:1277–1283. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.71.11.1277

[208] Ingrao JC, Johnson R, Tor ER, Gu Y, Litman M. Aqueous Stability and oral pharmacokinetics of meloxicam and carprofen in male C57BL/6 mice. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 2013;52:553–559. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24041210/

[209] Montoya L, Ambros L, Kreil V, Bonafine R, Albarellos G, Hallu R, Soraci A. A pharmacokinetic comparison of meloxicam and ketoprofen following oral administration to healthy dogs. Veterinary Research Communications. 2004;28:415–428. Disponible en: https://doi.org/10.1023/b:verc.0000034995.81994.49

[210] Lehr T, Narbe R, JÖns O, Kloft C, Staab A. Population pharmacokinetic modelling and simulation of single and multiple dose administration of meloxicam in cats. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2010;33:277–286. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01134.x

[211] Rojo-Solis C, Ros-Rodrigues JM, Valls M, Alvaro T, Gilabert JA, Encinas T, García-Párraga D. Pharmacokinetics of meloxicam (MetacamTM) after intravenous, intramuscular and oral administration to red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Tulsa, OK: 2009, p. 228.

[212] Lai OR, di Bello A, Soloperto S, Freggi D, Marzano G, Cavaliere L, Crescenzo G. Pharmacokinetic behavior of meloxicam in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) after intramuscular and intravenous administration. Journal of Wildlife Diseases. 2015;51:509–12. Disponible en: https://doi.org/10.7589/2014-03-069

[213] Norton TM, Clauss T, Overmeyer R, Stowell S, Kaylor M, Cox S. Multi-injection pharmacokinetics of meloxicam in Kemp's Ridley (*Lepidochelys kempii*) and Green (*Chelonia mydas*) sea turtles after subcutaneous administration. Animals. 2021;11:3522. Disponible en: https://doi.org/10.3390/ani11123522

[214] Guo F, Li Y, Yang D, Jiang X, Ren J, Miao Y, Ding F, Yu Z. Comparative pharmacokinetics of meloxicam oil suspension in pigs at different dosages following intramuscular administration. Research in Veterinary Science. 2021;139:172–176. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.017

[215] Cary CD, Lukovsky-Akhsanov NL, Gallardo-Romero NF, Tansey CM, Ostergaard SD, Taylor WD, Morgan CN, Powell N, Lathrop GW, Hutson CL Pharmacokinetic Profiles of Meloxicam and Sustained-release Buprenorphine in Prairie Dogs (*Cynomys ludovicianus*). Journal of American Association of Laboratory Animal Science. 2017;56:160–165. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28315645/

[216] Busch U, Schmid J, Heinzel G, Schmaus H, Baierl J, Huber C, Roth W. Pharmacokinetics of Meloxicam in Animals and The Relevance to Humans. Drug Metabolism and Disposition 1998;26(6):576–584. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9616195/

[217] Baert K, de Backer P. Comparative pharmacokinetics of three non-steroidal anti-inflammatory drugs in five bird species. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2003;134:25–33. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00184-9

[218] Baert K, de Backer P. Disposition of sodium salicylate, flunixin and meloxicam after intravenous administration in broiler chickens. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2002;25:449–453. Disponible en: https://doi.org/10.1046/J.1365-2885.2002.00441.x

[219] Lacasse C, Gamble KC, Boothe DM. Pharmacokinetics of a single dose of intravenous and oral meloxicam in Red-tailed Hawks (*Buteo jamaicensis*) and Great Horned Owls (*Bubo virginianus*). Journal of Avian Medicine and Surgery. 2013;27:204–210. Disponible en: https://doi.org/10.1647/2012-044

[220] Zordan MA, Papich MG, Pich AA, Unger KM, Sánchez CR. Population pharmacokinetics of a single dose of meloxicam after oral and intramuscular administration to captive lesser flamingos (*Phoeniconaias minor*). American Journal of Veterinary Research. 2016;77:1311–1317. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.77.12.1311

[221] Türck D, Roth W, Busch U. A review of the clinical pharmacokinetics of meloxicam. British Journal of Rheumatology. 1996;35 Suppl 1:13–16. Disponible en: https://doi.org/10.1093/rheumatology/35.suppl_1.13

[222] Moore RA, Derry S, Wiffen PJ, Straube S. Effects of food on pharmacokinetics of immediate release oral formulations of aspirin, dipyrone, paracetamol and NSAIDs - a systematic review. British Journal of Clinical Pharmacology. 2015;80:381–388. Disponible en: https://doi.org/10.1111/bcp.12628

[223] Montesinos A. Farmacología del meloxicam en loros grises y sus efectos farmacodinámicos en la estructura renal y los parámetros renales [Tesis doctoral]. Las Palmas de Gran Canaria: Universidad de las Palmas de Gran Canaria; 2019.

[224] Chesné C, Guyomard C, Guillouzo A, Schmid J, Ludwig E, Sauter T. Metabolism of Meloxicam in human liver involves cytochromes P4502C9 and 3A4. Xenobiotica. 1998;28:1–13. Disponible en: https://doi.org/10.1080/004982598239704

[225] Engelhardt G. Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal anti-inflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2. British Journal of Rheumatology. 1996;35:4–12. Disponible en: https://doi.org/10.1093/rheumatology/35.suppl_1.4

[226] Euller-Ziegler L, Velicitat P, Bluhmki E, Türck D, Scheuerer S, Combe B. Meloxicam: a review of its pharmacokinetics, efficacy and tolerability following

intramuscular administration. Inflammation Research. 2001;50:5–9. Disponible en: https://doi.org/10.1007/PL00022377

[227] Grude P, Guittard J, Garcia C, Daoulas I, Thoulon F, Ebner T. Excretion mass balance evaluation, metabolite profile analysis and metabolite identification in plasma and excreta after oral administration of [14C]-meloxicam to the male cat: preliminary study. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2010;33:396–407. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2010.01157.x

[228] Carpenter JW, Pollock CG, Koch DE, Hunter RP. Single and multiple-dose pharmacokinetics of meloxicam after oral administration to the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2009;40:601–606. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2007-0115.1

[229] Noble GK, Edwards S, Lievaart J, Pippia J, Boston R, Raidal SL. Pharmacokinetics and safety of single and multiple oral doses of meloxicam in adult horses. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2012;26:1192–1201. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2012.00976.x

[230] Sinclair MD, Mealey KL, Matthews NS, Peck KE, Taylor TS, Bennett BS. Comparative pharmacokinetics of meloxicam in clinically normal horses and donkeys. American Journal of Veterinary Research. 2006;67:1082–1085. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.67.6.1082

[231] Shukla M, Singh G, Sindhura BG, Telang AG, Rao GS, Malik JK. Comparative plasma pharmacokinetics of meloxicam in sheep and goats following intravenous administration. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 2007;145:528–532. Disponible en: https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2007.01.020

[232] Wasfi IA, al Ali WA, Agha BA, Kamel AM, al Biriki NA, al Neaimi KM. The pharmacokinetics and metabolism of meloxicam in camels after intravenous administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2012;35:155–162. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2011.01312.x

[233] Wright TL, Eshar D, McCullough C, Warner M, Kukanich B. Pharmacokinetics of single-dose subcutaneous meloxicam injections in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). Journal of the American Association of Laboratory Animal Science. 2017;56:539–543. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28903825

[234] Chinnadurai SK, Messenger KM, Papich MG, Harms CA. Meloxicam pharmacokinetics using nonlinear mixed-effects modeling in ferrets after single subcutaneous administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2014;37:382–387. Disponible en: https://doi.org/10.1111/JVP.12099

[235] Kreuder AJ, Coetzee JF, Wulf LW, Schleining JA, KuKanich B, Layman LL, Plummer PJ. Bioavailability and pharmacokinetics of oral meloxicam in llamas. BMC Veterinary Research. 2012;8:1–11. Disponible en: https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-85

[236] Kimble B, Black LA, Li KM, Valtchev P, Gilchrist S, Gillett A,Higgins DP, Krockenberger MB, Govendir M. Pharmacokinetics of meloxicam in koalas (*Phascolarctos cinereus*) after intravenous, subcutaneous and oral administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2013;36:486–493. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvp.12038

[237] Shao HT, Yang F, Chen JC, Zhang M, Song ZW, Yang F. Pharmacokinetics of meloxicam in laying hens after single intravenous, oral, and intramuscular administration. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2022;45:488–494. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvp.13081

[238] Boonstra JL, Cox SK, Martin-Jimenez T. Pharmacokinetics of meloxicam after intramuscular and oral administration of a single dose to American flamingos (*Phoenicopertus ruber*). American Journal of Veterinary Research. 2017;78:267–273. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.78.3.267

[239] Uney K, Altan F, Aboubakr M, Cetin G, Dik B. Pharmacokinetics of meloxicam in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*) after single intravenous and

intramuscular injections. American Journal of Veterinary Research. 2016;77:439–444. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.77.5.439.

