



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Lupien (*Dicentrarchus labrax*)
ataletan disruptore endokrinoen
metaketa kontrolpeko baldintzetan**

*Oihana Ros, Matteo Barbatto,
Urtzi Izaguirre, Eider Bilbao,
Maren Ortiz, Ailette Prieto,
Asier Vallejo eta Nestor Etxebarria*

45-52 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.07>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Lupien (*Dicentrarchus labrax*) ataletan disruptore endokrinoen metaketa kontrolpeko baldintetan

Ros Oihana¹, Barbatto Matteo², Izaguirre Urtzi², Bilbao Eider², Ortiz-Zarragoitia Maren², Prieto Ailette^{1,2}, Vallejo Asier¹, Etxebarria Nestor^{1,2}.

1. Kimika Analitikoa Saila (Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria),

2. Plentziako Itsas Estazioa (Euskal Herriko Unibertsitatea, Plentzia, Euskal Herria).

oihana.ros@ehu.eus

Laburpena

Egunero erabiltzen ditugun konposatu asko disruptore endokrino (EDC) moduan sailkatu dira bizidunengan izan ditzaketen eragin endokrino nabarmenengatik. Konposatu horiek banakoen intersexualitatea, malformazioak, ugalketa-arazoak eta tamainaren txikitzea sor ditzakete, besteak beste. Lan honetan, laborategian, heldugabeko lupiak (*Dicentrarchus labrax*) 4 EDCtara (17- β -estradiola, 4-*tert*-oktilfenola, dietilestilbestrola eta bisfenol-A) esposatu ziren 10 egunetan zehar metatze-maila aztertzeko (gibelean, behazunean eta plasman). Ondoren, beste 12 egunetz eduki ziren ehunen berreskurapena aztertzeko. Lan honetan, EDCen kontzentrazio baxuek arrainetan hainbat kalte sortu dituztela ikusi da.

Hitz gakoak: konposatu disruptore endokrinoak, bioakumulazioa, lupiak (*Dicentrarchus labrax*).

Abstract

*Many compounds used in our everyday life are classified as endocrine disrupting compounds (EDCs) due to the endocrine disruption effect they can have in living organisms. Low concentration of EDCs can cause intersexuality, malformations, fertility problems and a reduction of the size, among others. In the present work, juvenile European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) were exposed under laboratory conditions to 4 EDCs (17- β -estradiol, 4-*tert*-octylphenol, diethylstilbestrol and bisphenol-A) during 10 days with the objective of evaluating the accumulation capacity in different tissues (liver, bile and plasma). Afterwards, fish were depurated for 12 days. In the present work it has been proved that low concentration of EDCs can cause several alterations in fish.*

*Keywords: endocrine disrupting compounds, bioaccumulation, European Seabass (*Dicentrarchus labrax*).*

1. Sarrera eta motibazioa

Azken urteotan, disruptore endokrino (EDC) moduan ezagutzen diren konposatuen erabilera izugarri hazi da eta, horrekin batera, horien arriskuarekiko ardura ere. EDCak, sistema endokrinoan aldaketak sortzen dituzten substantzia exogenoak, edo horien nahasteak, dira. Konposatu horiek organismo osasuntsuetan edo bere ondorengoetan kalteak sor ditzakete (Å. Bergman et al., 2012). Europar Batasunak EDC moduan joka dezaketen 553 konposatu ebaluatu ditu dagoeneko. Asko dira EDC moduan sailkatu direnak; alkil fenolak (APs), bisfenol-A (BPA), fungizidak, pestizidak, zenbait surfaktante, zenbait konposatu farmazeutikoak eta estrogenoak, besteak beste (Álvarez-Muñoz et al., 2015; Wang et al., 2016). EDCak eguneroko bizitzan etengabe erabiltzen dira eta saneamendu-sarean zehar, araztegiara heldu eta bertan kontzentra daitezke. Araztegiak ez dira gai konposatu horiek guztiz arazteko, eta ondorioz, araztegiaren irteera-korrontea bilakatu da konposatu horiek ingurumenera isurtzeko iturri nagusienetako bat. Araztegiez gain, abeltzaintza, nekazaritza, akuikultura eta industriak dira konposatu horien iturri nagusiak (Mortazavi et al., 2012; Álvarez-Muñoz et al., 2015). Orokorrean, kontzentrazio baxuetan (ng/L, μ L/L mailak) aurkitzen dira ingurumen-uretan (Álvarez-Muñoz et al., 2015; Ros et al., 2015b). Hala ere, kontzentrazio horiek nahikoak dira bertan bizi diren bizidunei kalteak sortarazteko. Eragindako kalteen artean, besteak beste, malformazioak, ugalketa-arazoak, tamainaren txikitzea edo intersexualitatea aurkitu dira