[240] di Salvo A, Giorgi M, Catanzaro A, Deli G, della Rocca G. Pharmacokinetic profiles of meloxicam in turtles (*Trachemys scripta scripta*) after single oral, intracoelomic and intramuscular administrations. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2016;39:102–105. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvp.12254

[241] Norton TM, Clauss T, Sommer R, Stowell S, Kaylor M, Thistle C, Cox S. Pharmacokinetic behavior of meloxicam in loggerhead (*Caretta caretta*), Kemp's ridley (*Lepidochelys kempii*), and green (*Chelonia mydas*) sea turtles after subcutaneous administration. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2021;52:295–299. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2019-0143

[242] Smith EM. Cytochrome P450 drug metabolism and protein induction and inhibition in fish liver microsomes [Tesis de master]. Ontario: McMaster University; 2009. Disponible en: https://macsphere.mcmaster.ca/bitstream/11375/9496/1/fulltext.pdf

[243] Ribalta C, Solé M. *In Vitro* Interaction of Emerging Contaminants with the Cytochrome P450 System of Mediterranean Deep-Sea Fish. Environmental Science and Techology. 2014;48:12327–12335. Disponible en: https://doi.org/10.1021/es5029603

[244] Khalil NY, Aldosari KF. Meloxicam. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. 2020;45:159–197. Disponible en: https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2019.10.006

[245] Churchill PC, Malvin RL, Churchill MC. Lack of renal effects of DOCA, ACTH, spironolactone, and angiotensin II in *Squalus acanthias*. Journal of Experimental Zoology. 1985;234:17–22. Disponible en: https://doi.org/10.1002/jez.1402340104

[246] Autefage A, Gosselin J. Efficacy and safety of the long-term oral administration of carprofen in the treatment of osteoarthritis in dogs. Revenue de Médicine Vetérinaire. 2007;158(3):119–27.

[247] Luna SPL, Basílio AC, Steagall PVM, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, Brandão CVS. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. American Journal of Veterinary Research. 2007;68:258–264. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.68.3.258

[248] Mansa S, Palmér E, Grøndahl C, Lønaas L, Nyman G. Long-term treatment with carprofen of 805 dogs with osteoarthritis. Veterinary Record. 2007;160:427–430. Disponible en: https://doi.org/10.1136/vr.160.13.427

[249] Kukanich B, Bidgood T, Knesl O. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. Veterinary Anaesthesia and Analgesia. 2012;39:69–90. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1467-2995.2011.00675.x

[250] Raekallio MR, Hielm-Björkman AK, Kejonen J, Salonen HM, Sankari SM. Evaluation of adverse effects of long-term orally administered carprofen in dogs. Journal of American Veterinary Medicine Association. 2006;228:876–880. Disponible en: https://doi.org/10.2460/javma.228.6.876

[251] Summa N, Guzman D, Larrat S, Troncy E, Bird D, Lair S, Fitzgerald G. Evaluation of high dosages of oral meloxicam in american kestrels (*Falco sparverius*). Journal of Avian Medicine and Surgery. 2017;31:108–116. Disponible en: https://doi.org/10.1647/2015-150

[252] Raušer P, Lexmaulová L, Srnec R, Urbanová L, Proks P, Nečas A. Effects of carprofen or meloxicam on selected haemostatic variables in miniature pigs after orthopaedic surgery. Acta Veterinaria Brno. 2012;80:401–405. Disponible en: https://doi.org/10.2754/avb201180040401

[253] Pollmeier M, Toulemonde C, Fleishman C, Hanson PD. Clinical evaluation of firocoxib and carprofen for the treatment of dogs with osteoarthritis. Veterinary Record. 2006;159:547–551. Disponible en: https://doi.org/10.1136/vr.159.17.547

[254] Hong TT, Huang J, Barrett TD, Lucchesi BR. Effects of cyclooxygenase inhibition on canine coronary artery blood flow and thrombosis. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2008;294:145–155. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00646.2007

[255] Ngo SNT, Addison CJ. Are COX-2 Selective NSAIDs associated with less GI, renal, and cardiovascular side effects: evidence from animals treated with NSAIDs. Annual Research and Review in Biology. 2018;29:1–8. Disponible en: https://doi.org/10.9734/arrb/2018/45152

[256] Moore N, Pollack C, Butkerait P. Adverse drug reactions and drug–drug interactions with over-the-counter NSAIDs. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2015;11:1061. Disponible en: https://doi.org/10.2147/tcrm.S79135

[257] Perazella MA, Tray K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The American Journal of Medicine. 2001;111:64–67. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S0002-9343(01)00757-4

[258] Brainard BM, Meredith CP, Callan MB, Budsberg SC, Schofer FS, Driessen B, Otto CM. Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs. American Journal of Veterinary Research. 2007;68:251–257. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.68.3.251

[259] Monteiro-Steagall BP, Steagall PVM, Lascelles BDX. Systematic Review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2013;27:1011–1019. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvim.12127

[260] Longley MJ, Baines SJ, Chanoit G. Colonic perforation in 4 dogs following treatment with meloxicam. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2022;32:413–419. Disponible en: https://doi.org/10.1111/vec.13170

[261] Enberg TB, Braun LD, Kuzma AB. Gastrointestinal perforation in five dogs associated with the administration of meloxicam. Journal of Veterinary

Emergency and Critical Care 2006;16:34–43. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2005.00157.x

[262] Peterson WL, Cryer B. COX-1–Sparing NSAIDs—Is the Enthusiasm Justified? Journal of the American Medical Association. 1999;282:1961–1963. Disponible en: https://doi.org/10.1001/jama.282.20.1961

[263] D'Arcy-Moskwa E, Noble GK, Weston LA, Boston R, Raidal SL. Effects of meloxicam and phenylbutazone on equine gastric mucosal permeability. Journal of Veterinary Internal Medicine. 2012;26:1494–1499. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.01004.x

[264] Narita T, Sato R, Motoishi K, Tani K, Naito Y, Hara S. The interaction between orally administered non-steroidal anti-inflammatory drugs and prednisolone in healthy dogs. Journal of Veterinary Medical Science 2007;69:353–363. Disponible en: https://doi.org/10.1292/jvms.69.353

[265] Reed S. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced duodenal ulceration and perforation in a mature rottweiler. The Canadian Veterinary Journal. 2002;43(12):971-972. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12561693

[266] Hernández-Avalos I, Valverde A, Ibancovichi-Camarillo JA, Sánchez-Aparicio P, Recillas-Morales S, Osorio-Avalos J, Rodríguez-Velázquez D, Miranda-Cortés AE. Clinical evaluation of postoperative analgesia, cardiorespiratory parameters and changes in liver and renal function tests of paracetamol compared to meloxicam and carprofen in dogs undergoing ovariohysterectomy. PLoS One. 2020;15:e0223697. Disponible en: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223697

[267] Khan KNM, Venturini CM, Bunch RT, Brassard JA, Koki AT, Morris DL, Trumo BE, Maziasz TJ, Alden CL. Interspecies differences in renal localization of cyclooxygenase isoforms: Implications in nonsteroidal antiinflammatory drug-related nephrotoxicity. Toxicologic Pathology. 1998;26:612–620. Disponible en: https://doi.org/10.1177/019262339802600504

[268] Toutain PL, Cester CC. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships and dose response to meloxicam in horses with induced arthritis in the right carpal

joint. American Journal of Veterinary Research. 2004;65:1533–1541. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.1533

[269] Loboz KK, Shenfield GM. Drug combinations and impaired renal function – the 'triple whammy.' British Journal of Clinical Pharmacology. 2005;59:239–243. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.0306-5251.2004.2188.x

[270] Raidal SL, Hughes KJ, Charman AL, Nielsen SG, Phillips JK, Noble GK. Effects of meloxicam and phenylbutazone on renal responses to furosemide, dobutamine, and exercise in horses. American Journal of Veterinary Research. 2014;75:668–679. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.75.7.668

[271] Rodríguez F, Llinás MT, González JD, Rivera J, Salazar FJ. Renal changes induced by a cyclooxygenase-2 inhibitor during normal and low sodium intake. Hypertension. 2000;36:276–281. Disponible en: https://doi.org/10.1161/01.hyp.36.2.276

[272] Burukoglu D, Baycu C, Taplamacioglu F, Sahin E, Bektur E. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory meloxicam on stomach, kidney, and liver of rats. Toxicology and Industrial Health. 2016;32:980–986. https://doi.org/10.1177/0748233714538484

[273] Staerkel P, Horsmans Y. Meloxicam-induced liver toxicity. Acta Gastro-enterologica Belgica. 1999;62(2):255–256. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10427794

[274] Hassan MH, Ghobara MM. Antifibrotic effect of meloxicam in rat liver: role of nuclear factor kappa B, proinflammatory cytokines, and oxidative stress. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2016;389:971–983. Disponible en: https://doi.org/10.1007/S00210-016-1263-1

[275] Delk KW, Carpenter JW, KuKanich B, Nietfeld JC, Kohles M. Pharmacokinetics of meloxicam administered orally to rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) for 29 days. American Journal of Veterinary Research. 2014;75:195–199. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.75.2.195

[276] Boulton-Jones JM, Geddes CG, Heinzel G, Türck D, Nehmiz G, Bevis PJR. Meloxicam pharmacokinetics in renal impairment. British Journal of Clinical Pharmacology. 1997;43:35–40. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1997.tb00135.x

[277] Busch U, Heinzel G, Narjes H, Nehmiz G, Türck D, Krimmer J, Röshc W. Pharmacokinetics of meloxicam in patients with hepatic cirrhosis in comparison with healthy volunteers. Clinical Drug Investigation. 2012;11:97–107. Disponible en: https://doi.org/10.2165/00044011-199611020-00005

[278] KuKanich K, George C, Roush JK, Sharp S, Farace G, Yerramilli M, Peterson S, Grauer GF. Effects of low-dose meloxicam in cats with chronic kidney disease. Journal of Feline Medicine and Surgery. 2021;23:138–148. Disponible en: https://doi.org/10.1177/1098612x20935750

[279] Budsberg SC, Stoker AM, Johnston SA, Liska W, Reno LR, Cook JL. *In vitro* effects of meloxicam on metabolism in articular chondrocytes from dogs with naturally occurring osteoarthritis. American Journal of Veterinary Research. 2013;74:1198–1205. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.74.9.1198

[280] Nagy E, Vajda E, Vari C, Sipka Ś, Frr AM, Horvth E. Meloxicam ameliorates the cartilage and subchondral bone deterioration in monoiodoacetate-induced rat osteoarthritis. Peer Journal. 2017;e3185. https://doi.org/10.7717/peerj.3185

[281] Argoff CE, Gloth FM. Topical nonsteroidal anti-inflammatory drugs for management of osteoarthritis in long-term care patients. Therapeutics and Clinical Risk Management. 2011;7:393. https://doi.org/10.2147/tcrm.S24458

[282] de Grauw JC, van de Lest CHA, Brama PAJ, Rambags BPB, van Weeren PR. In vivo effects of meloxicam on inflammatory mediators, MMP activity and cartilage biomarkers in equine joints with acute synovitis. Equine Veterinary Journal. 2009;41:693–699. Disponible en: https://doi.org/10.2746/042516409x436286

[283] Blois SL, Allen DG, Wood RD, Conlon PD. Effects of aspirin, carprofen, deracoxib, and meloxicam on platelet function and systemic prostaglandin

concentrations in healthy dogs. American Journal of Veterinary Research. 2010;71:349–358. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.71.3.349

[284] Jahr JS, Searle S, McCallum S, Mack R, Minger K, Freyer A, Du W, Hobson S. Platelet function: meloxicam intravenous in whole blood samples from healthy volunteers. Clinical Pharmacology in Drug Development. 2020;9:841–848. Disponible en: https://doi.org/10.1002/cpdd.772

[285] Rinder HM, Tracey JB, Souhrada M, Wang C, Gagnier RP, Wood CC. Effects of meloxicam on platelet function in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Journal of Clinical Pharmacology 2002;42:881–886. Disponible en: https://doi.org/10.1177/009127002401102795

[286] Cathcart CJ, Brainard BM, Reynolds LR, Al-Nadaf S, Budsberg SC. Lack of inhibitory effect of acetylsalicylic acid and meloxicam on whole blood platelet aggregation in cats. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care 2012;22:99–106. Disponible en: https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2011.00681.x

[287] Anderson KE, Austin J, Escobar EP, Carbone L. Platelet aggregation in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in response to short-term meloxicam administration. Journal of the American Association of Laboratory Animal Science. 2013;52(2):590–594. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24041216

[288] Slingsby LS, Waterman-Pearson AE. Comparison between meloxicam and carprofen for postoperative analgesia after feline ovariohysterectomy. Journal of Small Animal Practice 2002;43:286–289. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1748-5827.2002.tb00074.x

[289] Varro V, Csernay L, Jávor T. Experimental phenylbutazone ulcer in dogs. Gastroenterology. 1959;37:463–467. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S0016-5085(19)35393-4

[290] Montesinos A, Encinas T, Ardiaca M, Gilabert JA, Bonvehí C, Orós J. Pharmacokinetics of meloxicam during multiple oral or intramuscular dose administration to African grey parrots (*Psittacus erithacus*). American Journal of

Veterinary Research. 2019;80:201–207. Disponible en: https://doi.org/10.2460/ajvr.80.2.201

[291] Lovy J, Speare DJ, Wright GM. Pathological effects caused by chronic treatment of rainbow trout with indomethacin. Journal of Aquatic Animal Health. 2007;19:94–98. Disponible en: https://doi.org/10.1577/h06-042.1

[292] Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V, Zivna D, Blahova J, Marsalek P, Zelníckova L, Bartos M, Casuscelli di Toco F, Faggio C. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. Neuro Endocrinology Letters. 2013;34:102–108. Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362101

[293] Weber ES. Fish analgesia: Pain, stress, fear aversion, or nociception? Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice. 2011;14:21–32. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.cvex.2010.09.002

[294] Martin M, Smith S, Kleinhenz M, Magnin G, Lin Z, Kuhn D, Montgomery S, Coetzee J. Comparative Pharmacokinetics and Tissue Concentrations of Flunixin Meglumine and Meloxicam in Tilapia (*Oreochromis spp*.). Fishes. 2021;6(4):68. Disponible en: https://doi.org/10.3390/fishes6040068

[295] Corum O, Terzi E, Durna Corum D, Uney K. Pharmacokinetics and bioavailability of meloxicam in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock following intravascular, intramuscular, and oral administrations. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 2021;45:213–219. Disponible en: https://doi.org/10.1111/jvp.13031

[296] Kane LP, O'Connor MR, Papich MG. Pharmacokinetics of a single dose intramuscular and oral meloxicam in Yellow Stingrays (*Urobatis jamaicensis*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2022;53:153–158. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2021-0123

[297] Captive Elasmobranch Census – AES | American Elasmobranch Society [Internet]; 2008 [citado 10 de septiembre de 2022]. Disponible en: https://elasmo.org/members/census/

[298] Samuelsen OB. Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review. Aquaculture. 2006;255:55–75. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.008

[299] Stamper MA. Immobilization of elasmobranchs. En: Smith MD, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, editores. Elasmobranch husbandry manual: captive care of sharks, rays and their relatives, Ohio: Ohio Biological Survey; 2004, p. 281–295.

[300] Hutchinson TH, Madden JC, Naidoo V, Walker CH. Comparative metabolism as a key driver of wildlife species sensitivity to human and veterinary pharmaceuticals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 2014;369. Disponible en: https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0583

[301] Morón-Elorza P, Cañizares-Cooz D, Rojo-Solis C, Álvaro-álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Pharmacokinetics of the anti-iflammatory drug meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to Undulate Skates (*Raja undulata*). Veterinary Sciences. 2022;9(5):216. Disponible en: https://doi.org/10.3390/vetsci9050216

[302] Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to Large-spotted Catsharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2021;53:393–401. Disponible en: https://doi.org/https://doi.org/10.1638/2021-0144

[303] Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Pharmacokinetics of meloxicam after multiple 1.5 mg/kg administration to Nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*). [En revisión para su publicación en Veterinary Anaesthesia and Analgesia].