arrainetan, anfibiotan, moluskuetan, narrastitan eta ugaztunetan (Bizarro et al., 2014; Wang et al., 2016). EDCek sistema endokrinoa kontrolatzen duten konposatu naturalak ordezkatzeko dituzte eta haien ohiko funtzionamendua aldatzen dute. Ondorioz, hormonek kontrolatzen dituzten erreakziok azkartu, inhibititu edota alda ditzakete. Beraz, oso garrantzitsua da kutsatzaile organiko horiek arrainen gorputzaren atal desberdinetan metatzeko duten gaitasuna aztertzea, beraien eraginak hobeto ulertzeko.

Aurretiaz azaldu bezala, EDCak oso kontzentrazio baxutan egon ohi dira uretan eta askotan detektaezinak izaten dira egun ezagutzen diren teknika analitikoekin. Arrainek, aldiz, konposatu horiek metatzeko (kontzentratzeko) joera erakusten dute. Modu horretan, uretan detekta ezinak diren konposatu asko, arrainetan topa daitezke eta konposatu horietara esposatuak izan direla ziurtatu (Gibson et al., 2005; Yang et al., 2014). Gibela da konposatu naturalak zein toxikoak metabolizatzen diren organoa. Transformazio pauso horren ondoren, konposatuak behazunera garraiatzen dira gorputzetik kanporatzeko. Hori dela-eta, behazuna da konposatu horien kontzentrazio-maila altuena espero den ehuna (Martínez-Gómez et al., 2013). Arrainek konposatuak metatzeko duten ahalmena biokontzentrazio-faktorearen ($BCF=C_{\text{analito}}/C_{\text{ehunea}}$ uretan) bidez determinatzen da. BCF-maila 5000 baino handiagoa denean, konposatu hori ehunetan metatzeko joera oso handia dela esaten da.

BCF balioak kalkulatzeko egindako lan gehienetan, ingurumenean arrantzatutako arrainak erabili izan dira (Stasinakis et al., 2012; Wang et al., 2016), baina kasu horietan ingurumen-baldintzak ezin dira kontrolpean mantendu eta zaila da ondorio garbiak lortzea. Arazo horri aurre egiteko, laborategian egiten diren kontrolpeko esperimenduak dira irtenbide bat. Bertan, arrainak kontzentrazio ezaguneko kutsatzaile bakarrera zein nahaste batera esposatzen dira. Horrez gain, posiblea da arrain-talde homogeen batekin lan egitea, edo sexualki heldugabeko arrainekin, kasurako. Zenbait lanetan aipatzen da kutsatzaileen nahasteak gehitzen direnean, beraien efektua arrainean asko handitzen dela (Martínez-Gómez et al., 2013, Tang et al., 2013).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Konposatu organikoek bizidunetan, ur organismoetan bereziki, duten metatzeko gaitasuna dela-eta, ezinbesteko da laborategiko baldintzetan hainbat esperimendu egitea ondoren ingurumeneko portaera hobeto ulertu ahal izateko. Tamalez, lan gutxi dago eginda horren inguruan. Lan honen helburua, beraz, efektu estrogenikoa duten familia desberdineko 4 EDCren nahasteak, (4-*tert*-oktil fenola (4tOP), BPA, dietilestilbestrola (DES) eta 17- β -estradiola (E2)) heldugabeko lupien atal desberdinetan (plasman, gibelean eta behazunean) metatzeko duten joera aztertzea izan da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Esposizio esperimenduak eta laginen analisisa

Heldugabeko (~20 g, 5 hilabete) lupiak (*Dicentrarchus labrax*) laborategiko girora moldatzeko hilabetez eduki ziren itsasoko ura zuen akuario batean eta egunean behin eman zitzaizkien jaten (lupien pisuaren % 5 inguru). Erabilitako argi periodoa 12 ordukoa izan zen. Arrainen erdia inolako kutsatzaile ez zuen 250 L-ko ontzi batera (kontrol-ontzira) pasatu ziren eta gainontzekoak, EDC bakoitzeko 150 ng/L-ko kontzentrazioa zuen ontzira (esposizio-ontzira). Lupiak 10 eguneguz egon ziren kontzentrazio horretara esposatuak eta, ondoren, 12 egunetako arazketa (kutsatzaile gabe) jasan zuten. Esperimendua hasi eta 1., 3., 7. eta 10. egunetan, 10 lupia jaso ziren ontzi bakoitzetik. Esposizio-denbora amaituta, esposizio-ontzian geratutako arrainak, ontzi garbi batera eraman ziren arazketa urratsari hasiera emateko. Arrainak, arazketa hasi eta 4., 7. eta 12. egunen ostean jaso ziren.