[304] Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Pharmacokinetic studies in elasmobranchs: meloxicam administered at 0.5 mg/kg using intravenous, intramuscular and oral routes to Large-spotted Catsharks (*Scyliorhinus stellaris*). Frontiers in Veterinary Science. 2022:9. Disponible en: https://doi.org/10.3389/fvets.2022.845555

[305] Pérez-Rojas JG, Mejía-Falla PA, Navia AF, Tarazona AM, Pardo-Carrasco SC. Hematology and blood biochemistry profile of the freshwater stingray *Potamotrygon magdalenae* as a tool for population assessment in artificial environments. Brazilian Journal of Biology. 2022;82. Disponible en: https://doi.org/10.1590/1519-6984.233780

[306] Magalhães KW, Lima C, Piran-Soares AA, Marques EE, Hiruma-Lima CA, Lopes-Ferreira M. Biological and biochemical properties of the Brazilian Potamotrygon stingrays: Potamotrygon cf. scobina and *Potamotrygon gr. orbignyi.* Toxicon. 2006;47:575–583. https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.028

[307] Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Pharmacokinetics of meloxicam after single 1.5 mg/kg intramuscular administration to large-spotted cat sharks (*Scyliorhinus stellaris*) and its effects on hematology and plasma biochemistry. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2022;53(2):393–401. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2021-0144

[308] Smith BJ, Kirschner SM, Kendall LV. Pharmacokinetics of sustained-release, oral, and subcutaneous meloxicam over 72 hours in male beagle dogs. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 2020;59:737–741. Disponible en: https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-19-000155

[309] Parkinson LA, Alexander AB, Campbell TW. Variability in hematology of white-spotted bamboo sharks (*Chiloscyllium plagiosum*) in different living environments. Zoo Biology. 2017;36:284–288. Disponible en: https://doi.org/10.1002/zoo.21371

[310] Morón-Elorza P, Steyrer C, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D. Hematology and plasma biochemistry reference values of juvenile Undulate rays (*Raja undulata*) under human care. Journal of Zoo and Wildlife Medicine. 2022;53:504–514. Disponible en: https://doi.org/10.1638/2021-0140

[311] Oliveira AT, Santos MQC, Lemos JRG, Pantoja-Lima J, Aride PHR, Tavares-Dias M, Marcon JL. Comparison of the effects of anticoagulants used in blood collection to determine blood parameters of free-living stingrays from the Potamotrygon genus (*Elasmobranchii: Potamotrygonidae*). Biota Amazonia. 2015;5:55–58. Disponible en: https://doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n3p55-58

[312] Hahn A, Bradford K, Ketz-Riley C, Hoover J, Payton ME. Comparison of three anticoagulants for hemolysis and measurement of plasma biochemical values in captive southern stingray (*Dasyatis americana*). Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, Kansas City, MI: 2011, p. 31–32. Disponible en: https://doi.org/10.1093/jat/bks069

[313] Arnold JE, Matsche MA, Rosemary K. Preserving whole blood in formalin extends the specimen stability period for manual cell counts for fish. Veterinary Clinical Pathology. 2014;43:613–620. Disponible en: https://doi.org/10.1111/vcp.12214

[314] Manire C, Hueter R, Hull E, Spieler R. Serological changes associated with gill-net capture and restraint in three species of sharks. Transactions of the American Fisheries Society. 2001;130:1038–1048. Disponible en: https://doi.org/10.1577/1548-8659(2001)130<1038:scawgn>2.0.co;2

[315] Zammit VA, Newsholme EA. Activities of enzymes of fat and ketone-body metabolism and effects of starvation on blood concentrations of glucose and fat fuels in teleost and elasmobranch fish. Biochemical Journal. 1979;184:313-322. Disponible en: https://doi.org/10.1042/bj1840313

[316] Turchiano M, Nguyen C, Fierman A, Lifshitz M, Convit A. Impact of blood sample collection and processing methods on glucose levels in community outreach studies. Journal of Environmental Public Health. 2013;1-4. Disponible en: https://doi.org/10.1155/2013/256151

[317] Watanabe T, Kiron V, Satoh S. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture. 1997;151:185–207. Disponible en: https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01503-7

[318] George JW. The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: An historical and technical review. Veterinary Clinical Pathology. 2008;30:201–210. Disponible en: https://doi.org/10.1111/J.1939-165x.2001.tb00432.x

[319] Wallaert C, Babin PJ. Age-related, sex-related, and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout. Journal of Lipid Research. 1994;35(9):1619-1633.Disponible en: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7806976/

[320] Davidson B, Cliff G. Liver lipids of female *Carcharias taurus* (spotted raggedtooth) sharks: a comparison between seasons. Fish Physiology and Biochemistry. 2011;37:613–618. Disponible en: https://doi.org/10.1007/s10695-010-9463-y

[321] Miller S, Cray C, Arnold J, Clauss T. Preliminary assessment of electrophoretic profiles in the Spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). Proceedings of the 49th Annual Conference of the International Association for Aquatic Animal Medicine; Mayo 19-23, Long Beach, CA: VIN; 2018.

[322] Christiansen EF, Cray C, Lewbart GA, Harms CA. Plasma protein electrophoresis and acute phase proteins in koi carp (*Cyprinus carpio*) following exploratory coeliotomy. Journal of Exotic Pet Medicine. 2015;24:76–83. Disponible en: https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.11.008

ANEXOS

IX ANEXOS

Anexo I. Índice de abreviaturas

AINE – antiinflamatorio no esteroideo.

ALP – fosfatasa alcalina.

ALT – alanina aminotransferasa.

AST – aspartato aminotransferasa.

ASVCP – Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria "American Society of Veterinary Clinical Pathology"

AU – ácido úrico.

AUC_{inf} – área bajo la curva concentración *vs* tiempo, desde tiempo 0 hasta infinito

BLD – valores por debajo del límite de detección.

BUN – nitrógeno ureico en sangre.

CEG – granulocito eosinófilo de gránulos gruesos "coarse eosinophilic granulocyte".

Ca – calcio.

Col – colesterol total.

COX – ciclooxigenasa.

CK – creatina kinasa.

Cl – cloro.

Cle – aclaramiento.

CLAE – cromatografía líquida de alta eficacia

C_{max} – concentración máxima

CYP – citocromo p450

CZE – electroforesis de zona capilar "capillary zone electrophoresis"

EST – estadística.

F1 – fracción 1 del electroforetograma, equivalente a prealbúmina.

F2 – fracción 2 del electroforetograma, equivalente a albúmina.

F3 – fracción 3 del electroforetograma, equivalente a alfa-globulina.

F4 – fracción 4 del electroforetograma, equivalente a beta-globulina.

F5 – fracción 5 del electroforetograma, equivalente a gamma-globulina.

FEG – granulocito eosinófilo de gránulos finos “fine eosinophilic granulocyte”.

GB – glóbulo blanco.

GGT – gamma-guamil transferasa.

Glu – glucosa.

GR – glóbulos rojos.

HPLC – cromatografía líquida de alta eficacia “high performance liquid chromatography “

Htc – hematocrito.

IC – intracelómico.

IUCN – Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza “International Union for Conservation of Nature”

IM – intramuscular.

IV – intravenoso

K – potasio.

L – linfocito.

LDH – lactato deshidrogenasa.

LXIA – lipoxina inducida por aspirinas.

M – monocito.

Me – mediana.

MG – media geométrica.

MRT – tiempo medio de residencia del fármaco en sangre

Na – sodio.

ND – no detectado

P – fósforo.

PGE2 – prostaglandina E2.

PGI2 – prostaglandina I2

PK – farmacocinética.

PD – farmacodinamia.

PO – oral.

PT – proteínas totales en plasma.

REF – referencia.

SC – subcutáneo

SLD – valores sobre el límite de detección.

ST – sólidos totales.

$t_{1/2\beta}$ – semivida de eliminación

T_{max} – tiempo requerido hasta alcanzar la concentración máxima

Trig – triglicéridos.

TXA2 – tromboxano A2.

UCM – Universidad Complutense de Madrid.

Vd – volumen de distribución.

$\overline{X}$ – media aritmética

Anexo II. Índice de figuras

NOTA: Las figuras incluidas en este trabajo han sido obtenidas durante la actividad diaria a lo largo del programa de doctorado en el Oceanogràfic de Valencia, en los laboratorios de la UCM/UV o en los acuarios colaboradores y cuentan con la autorización para su uso en esta Tesis Doctoral.