Laginen analisiari dagokionez, lagin solidoak (arrain-gibela) ultrasoinu fokatuaren bidez erauzi eta fase solidoa erauzketa dispartsoarekin garbitu ziren (Ros et al., 2016) eta likidoak (arrain-plasma, behazuna eta ura), aldiz, polietersulfonaren bidezko mikroerazuketaren bidez

(Ros et al., 2015a; Ros et al., 2015b). Lan honetako lagin guztiak likido kromatografia-tandem masa espektrometriaren bidez neurtu ziren.

3.2 Organoen neurriak eta itxura

Esperimentuak iraun bitartean jasotako arrain guztien luzerak (cm), arrain osoaren pisuak (g) eta arrain bakoitzaren gibelaren pisuak (g) jaso ziren (1. taula). 1. taulan ikus daitekeen moduan, ez zen inolako desberdintasun esanguratsurik ikusi luzerari dagokionez egun guztiak kontuan hartuz eta arrainaren pisuan esperimentuko lehenengo 7 egunetan, baina bai ordea 10. egunean. Azken kasu horretan, esposatutako ontzian pisu galera ikusi zen, baina behin arazketa garaira helduta, arrainek hasierako pisua berreskuratu zuten. Esperimentu osoan zehar arrainei jaten eman zitzaaien arren, arazketa-egunera heldu arte ez zuten gehiegi jan, emandako jana ontzian hondoa ikusten baitzen, eta hori izan zitekeen pisu-galera sortzeko arrazoiatariko bat.

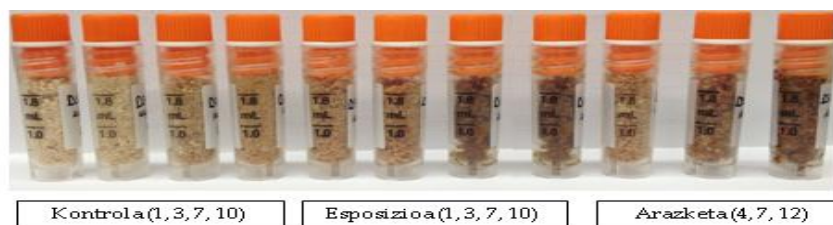
1. taula. Arrainen datu morfometrikoak eta gibelaren organometria (batezbestekoa \pm desbideratze estandarra): luzera (cm), arrain osoaren pisua (g) eta gibelaren pisua (g).

	Luzera (cm)		Arrainaren pisua (g)		Gibelaren pisua (g)	
	Esposatua	Kontrola	Esposatua	Kontrola	Esposatua	Kontrola
1.eguna	13,4 \pm 0,9	12,8 \pm 0,6	24,48 \pm 5,41	22,61 \pm 4,40	0,54 \pm 0,18	0,43 \pm 0,12
3.eguna	13,2 \pm 0,9	13,3 \pm 0,6	25,37 \pm 4,69	24,92 \pm 2,20	0,51 \pm 0,14	0,48 \pm 0,19
7.eguna	13,4 \pm 0,6	13,2 \pm 1,6	24,89 \pm 3,90	24,18 \pm 6,56	0,38 \pm 0,14	0,49 \pm 0,16
10.eguna	12,8 \pm 0,6	13,6 \pm 0,9	20,76 \pm 2,51	25,13 \pm 3,77	0,25 \pm 0,09	0,41 \pm 0,14
14.eguna	13,3 \pm 0,9	---	24,09 \pm 4,33	---	0,41 \pm 0,16	---
17.eguna	13,3 \pm 1,0	---	23,16 \pm 4,91	---	0,34 \pm 0,15	---
22.eguna	13,1 \pm 0,9	---	23,41 \pm 6,08	---	0,28 \pm 0,22	---