Figura 1. Distribución del tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*). Fuente: IUCN [23]. ..26

Figura 2. Distribución de la raya mosaico (*Raja undulata*). Fuente: IUCN [32]. 27

Figura 3. Cavidad celómica de un alitán (*Scyliorhinus stellaris*) macho, antes (1) y después (2) de retirar el hígado, vista ventro-dorsal. Nótese el gran tamaño del hígado (A), con vesícula biliar (B). Como en otras especies de elasmobranquio, el esófago (C) es muy corto. Se aprecia el gran estómago en forma de "J" (D), rodeado por el bazo (E) y la válvula espiral (F), que discurre cráneo-caudal a lo largo de la cavidad celómica, desembocando en el recto (G). 29

Figura 4. Corazón de un tiburón ángel (*Squatina squatina*), vista dorso-ventral, craneal hacia la izquierda. El animal (no incluido en el presente estudio) murió en el Oceanogràfic de Valencia donde se procedió a la realización del estudio post mortem. Nótese el atrio (A), el ventrículo (V), y el cono arterioso (CA). 31

Figura 5. Corte transversal caudal en alitán (*Scyliorhinus stellaris*), dorsal está arriba y ventral abajo. Detalle del lugar indicado para la venopunción en elasmobranquios: accesos ventral (V) y lateral (L).. Nótese que al realizar el acceso lateral del vaso para la venopunción, la cantidad de tejido muscular a traumatizar para acceder al vaso es menor que en el acceso ventral. 32

Figura 6. Punto indicado de venopunción en tiburón de puntas negras de arrecife (*Carcharhinus melanopterus*). El animal pereció en las instalaciones del Oceanogràfic durante el periodo de estancia de doctorado, por lo que durante el examen *post mortem* en fresco se procedió a poner en práctica y optimizar las técnicas de venopunción en estos animales. 33

Figura 7. Detalle de la venopunción y extracción de sangre *post mortem* de un alitán (*Scyliorhinus stellaris*) no perteneciente al grupo de animales utilizados en el estudio de esta tesis. El animal murió en el Oceanogràfic durante el periodo de estudios predoctorales, por lo que se utilizó la oportunidad para mejorar el protocolo de extracción de sangre. 33

Figura 8. Manejo y extracción de sangre en tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) macho adulto en las instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic. Nótese que el animal es colocado en decúbito dorsal para inducir la inmovilidad tónica y es mantenido con la cabeza y las branquias sumergidas mientras se realiza la extracción mediante un acceso lateral a la vasculatura caudal. 34

Figura 9. Células sanguíneas de la serie blanca del tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) presentes en sangre periférica. L, linfocito; FEG, granulocito de gránulos eosinófilos finos “fine eosinophilic granulocyte”; CEG, granulocito de gránulos eosinófilos gruesos “coarse eosinophilic granulocyte”; N, neutrófilo; M, monocito; GT, trombocito granulado “granulated thrombocyte”. Fuente: Morón-Elorza *et al.* 2022 [93]. 43

Figura 10. Administración oral voluntaria en alitán (*Scyliorhinus stellaris*) utilizando un tubo de plástico con una brida en su extremo en la que se sujeta el trozo de pescado con la medicación. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia. 59

Figura 11. Inmovilización y sondaje de tiburón toro (*Carcharias taurus*) adulto en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia durante administración de medicamento por vía oral forzada. Nótese que el tubo de plástico que se observa en la imagen protege al tubo de sondaje que discurre en su interior de ser dañado por los dientes del tiburón....60

Figura 12. Administración intramuscular del meloxicam en un ejemplar adulto de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris)* (izquierda) y en un ejemplar adulto de raya mosaico (Raja undulata) (derecha). Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia.....61

Figura 13. Detalle de la administración intravenosa en un ejemplar de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*).....62

Figura 14. Acceso intracardiaco en tiburón lechoso (*Rhizoprionodon acutus*) realizado post mortem en las instalaciones del Oceanogràfic de Valencia. 62

Figura 15. Estructura química semidesarrollada del meloxicam.....72

Figura 16. Detalle de la identificación de los 8 ejemplares de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) utilizados en el primer capítulo de esta tesis. Nótese los diferentes patrones de puntos que tiene cada individuo y que permitían su identificación.....96

Figura 17. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia Sistema D (Agua salada), tanque D4: uno de los tanques en los que se mantenían los ejemplares de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y raya mosaico (*Raja undulata*) durante la realización de los estudios del primer capítulo de esta tesis. Se aprecia la técnica de captura de los animales, utilizando un salabre de plástico. 97

Figura 18. Procesado de muestras de plasma de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología, Universidad de Valencia. 99

Figura 19. Toma de muestras del tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) en el Museo Marítimo del Cantábrico, Santander.....101

Figura 20. Pesaje de una raya mosaico (*Raja undulata*) utilizando una camilla. Instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic de Valencia.....101

Figura 21. Separación del plasma de tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) tras centrifugación de tubos con heparina de litio como anticoagulante, utilizando una micropipeta para su obtención y tubos Eppendorf® para su almacenamiento y congelación.....102

Anexo III. Índice de tablas y esquemas

Tabla 1. Recopilación de principales parámetros hematológicos en diferentes especies de elasmobranquio estudiadas. 45

Tabla 2. Recopilación de los principales parámetros bioquímicos en diferentes especies de elasmobranquio estudiadas. 50

Tabla 3. Recopilación de los valores de electroforesis de proteínas en las diferentes especies de elasmobranquio estudiadas. 53

Tabla 4. Recopilación de los principales parámetros farmacocinéticos del meloxicam en distintas especies relevantes estudiadas. 77

Tabla 5. Recopilación de parámetros farmacocinéticos del meloxicam administrado a dosis única en las diferentes especies de peces estudiadas. 204

Tabla 6. Principales parámetros hematológicos en el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*) utilizando una población de referencia de animales clínicamente sanos mantenidos en acuarios públicos bajo cuidado humano. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados ($p < 0.01$; prueba U de Mann-Whitney). 214

Tabla 7. Principales parámetros bioquímicos en el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*) determinados utilizando una población de animales clínicamente sanos mantenidos en acuarios bajo cuidado humano. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados ($p < 0.05$; prueba U de Mann-Whitney). 221

Tabla 8. Valores de referencia para electroforesis de proteínas plasmáticas en el tiburón alitán (*Scyliorhinus stellaris*) y la raya mosaico (*Raja undulata*) utilizando electroforesis de zona capilar. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre especies para todos los parámetros estudiados ($p < 0.01$; prueba U de Mann-Whitney). 223

Esquema 1. Diseño experimental de la Tesis Doctoral y publicaciones asociadas a cada experimento. 95

Anexo V. Lista de reconocimientos otorgados al trabajo de esta Tesis

2021 International Association of Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Student Travel Award mayo 2021 – (200 $). Otorgado por la ponencia oral "Observed variations in Hematology, Plasma Biochemistry and Protein Plasma Electrophoresis Associated with Intensive Handling during a Meloxicam Pharmacokinetic Study in Large-Spotted Catsharks (*Scliorhinus stellaris*)" en la conferencia IAAAM 2021.

2022 International Association of Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Student Travel Award mayo 2022 – (200 $). Otorgado por la ponencia oral "Increasing the Dosage: Pharmacokinetics of Meloxicam after Single Administration of 1.5 mg/kg PO and IM in Large-Spotted Catsharks (*Scyliorhinus stellaris*)" en la conferencia IAAAM 2022.

2022 Flying Sharks Research Fund for Young Researchers julio 2022 – (300 €). Otorgado a jóvenes científicos trabajando en proyectos de investigación y conservación con especies marinas.

2022 John L. Pitts Aquatic Veterinary Education Award septiembre 2022 – (500 $). El programa competitivo proporciona apoyo financiero a un número limitado de estudiantes de veterinaria o jóvenes graduados de facultades de veterinaria de prestigio y con una carrera prometedora en la medicina veterinaria de especies acuáticas.

World Aquatic Veterinary Medical Association

John L. Pitts Aquatic Veterinary Education Awards Program

International Association for Aquatic Animal Medicine founded 1969

IAAAM STUDENT TRAVEL AWARD

Flying Sharks collections consulting conservation education

loving the planet

Anexo IV. Lista de otros trabajos derivados de la tesis

Trabajo de Fin de Grado en Veterinaria. Estudio farmacocinético de meloxicam administrado por vía intramuscular (1,5 mg/kg) en raya mosaico (*Raja undulata*). Presentado en julio de 2022 por Daniela Cañizares Cooz, bajo la dirección y tutela de María Teresa Encinas Cerezo y **Pablo Morón Elorza**.

Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Steyrer C, Encinas T, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, Encinas T, García-Párraga D. Capillary zone plasma protein electrophoresis analysis in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human Care. Sharks International Conference. Valencia, España, 18-21/10/22.

Morón-Elorza P, Steyrer C, Rojo-Solís C, Encinas T, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D. Blood cell morphology and hematology reference interval determination in nursehound sharks (*Scyliorhinus stellaris*) under human care. The Zoo and Wildlife Conference (EAZWV) 2022 Emmen, Países Bajos. 24-28/05/22.

Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D, Encinas T. Increasing the dosage: pharmacokinetics of meloxicam after single administration of 1.5 mg/kg PO and IM in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*). International Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Conference. Online. 16-26/05/22.

Morón-Elorza P, Steyrer C, Rojo-Solís C, Encinas T, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D. Determination of juvenile hematological reference intervals in the Undulate Skate (*Raja undulata*) under human care. II International Meeting on Zoo Research, Conservation and Biodiverstiy. Serengeti-Park Hodenhagen, Alemania. 31/03-02/04/22.