Azkenik, gibelaren pisuari erreparatu badiogu, esposizioko lehenengo bi egunetan pisua nahiko egonkor mantendu zen, baina 7. egunetik aurrera pisuak behera egin zuen (ikus 1. taula). Era horretan, 10. egunerako desberdintasun esanguratsua zeuden esposizioko eta kontrolako ontzian artean. Behin arazketa egunera helduta, bazirudien gibelaren pisua berreskuratuko zela (14. eguna), baina hurrengo egunetan berriro beherakada bat ikusi zen, esposizioko 7. eta 10. egunetako pareko balioak lortuz. Badirudi, EDCen ondorioz, gibela kaltetu zela, eta arrain osoaren pisuarekin gertatzen denaren kontrara, arazketa garaian ez zela gai izan hasierako balioak berreskuratzeke.

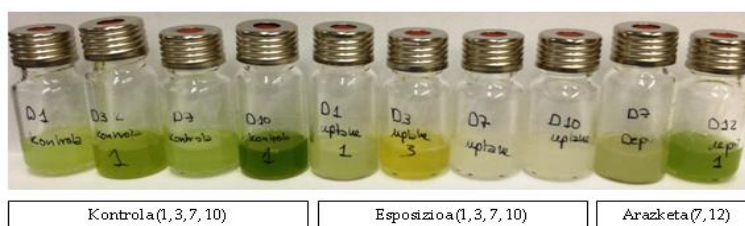
Gibelaren koloreari eta testurari erreparatu gero (1 irudia), esan daiteke, egunak igaro ahala, liofilizatutako gibelaren kolorea iluntzen zihoala eta itxura geroz eta koipetsuagoa zela. Kolore aldaketa hori, lehenago aipatu berri den gibelaren pisuarekin zuzenki erlazionaturik egon daiteke, gibelaren pisua minimoa zen kasuetan, kolorerik ilunena lortu baitzen.

1. irudia. Arrain-talde desberdinetan (n=10) jasotako gibelaren itxura liofilizatu ostean.



Gibelarekin gertatu zen moduan, behazunean ere esposizio-egunen menpeko aldaketa nabariak ikusi ziren koloreari dagokionez (2. irudia). Kontrolako arrainen behazunaren kolorea berde mantendu zen 10 egunetan zehar, tonu-aldaketa batzuk gorabehera. Esposizio-ontziko arrainetatik jasotako behazunean, aldiz, egunak aurrera joan ahala, behazunaren kolorea aldatzen joan zen. Nabariena esposizioko 7. eta 10. egunean ikusi zen, non, behazun-xixkuan zegoen likidoak kolore zuria eta itxura koipetua zuen. Behin arazketa-egunak aurrera joan ahala, behazunaren itxura hobetzen joan zen, hau da, behazunaren berde kolorea berreskuratu egin zen.

2. irudia. Arrain-talde desberdinetan (n=10) jasotako behazunaren kolorea Milli-Q urarekin eta fosfato tanpoiarekin diluitu ostean.



Gibelean eta behazunean gertatutako aldaketa fisikoen ondorioz, pentsa zitekeen EDCen eraginagatik gibela kalteturik zegoela eta ez zela gai behar bezala bere eginkizunak betetzeko. Gibelaren funtzioetako bat, azido biliarren sintesia da, bertan dagoen kolesterolek (CHL) abiatuz (Stellaard et al., 2016). Badirudi, esposaturiko lupien gibela ez zela gai izan azido biliarrik sintetizatzen, eta ondorioz, eraldatu gabeko kolesterola behazun-poltsan pilatu zela. Hipotesi hori baieztatu zen CHLaren analisiak behazunean egin ostean.

3.3 Ur-laginak

Esperimentuak iraun bitartean, EDC desberdinen kontzentrazioak neurtu ziren kontrol eta esposizioko ontzietan. Kontroleko ontzian BPA izan zen antzeman zen konposatu bakarra 23-57 ng/L bitartean. BPA, plastikoen osagaietariko bat izanik, ohikoak izaten dira BPA konposatuarekin izaten diren kutsadura arazoak (Salgueiro-González et al., 2012).

Esposatutako ontzian, aldiz, BPA (112 ng/L), E2 (102 ng/L) eta 4tOParen (101 ng/g) kontzentrazioak nominalen (150 ng/L) parekoak izan ziren 0. egunean, hau da, arrainik ez zegoen egunean, DESaren kasuan izan ezik, bere kontzentrazioa apur bat baxuagoa baitzen (68 ng/L). Esposizio-egunak aurrera joan ahala, eta arrainak ontzira sartzearekin batera, uretan muki itxura zuten zuntz antzekoak ikusi ziren ontzian (arrainen defentsa mekanismoa, Guardiola et al., 2015). Muki horien agerpenarekin 4tOP, DES eta E2 analitoen kasuan kontzentrazioen beherakada ikusi zen urak 0,45 μm -tako iragazkietatik iragazten zirenean. BPAREN kasuan 0. egunean neurtutako pareko balioak lortu ziren. Ura iragazi gabe kontzentrazioak 0. eguneko parekoak izan ziren, beraz, gainontzeko egunen urak iragazi gabe egitea erabaki zen. Esperimentuak iraun bitartean neurturiko uren kontzentrazioa hurrengoak izan zen: BPA (97 ± 12), 4tOP (87 ± 24), DES (59 ± 12) eta E2 (78 ± 17). Azkenik, behin arasketa garaira helduta, BPA izan zen antzeman zen konposatu bakarra 47-55 ng/L bitartean, balio horiek kontroleko ontzian neurtutako parekoak ziren, beraz, badirudi arrainek ez zutela inolako konposaturik kanporatu arasketa-egunetan zehar.

3.4 Konposatuen metaketa arrainen organo desberdinetan

Arrainak, 4 EDC desberdinen 150 ng/L-ko kontzentrazioa esposatuak egon ziren arren, 3.3 atalean ikusi den moduan, lehenengo 3 egunetan, lupiak 4 EDCetara esposatuak egon ziren eta ondorengo egunetan, badirudi BPA izan zela uretan disolbatu zegoen konposatu bakarra.

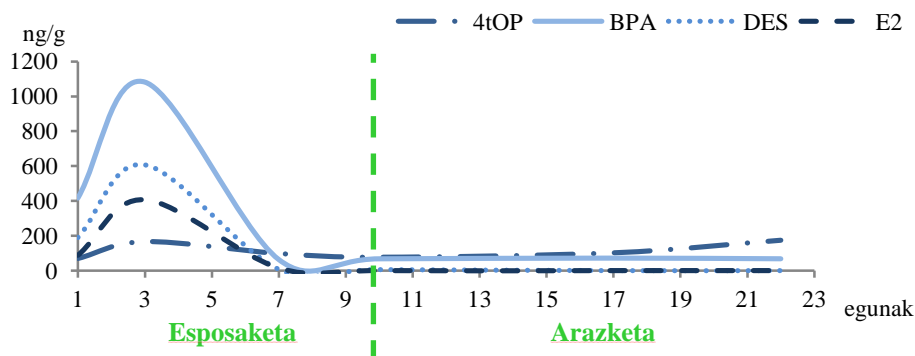
Analitoen metaketa behazunean

Arrainaren behazunean 1. egunetik aurrera aztertutako 4 EDCak metatzen hasi ziren (3.irudia) esperimentuko 3. egunera arte, non aztertutako 4 konposatuentzako maximo bat ikusten den. 7. egunetik aurrera ez zen konposatuen inolako metaketarik ikusi eta hemendik aurrerako egunetan ere ez zen inolako konposaturik antzeman. Lehenago aipatu den moduan, 7. egunetik aurrera lortu zen likidoa, behazuna ez zelako susmoa geneukan, eta CHL izan zitekeela uste zen. Hala ere, argi geratzen da arrainaren organismo barruan aldaketak gertatu zirela. Wu eta lankideek (Wu et al., 2016) heldugabeko karpak (*Cyprinus carpio*) BPAREN kontzentrazio desberdinetara (0,1-1.000 $\mu\text{g/L}$) esposatu ondoren, gibelaren metabolismoa kaltetu zelako susmoa zuten, analitoen kanporatzea oztopatuz. Gure kasuan, lupiak BPARA esposatuak izateaz gain, beste hiru

EDCra esposatuak izan dira. Konposatuena nahasketei esposatuak izan diren arrainen kalteak handiagoak direla kontuan edukita, suposa daiteke BPAk, DES-ak, E2-ak eta 4tOP-ak kalteak sortu zituztela gibelean eta, ondorioz, behazunean metatzen diren kontzentrazio-mailan eragina eduki zutela.

BPA da maila altuenean metatu zen konposatua, gero DES, E2 eta metatzeko joera gutxien zuen konposatua 4tOP da (3.irudia). Aipatu beharra dago, BPA izan dela uretan era askean egon den konposatu bakarra, eta hori izan daitekeela BPA kontzentrazio altuenean ikusteko arrazoietako bat.