Morón-Elorza P. Programa de cría controlada en raya mosaico (*Raja undulata*) permite la descripción de valores hematológicos y bioquímicos para la especie. III Jornada Red Nacional de Elasmobranquios, CRAM Barcelona, España 11-12/12/21

Morón-Elorza P. Los acuarios como herramienta de conservación e investigación con elasmobranquios. Curso de manejo y mantenimiento de tiburones del Oceanogràfic de Valencia. Valencia, España. 11/11/21.

Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Encinas T, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D. Observed variations in hematology, plasma biochemistry and protein electrophoresis associated with intensive handling during a meloxicam pharmacokinetic study in Large-spotted Catsharks (*Scyliorhinus stellaris*). International Association for Aquatic Animal Medicine (IAAAM) Conference. Online. 23-26/5/21.

Morón-Elorza P. Estudio cinético de los principales fármacos utilizados en elasmobranquios (antiinflamatorios, antibióticos and antimicóticos). II Jornada Red Nacional de Elasmobranquios. CRAM Barcelona. Online. 28/11/20-29/11/20

Morón-Elorza, P. Estudios farmacocinéticos en elasmobranquios. I Jornada Red Nacional de Elasmobranquios. Oceanogràfic de Valencia. Valencia, España. 27/11/19



SHARKS INTERNATIONAL 2022:

Capillary zone plasma protein electrophoresis analysis in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care

Pablo Morón-Elorza, Carlos Rojo-Solís, Christine Steyrer, Mónica Valls-Torres, Teresa Álvaro-Álvarez, Teresa Encinas, Daniel García-Párraga

Abstract

The clinical application of plasma protein electrophoresis (PPE) for health evaluation and disease diagnosis has been previously reported in elasmobranchs. However, PPE studies in this group of animals are very limited. Baseline values have only been established in few shark and ray species, dividing their electrophoretograms into five main fractions, with significant interspecific variations among them. The goal of this study was to determine baseline PPE fraction values in the nursehound shark (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care, using a reference population of 62 clinically healthy nursehounds (32 males and 30 females; 23 subadult and 39 adult). Nursehound electrophoretograms were similar to those previously described in other elasmobranch species and could be divided into eight consistent fractions. Statistically significant variations related to sex and developmental stage were detected in fractions 4, 5 and 6 of the electrophoretogram. To the authors knowledge, this is the first study evaluating PPE in elasmobranchs using capillary zone electrophoresis (CZE) technique. Previous studies with elasmobranchs used agarose gel electrophoresis, which is still the most common method used in veterinary settings though is becoming increasingly replaced by CZE. In this study, CZE allowed the classification of the lipoproteins migrating in the alpha- and beta-globulin regions into several subfractions. This finding was consistent in all animals sampled. Although further studies are warranted to completely understand the composition and clinical implications of the different

subfractions, the possibility of cutting the electrophoretogram into several small consistent fractions will allow for a more accurate interpretation of physiological and pathological variations.



EAZWV 2022

Blood cell morphology and haematology reference interval determination in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*) under human care

Pablo Morón-Elorza (Presenting), Christine Steyrer, Carlos Rojo-Solís, Teresa Álvaro-Álvarez, Mónica Valls-Torres, Teresa Encinas, Daniel García-Párraga

Abstract:

The nursehound (*Scyliorhinus stellaris*) is a medium-sized shark, commonly maintained in public aquariums. It occurs naturally in the northeastern Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea and is classified as vulnerable on the IUCN Red List. Studies determining baseline hematological reference intervals (RI) in elasmobranchs are limited, and significant differences have been reported among the studied shark and ray species. In this study, blood samples were collected from 94 clinically healthy nursehounds (47 males and 47 females) maintained under human care. Individual veterinary check-ups were performed to determine their health status, including the evaluation of their medical history, external physical examination, recordings for morphometric measurements, and blood collection through venipuncture of the caudal haemal arch. Median (range) weight was 2.40 (0.70-7.45) kg and median total length was 79 (51-113) cm; it was not possible to accurately classify individuals as sexually mature/immature. One millilitre blood samples were collected from each animal, directly placed in lithium heparin tubes, and maintained at 4ºC until being processed within 60 minutes from collection. Haematological RI were established according to the recommended guidelines published by the American Society of Veterinary Clinical Pathology. Manual packed cell volume

was determined using microhematocrit tube centrifugation, manual total solids in plasma were determined using refractometry, and manual leukocyte and erythrocyte counts were performed using a Neubauer improved haemocytometer. Manual leukocyte differentials were performed using Diff-Quick® stained blood smears. Major leukocyte types were similar to other carcharhinid sharks, identifying lymphocytes as the predominant leukocyte with a median (RI) of 38.0 (28.2-53.5)%.



IAAAM 2022

Increasing the Dosage: Pharmacokinetics of Meloxicam after Single Administration of 1.5 mg/kg PO and IM in Nursehound Sharks (*Scyliorhinus stellaris*)

Pablo Morón-Elorza,[1,2] Carlos Rojo-Solís,[1] Teresa Álvaro-Álvarez,[1] Mónica Valls-Torres,[1] Teresa Encinas,[2] Daniel García-Párraga[1]

[1]Veterinary Services, Oceanogràfic, 46013, Valencia, Spain; [2]Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

Abstract

Meloxicam is a non-steroidal anti-inflammatory drug selectively inhibiting the cyclooxygenase (COX)-2 enzyme, with minimal effect on COX-1 [6]. COX-2 genetic expression has been confirmed in many fish species, and COX activity has shown *in vitro* evidence in elasmobranchs [1,7]. Meloxicam is indicated as an analgesic and anti-inflammatory in a wide range of exotic animal species due to its good pharmacokinetic (PK) properties, tolerance, and efficacy [2]. Meloxicam is frequently used in clinical management of inflammation in sharks and rays in aquariums. However, in the absence of specific PK data, dosages are generally extrapolated from other non-related exotic animal species [3,5]. Our previous studies with meloxicam 0.5 mg/kg administered orally (PO) and intramuscularly (IM) in nursehounds (*Scyliorhinus stellaris)*, already provided promising results for IM administration in sharks and showed important differences in absorption between enteral and parenteral routes [4]. The present study evaluated variations in meloxicam PK when meloxicam dosage was increased to 1.5 mg/kg. In this study, 6 healthy adult nursehound sharks were administered meloxicam following three different administration procedures: PO voluntary ingestion with food, PO forced tube-

feeding, and IM injection. A four-week washout period was allotted between studies. Meloxicam administered PO did not produce detectable plasma levels. However, PK results after IM administration showed a mean maximum plasma concentration ± SEM of 806 ± 66 ng/ml and a mean terminal half-life of 15.97 ± 1.20 h, suggesting that a dosage increase to 1.5 mg/kg could be needed to achieve therapeutic concentrations during a longer inter-dosage period in nursehound sharks.

Acknowledgements

This study could not have been developed without the help and dedicated care of the aquarist team forming part of the "Oceans" and "Quarantine" departments at Oceanogràfic of Valencia. This study was supported by Fundación Oceanogràfic and the Complutense University of Madrid.

Literature Cited

1. Cabrera DM, Janech MG, Morinelli TA, Miller DH. 2003. A thromboxane A(2) system in the Atlantic stingray, Dasyatis sabina. Gen Comp Endocrinol. 130(2):157–164
2. Carpenter JW, Marion CJ. 2017. Exotic Animal Formulary: Fifth Edition. Elsevier Inc., 167-375.
3. Garner MM. A Retrospective Study of Disease in Elasmobranchs. Vet Pathol. 2013;50(3):377–389.
4. Morón-Elorza P, Rojo-Solís C, Encinas T, Álvaro-Álvarez T, Valls-Torres M, García-Párraga D. 2021. Observed variations in hematology, plasma biochemistry and protein plasma electrophoresis associated with intensive handling during a meloxicam pharmacokinetic study in large-spotted catsharks (Scyliorhinus stellaris). *IAAAM Annual Conference Proceedings*.
5. Mylniczenko N. 2018. Appendix 1- Elasmobranch Formulary. In: Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J (eds.). Elasmobranch Husbandry Manual II. Columbus: Ohio Biological Survey.
6. Schattenkirchner M. 1997. Meloxicam: a selective COX-2 inhibitor non-steroidal anti-inflammatory drug. Expert opinion on investigational drugs. Expert Opin Investig Drugs. 6(3):321–334.
7. Wang T, Mai K, Ai Q. 2016. A Review of Cyclooxygenase-2 Role in Fish. Austin Journal of Nutrition and Metabolism. 3(1):1037.