3. irudia. Arrainen behazunean ikusitako metaketa ng/g-tan. 1-10 egunak esposizio garaia dagozkie eta 11-22 egunak arazketa garaia.

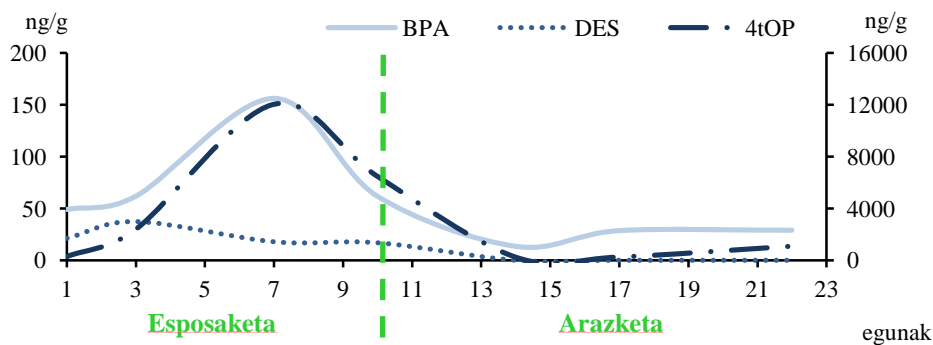


Analitoen metaketa gibelean

Gibel laginei dagokienez, DES analitoak metatze maximoa 3. egunean erakutsi zuen bitartean 4tOPk eta BPAk esposizioako 7. egunean izan zuten maximoa (4. irudia). Badirudi gibelaren mekanismoa kaltetuz zihoala egunetan zehar eta konposatuak metabolizatu eta behazunaren bidez kaleratu beharrean, gibelean metatzen hasi zirela. Hori ikusita, ondoriozta daiteke, EDCen eraginez, gibelaren itxura fisikoa aldatzeaz gain, gibelaren metabolismoa guztiz kalteturik egon zitekeela, eta ondorioz ez zen gai konposatuak hidrolisatzen jarraitzeko.

Arazketa garaia erreparatzen badiogu, konposatuak 14. egunean zuten metatze txiki horrekin, gibelaren metabolismoa apur bat hobetu zelaren susmoa egon daiteke, hala ere, hipotesi hori baieztatu ahal izateko, azterketa gehiago egin behar dira. Gernhofër eta lankideen arabera (Gernhöfer et al., 2001), EDC desberdinetara esposatutako arrainek, 3 hilabete behar izan zituzten arazketa garaian gibela eta giltzurrunaren erabateko berreskurapena lortzeko

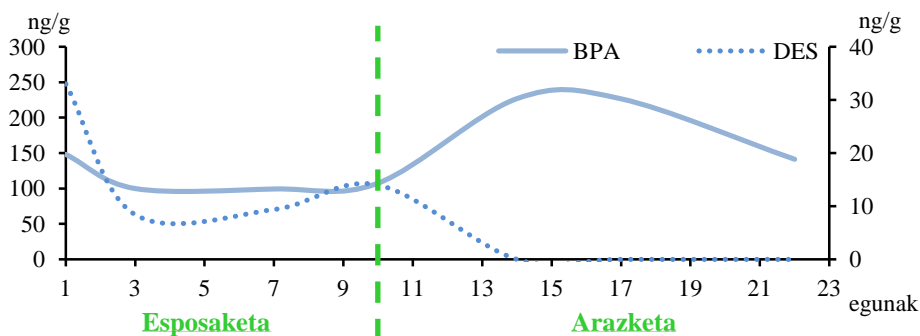
4. irudia. Arrainen gibelean ikusitako metaketa ng/g-tan. 4tOP analitoa eskumako Y ardatzean dago irudikaturik eta DES eta BPA ezkerreko Y ardatzean. 1-10 egunak esposatutako garaia dagozkie eta 11-22 egunak arazketa garaia.



Analitoen metaketa plasman

Plasma laginei erreparatzen badiegu (5. irudia), BPA eta DES izan ziren antzemandako EDC bakarrak eta BPA izan zen kontzentrazio altuenean zegoen konposatua. Konposatu horren metaketa esposizioeko lehenengo egunetik hirugarrenera jaitsi egin zen arazketa-garaia heldu arte konstante mantentzeko. Arazketa-garaian, BPAREN kontzentrazioa plasman igo egin zen eta oso astiro jaitsi zen hasierako balioetara heldu arte. DESaren konportamendua antzekoa izan zen esposizio-garaian baina arazketa hasi zenean konposatua metodoaren detekzio muga balioetatik behera zegoen, BPA ez bezala.