PROGRAMA DE CRÍA CONTROLADA EN RAYAMOSAICO (*Raja undulata*) PERMITE LA DESCRIPCIÓN DE VALORES HEMATOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS PARA LA ESPECIE

Pablo Morón-Elorza[1]

1. Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria UCM.

p-moron@hotmail.com

Resumen

Actualmente existen pocos estudios publicados sobre hematología y bioquímica de elasmobranquios, y se han observado grandes diferencias interespecíficas en la analítica sanguínea entre las diferentes especies de elasmobranquios estudiadas. Para este estudio se analizaron muestras de sangre de 45 ejemplares de raya mosaico (*Raja undulata*) mantenidos bajo cuidado humano (25 machos, 20 hembras) para hematología y bioquímica plasmática. Los animales muestreados fueron juveniles, nacidos y mantenidos en el Oceanogràfic de Valencia. Se clasificaron en 2 grupos de edad: 29 animales con 1 año y 16 con 2 años. Todos los animales se consideraron sanos en el examen físico y se registraron sus pesos, longitud total, longitud estándar y ancho del disco. Después de que se determinaron los intervalos de referencia, se tomaron muestrasde sangre de 6 rayas mosaico adultas sanas, mantenidas en el mismo acuario, para evaluar el uso clínico de los intervalos establecidos y valorar si se observaron diferencias entre los grupos de edad juveniles y adultos. Este es el primer artículo que describe intervalos de referencia hematológicos y bioquímicos para esta especie, aumentando el conocimiento clínico sobre el análisis de sangre de elasmobranquios. Estos resultados servirán como una valiosa herramienta de diagnóstico para las rayas mosaico mantenidas tanto en acuarios como en centros de recuperación marina. Además, son datos de gran utilidad a la hora de realizar estudios comparativos con especies silvestres y estudios de evaluación de salud poblacional.

Palabras clave: *Raja undulata*, hematología, bioquímica, valores referencia

2ND INTERNATIONAL MEETING ON ZOO RESEARCH CONSERVATION AND BIODIVERSITY

Serengeti-Park Hodenhagen, Germany

March 31 – April 2, 2022

DETERMINATION OF JUVENILE HEMATOLOGICAL REFERENCE INTERVALS IN THE UNDULATE SKATE (*Raja undulata*) UNDER HUMAN CARE

Presenter(s)/ authors: **Pablo Morón-Elorza, DVM**,[1,2] Christine Steyrer, DVM, MSc,[3] Carlos Rojo-Solís, DVM, MSc,[2] Teresa Álvaro-Álvarez, DVM,[2] Mónica Valls-Torres, DVM,[2] Daniel García-Párraga, DVM, DECZM (ZHM), DECAAH (N-P).[2]

[1] Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid. Madrid, Spain; [2] Veterinary Services, Oceanogràfic. Ciudad de las Artes y las Ciencias. Valencia, Spain; [3] Lionsrock Big Cat Sanctuary, Bethlehem, South Africa.

Abstract:

The undulate ray (*Raja undulata*) is classified as “endangered” in the IUCN Red List and remains one of the least studied ray species of the northeastern Atlantic and Mediterranean continental shelves, although it is frequently kept in aquariums and reported in trawl surveys. Hematological analysis is a great tool for health evaluation, though reference intervals have not been yet determined for most elasmobranch species. In addition, there are still few complete hematological studies performed in elasmobranchs, with great variations observed in leukocyte morphology and hematological parameters among the studied species. This study aimed to determine hematological reference intervals using a group of 45 juvenile individuals (25 males, 20 females) born and maintained at Oceanogràfic Aquarium (Valencia, Spain). Individual veterinary check-ups were carried out to determine their health status, which included an individual evaluation of their medical history, external physical examination, recordings

for morphometric measurements, and blood collection from the caudal vasculature. Hematological values analyzed consisted of manual packed cell volume, manual plasma total solid quantification, manual total red blood cell and total granulocyte counts, manual leukocyte differential, automated hemoglobin concentration, automated mean corpuscular volume, automated mean corpuscular hemoglobin, and automated mean corpuscular hemoglobin concentration. All animals except two were considered clinically healthy, and hematological reference intervals were determined for juvenile undulate rays (n=43, ages ranging 7- to 26-month-old) following the guidelines established by the American Society for Veterinary Clinical Pathology Quality Assurance and Laboratory Standards. Results will serve as a valuable diagnostic, research, and population health management tool.



Observed Variations in Hematology, Plasma Biochemistry and Protein Plasma Electrophoresis Associated with Intensive Handling during a Meloxicam Pharmacokinetic Study in Large-Spotted Catsharks (Scyliorhinus stellaris)

IAAAM 2021

Pablo Morón-Elorza[1,2]; Carlos Rojo-Solís[1]; Teresa Encinas[2]; Teresa Álvaro-Álvarez[1]; MónicaValls-Torres[1]; Daniel García-Párraga[1]

[1]Veterinary Services Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias, Valencia, Spain; [2]Pharmacology and Toxicology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense Universityof Madrid, Madrid, Spain

Abstract

The aim of this study was to evaluate kinetics of meloxicam administration, in association toobserved changes due to frequent handling and blood-sampling on hematology, plasma biochemistry and plasma protein electrophoresis (PPE) for large-spotted catsharks (*Scyliorhinus stellaris*) maintained under human care. To our knowledge, no baseline blood reference values have been established yet for this species. Additionally, interpretations of fish, and specifically elasmobranch hematological and plasma biochemical values under different physiological or clinical conditions are currently scarce but relevant indicators of health/welfare status.[1-5] Two different pharmacokinetic (PK) studies with meloxicam were performed on the same group of 8 animals with a resting period of 6 months between studies: first, meloxicam was administered intramuscularly (IM) at 0.5 mg/kg and then orally (PO) at 0.5 mg/kg. Both sampling routines were identical, and blood was collected via caudalvein at 15, 30, 60, 180, 360, 540, 720 and 1440 min post administration. There is currently only one published PK study performed with meloxicam in teleosts, and no studies have been yet published in elasmobranchs.[6] However, meloxicam is frequently used in the clinicalmanagement of these animals.[7] Our preliminary results show important variations in absorption between

enteral and parenteral administration routes. Oral administration did not produce any detectable meloxicam levels in blood plasma in any of the collected samples, while same dose of meloxicam IM was detected in plasma from 15 to 1440 min after administration.

Both PK studies required intensive handling with frequent capture, immobilization, and sampling. Reference samples to evaluate handling impact on each group included one prior to intensive handling and the last one at the end of the PK study. Marked differences were found in some hematology, plasma biochemistry and PPE values before and after intensive handling. Significantly higher mean values ($p<0.05$) after manipulation compared to the values obtained prior to the manipulation and meloxicam administration were found for heterophil total count, creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH) and total protein (TP) values for the animals which were injected with meloxicam intramuscularly and for CK and TP for the animals which received oral medication. Catsharks plasma protein electropherogram was analogous to other elasmobranch PPE profiles and was divided into five fractions for its evaluation.[6-8] In the group treated IM, different fractions of the electropherogram also showed significant changesat the end of the study. These electrophoretic changes as well as the increase in AST and LDH average values were not observed or were not significant in the animals administered orally reflecting consequences of post injection tissue damage or metabolic effects of the drug. Consistent rise in CK and TP in both groups was considered direct consequence of handling stress as drug absorption was negligible through the PO route. Fish welfare is an increasingly important concern and minimizing environmental stress has proven effective at reducing fish disease.[10] Besides the PK work, different parameters were found relevant indicators when it comes to evaluate the impact of handling on the inflammatory and enzymeactivity response in elasmobranchs.

Acknowledgements

The authors thank the husbandry and animal care staff from Oceanogràfic of Valencia for their dedicated care of the different animal species at the Aquarium and the veterinary teamfor their help and support.