5. irudia. Arrainen plasman ikusitako metaketa ng/g-tan. BPA analitoa ezkerreko Y ardatzean dago irudikatuta eta DES eskumako Y ardatzean. 1-10 egunak esposatutako garaiari dagozkio eta 11-22 egunak arazketa garaiari.



4. Ondorioak

Disruptore endokrinoak diren 4 konposaturen metaketa aztertu zen heldugabeko lupien atal desberdinetan (behazuna, gibela eta plasma). Nahiz eta erabilitako kontzentrazioa baxua izan, askotan ingurumenean aurkitzen denaren parekoa, badirudi nahikoa izan zela azterturiko arrainetan hainbat kalte eragiteko. Posiblea da erabilitako konposatuen nahasketak toxikotasuna handitu izana eta, nahiz eta kontzentrazio baxuak izan, nahikoa izatea heldugabeko arrainetan kalteak eragiteko. Kalte horien ondorioz, badirudi arrainek defentsa mekanismoa martxan jarri zutela konposatu arrotzak gorputzetik kanporatzeko. Esperimentuaren hasieran (1-3. egunak) arrainaren mekanismoak behar bezala funtzionatu zuen konposatuak behazunetik kanporatuz. Egundak aurrera joan ahala, ohiko mekanismoa kaltetzen joan zen eta konposatuak gibelean metatu ziren nagusiki. Azkenik, gibelaren mekanismoa are gehiago kaltetzearekin batera, gibelean zegoen BPA guztia plasmara igaro delako susmoa dago. Azken finean, konposatu arrotzak kanporatzeko ohiko bideak ez badu funtzionatzen, arrainak beste mekanismo batzuk bilatu behar ditu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan lortu diren emaitzak ikusita, argi geratzen laborategiko esperimenduak burutu behar direla ingurumenean gertatzen dena hobeto ulertu ahal izateko. Beraz, etorkizuneko lana, ingurumenean dauden arrainen azterketa egtea ziango litzateke laborategiko esperimenduan lortu dugun informazioaz baliatuz.

6. Erreferentziak

Bergman, Å.; Heindel, J.J.; Jobling, S.; Kidd, K.A.; Zoeller, R.T. (2012): State of the science of endocrine disrupting chemicals. - An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO. *World Health Organization*.

Álvarez-Muñoz, D.; Rodríguez-Mozaz, S.; Maulvault, A.L.; Tediosi, A.; Fernández-Tejedor, M.; Van den Heuvel, F.; Kotterman, M.; Marques, A.; Barceló, D. (2015): Occurrence of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in macroalgae, bivalves, and fish from coastal areas in Europe. *Environ. Res.* 143, Part B, 56-64.

Bizarro, C.; Ros, O. ; Vallejo, A.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Cajaraville, M.P.; Ortiz-Zarragoitia, M.(2014): Intersex condition and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). *Mar. Environ. Res.* 96, 19-28.

Brack, W.; Ait-Aissa, S.; Burgess, R.M.; Busch, W.; Creusot, N.; Di Paolo, C.; Escher, B.I.; Mark Hewitt, L.; Hilscherova, K.; Hollender, J.; Hollert, H.; Jonker, W.; Kool, J.; Lamoree, M.; Muschket, M.; Neumann, S.; Rostkowski, P.; Ruttkies, C.; Schollee, J.; Schymanski, E.L.; Schulze, T.; Seiler, T.-B.; Tindall, A.J.; De Aragão Umbuzeiro, G.; Vrana, B.; Krauss, M. (2016): Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments-An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073-1118.

Ferreira-Leach, A.M.R. ; Hill, E.M. (2001): Bioconcentration and distribution of 4-tert-octylphenol residues in tissues of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.* 51, 75-89.

Gernhöfer, M.; Pawert, M.; Schramm, M.; Müller, E.; Triebkorn, R. (2001): Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *J. Aquat.Ecosys. Stress Recov.* 8, 241-260.

Gibson, R.; Tyler, C.R.; Hill, E.M. (2005): Analytical methodology for the identification of estrogenic contaminants in fish bile. *J. Chromatogr. A* 1066, 33-40.

Guardiola, F.A.; Dioguardi, M.; Parisi, M.G.; Trapani, M.R.; Meseguer, J.; Cuesta, A.; Cammarata, M.; Esteban, M.A. (2015): Evaluation of waterborne exposure to heavy metals in innate immune defences present on skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 45, 112-123.

Martínez-Gómez, C.; Lamoree, M.; Hamers, T.; van Velzen, M.; Kamstra, J.H.; Fernández, B.; Benedicto, J.; León, V.M.; Vethaak, A.D. (2013): Integrated chemical and biological analysis to explain estrogenic potency in bile extracts of red mullet (*Mullus barbatus*). *Aquat. Toxicol.* 134-135, 1-10.

Mortazavi, S.; Riyahi Bakhtiari, A.; Sari, A.E.; Bahramifar, N.; Rahbarizade, F. (2012): Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4-nonylphenol, octylphenol and bisphenol A. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 1067-1073.

Ros, O. (2016): Metodo analitikoaren garapena disruptore endokrinoen biokontzentrazioa arrainetan determinatzeko. Kimika Analitikoa saila. Euskal Herriko Unibertsitatea.

Ros, O.; Aguirre, J.; Prieto, A.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Vallejo, A. (2015a): Simultaneous enzymatic hydrolysis and extraction of endocrine-disrupting chemicals in fish bile using polyethersulfone polymer. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 7413-7423.

Ros, O.; Vallejo, A.; Blanco-Zubiaguirre, L.; Olivares, M.; Delgado, A.; Etxebarria, N.; Prieto, A. (2015b): Microextraction with polyethersulfone for bisphenol-A, alkylphenols and hormones determination in water samples by means of gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Talanta* 134, 247-255.

Ros, O.; Vallejo, A.; Olivares, M.; Etxebarria, N.; Prieto, A. (2016): Determination of endocrine disrupting compounds in fish liver, brain and muscle using focused ultrasound solid-liquid extraction and dispersive solid phase extraction as clean-up strategy. *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 5689-5700.

Salgueiro-González, N.; Concha-Graña, E.; Turnes-Carou, I.; Muniategui-Lorenzo, S.; López-Mahía, P.; Prada-Rodríguez, D. (2012): Determination of alkylphenols and bisphenol A in seawater samples by dispersive liquid-liquid microextraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for compliance with environmental quality standards (Directive 2008/105/EC). *J. Chromatogr. A* 1223, 1-8.

Stasinakis, A.S.; Mermigka, S.; Samaras, V.G.; Farmaki, E.; Thomaidis, N.S. (2012): Occurrence of endocrine disrupters and selected pharmaceuticals in Aisonas River (Greece) and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 1574-1583.

Stellaard, F.; von Bergmann, K.; Sudhop, T.; Lütjohann, D. (2016): The value of surrogate markers to monitor cholesterol absorption, synthesis and bioconversion to bile acids under lipid lowering therapies. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*

Tang, J.Y.M.; McCarty, S.; Glenn, E.; Neale, P.A.; Warne, M.S.J.; Escher, B.I. (2013): Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Res.* 47, 3300-3314.

Wang, B.; Dong, F.; Chen, S.; Chen, M.; Bai, Y.; Tan, J.; Li, F.; Wang, Q. (2016): Phenolic endocrine disrupting chemicals in an urban receiving river (Panlong river) of Yunnan-Guizhou plateau: Occurrence, bioaccumulation and sources. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 133-142.

Wu, M.; Pan, C.; Yang, M.; Xu, B.; Lei, X.; Ma, J.; Cai, L.; Chen, J. (2016): Chemical analysis of fish bile extracts for monitoring endocrine disrupting chemical exposure in water: Bisphenol A, alkylphenols, and norethindrone. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 182-190.

Yang, J.; Li, H.; Ran, Y.; Chan, K. (2014): Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere* 107, 439-446.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau Espainiako Zientzia eta Berrikuntzako ministerioak eta Europako Garapen Eskualdeko diru-laguntzaz (ERDF) finantzatua izan da CTM2014-56628-C3-1-R proiektuaren bidez. O. Rosek eskerrak eman nahi dizkio Euskal Herriko Unibertsitateari doktore aurreko laguntzagatik. Lan hau “metodo analitikoen garapena disruptore endokrinoen biokontzentrazioa arrainetan determinatzeko” tesiaren eratorria da (Ros, 2016).