Literature Cited

1. Grant KR. Fish Hematology and Associated Disorders. *Clinics in laboratory medicine*. 2015; 35(3): p. 681–701.

2. Cain DK, Harms CA, Segars A. Plasma biochemistry reference values of wild-caught southern stingrays (*Dasyatis americana*). *J Zoo Wild Med*. 2004 Dec; 35(4): p. 471–6.
3. Otway NM, Ellis MT, Starr R. Serum biochemical reference intervals for wild dwarf ornate wobbegong sharks (*Orectolobus ornatus*). *Veterinary Clinical Pathology*. 2011 July; 40(3): p. 361–367.
4. Ferreira CM, Field CL, Tuttle AD. Hematological and plasma biochemical parameters of aquarium-maintained cownose rays. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2010 June; 22(2): p. 123–8.
5. Hamman KH, Norton TM, Thomas AC, Dove AD, Tseng F. Baseline health parameters and species comparisons among free-ranging Atlantic sharpnose (*Rhizoprionodon terraenovae*), bonnethead (*Sphyrna tiburo*), and spiny dogfish (*Squalus acanthias*) sharks in Georgia, Florida, and Washington, USA. *J Wild Dis*. 2012 Apr; 48(2): p. 295–306.
6. Fredholm DV, Mylniczenko N, Kukanich B. Pharmacokinetic evaluation of meloxicam after intravenous and intramuscular administration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Zoo Wildl Med*. 2016 Sep; 47(3): p. 736–742.
7. Mylniczenko N. Appendix 1 - Elasmobranch Formulary. In Smith M, Warmolts D, Thoney D, Hueter R, Murray M, Ezcurra J, editors. Chapter 29: Pharmacology of elasmobranchs: updates and techniques. *Elasmobranch Husbandry Manual II*. Columbus: Ohio Biological Survey; 2018.
8. Cowan CM. Serum protein variation in the bull shark (*Carcharinus leucas*). *Int J Biochem*. 1971; 2: p. 691–696.
9. Cray C, Rodriguez M, Field C, McDermott A, Leppert L, Clauss T, *et al*. Protein and cholesterol electrophoresis of plasma samples from captive cownose ray (*Rhinoptera bonasus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015 Oct; 27(6): p. 688.
10. Pavlidis M, Digka N, Theodoridi A, Campo A, Barsakis K, Skouradakis G, *et al*. Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response. *Zebrafish*. 2013 Dec; 10(4): p. 524–31.



II JORNADA RED NACIONAL ELASMOBRANQUIOS: ESTUDIO CINÉTICO DE LOS PRINCIPALES FÁRMACOS EMPLEADOS EN ELASMOBRANQUIOS

Morón-Elorza, Pablo[1,2]

[1]Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid

[2]Fundación Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias. C/ Eduardo Primo Yúfera 1B. 46013 Valencia

Resumen:

El objetivo principal de este proyecto es aportar información novedosa y relevante en cuanto a farmacocinética y manejo clínico y terapéutico de elasmobranquios, para así mejorar los protocolos actuales de tratamiento de estas especies. Con el fin de establecer protocolos de tratamiento adecuados que garanticen el éxito terapéutico en este amplio grupo de animales, durante 2020 se han realizado estudios farmacocinéticos con antimicóticos (terbinafina) y analgésicos/antiinflamatorios (meloxicam), en un grupo de alitanes (*Scyliorhinus stellaris*), mantenidos en las instalaciones de cuarentena del Oceanogràfic. Se han obtenido distintas muestras de sangre que han sido procesadas en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad Complutense de Madrid, para determinar las propiedades farmacocinéticas de los fármacos estudiados. Al administrar estos fármacos por diferentes vías, este estudio muestra las importantes variaciones encontradas entre la vía enteral y parenteral. La vía oral ha resultado ser de escasa utilidad en elasmobranquios para los fármacos estudiados, no habiéndose detectado niveles plasmáticos tras la dosificación única. La vía intramuscular ha resultado

ser una vía de administración efectiva en elasmobranquios para el meloxicam. Dado que las enfermedades infecciosas/inflamatorias se han identificado como las de mayor prevalencia en elasmobranquios, estos resultados proporcionan unos conocimientos necesarios y aplicables en el tratamiento de estos animales, y muestran la importancia y necesidad de la realización de futuros estudios de farmacocinética en elasmobranquios.



CURSO MONOGRÁFICO DEL OCEANOGRÀFIC: MANEJO Y MANTENIMIENTO DE TIBURONES: LOS ACUARIOS COMO HERRAMIENTA DE LA CONSERVACIÓN E INVESTIGACIÓN CON ELASMOBRANQUIOS

Morón Elorza, Pablo[1,2]

[1]Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid

[2]Fundación Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias. C/ Eduardo Primo Yúfera 1B. 46013 Valencia

Resumen

Los elasmobranquios comenzaron a exhibirse en acuarios públicos y centros marinos de investigación en la segunda mitad del siglo XIX, al ser especies animales emblemáticas con alto potencial educativo, de concienciación e investigación. Los avances en la medicina veterinaria y en la cría de especies acuáticas, unidos al aumento de las

expectativas de una atención médica veterinaria de alta calidad, han hecho que las instalaciones que mantienen elasmobranquios se vuelvan cada vez más capaces para mantener a estos animales, y ha requerido que más profesionales veterinarios se involucren en el manejo clínico de tiburones y rayas. En consecuencia, el manejo veterinario de los elasmobranquios con la tecnología y los medicamentos veterinarios modernos ha aumentado. Los tiburones desempeñan un rol imprescindible en la parte superior de la cadena alimenticia, estando su conservación fuertemente ligada al aumento en el conocimiento de sus ciclos de vida, sus enfermedades, la conservación de sus hábitats, y a proyectos de conservación *ex situ* y reintroducción en el hábitat natural. En esta situación actual muy crítica para los elasmobranquios, con una rápida reducción de las poblaciones en la mayoría de las especies estudiadas, tanto los acuarios como los centros de recuperación juegan un papel importante en la conservación de los tiburones y las rayas a nivel global, ya que son una gran herramienta de educación y de concienciación para la población general. Además, son una herramienta de investigación con mucho potencial: los acuarios nos permiten obtener unos conocimientos de los animales que se mantienen que serían muy difíciles o imposibles de obtener en el océano. Gracias a mantener elasmobranquios, hemos ido perfeccionando sus técnicas de manejo, adaptándonos a las necesidades de cada una de las especies que iban manteniendo. Al desarrollar técnicas de manejo e inmovilización, que incluyen inmovilidad tónica, anestesia y sedación, se nos abre la puerta a realizar muchas otras técnicas avanzadas de diagnóstico de enfermedades. El mantener elasmobranquios en acuarios ha posibilitado el diagnóstico de enfermedades y la realización de estudios completos de patología y enfermedad en estos animales.



I JORNADA NACIONAL DE ELASMOBRANQUIOS: ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN ELASMOBRANQUIOS

Morón Elorza, Pablo

[1]Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Veterinaria Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n. 28040 Madrid
[2]Fundación Oceanogràfic, Ciudad de las Artes y las Ciencias. C/ Eduardo Primo Yúfera 1B. 46013 Valencia

p-moron@hotmail.com

Resumen

Según los acuarios se van desarrollando y son capaces de mantener especies de elasmobranquios más complejas y delicadas en exhibiciones más grandes y multiespecie, parece inevitable que vayan apareciendo y vayamos descubriendo nuevos patógenos y nuevas enfermedades. Esto, unido al cambio climático, con la subida de la temperatura de los océnaos y modificación de los ecosistemas marinos, hace que se estén detectando brotes de enfermedades emergentes. El hecho de que las enfermedades inflamatorias e infecciosas sean las patologías más frecuentes en elasmobranquios, unido a la aparición de enfermedades emergentes, también con gran componente inflamatorio e infeccioso, es preocupante, ya que todavía no existen estudios que avalen la utilización de protocolos terapéuticos seguros y eficaces para la mayoría de los antiinflamatorios y antimicrobianos

en tiburones y rayas. El mantener tiburones y rayas en acuarios permite realizar estudios farmacocinéticos, que serían imposibles de realizar en el medio natural. Los estudios farmacocinéticos consisten en la administración de un principio activo a un grupo de animales de una especie, mantenidos en condiciones controladas, y de los que se extraerá sangre en tiempos predeterminados tras la administración del fármaco a estudiar. Esta sangre será procesada para determinar las concentraciones del fármaco a lo largo del tiempo, pudiendo determinar diferentes parámetros cinéticos (tales como la semivida de eliminación del fármaco o la vida media del fármaco en el plasma sanguíneo, y que orientan al clínico que trabaja con estos animales sobre los periodos interdosis que se deben establecer para conseguir las concentraciones óptimas del fármaco y efecto deseado). Los estudios farmacocinéticos deben realizarse también en elasmobranquios, ya que son el primer paso para la creación de protocolos farmacoterapéuticos y regímenes posológicos a nivel de especie para un fármaco concreto, habiéndose demostrado importantes variaciones interespecíficas para la cinética de diferentes fármacos estudiados en peces. Con estos estudios y los proyectos que se están iniciando en el Oceanogràfic de Valencia centrados en el estudio cinético de antiinflamatorios y antimicrobianos en tiburones y rayas, buscamos crear un banco de datos farmacoterapéuticos para elasmobranquios con base científica, al que puedan acudir los profesionales que trabajan con estos animales.