



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

**Burmuinaren eta gonadaren
arteko harremanak ugalketaren
eraenketan: gene esangarrien
transkripzioaldaketak Pasaiaiko
Chelon labrosus korrokoien
gametogenesisian**

*Ainara Valencia, Josu Andrieu,
Anthony Nzioka, Ibon Cancio eta
Maren Ortiz-Zarragoitia*

96-102 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.14>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Universidad
de Navarra

Burmuinaren eta gonadaren arteko harremanak ugalketaren eraenketan: gene esangarrien transkripzio-aldaketak Pasaiaiko *Chelon labrosus* korrokoien gametogenesisian

Ainara Valencia, Josu Andrieu, Anthony Nzioka, Ibon Cancio, Maren Ortiz-Zarragoitia.

ZBIT ikerketa taldea, Plentziako Itsas Estazioa (PiE-UPV/EHU) eta Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Leioa, Euskal Herria

ainara.valencia@ehu.eus

Laburpena

Hipotalamo-guruin Pituitario-Gonada ardatza (HPG ardatza) ugalketa eta gametogenesisiaren arduraduna da ornodunetan. Gene ugari dira ardatzean parte hartzen dutenak; horietako batzuk aukeratu ziren *Chelon labrosus* espezieko korrokoari ar eta emeen ziklo gametogenikoan duten transkripzio-patroia aztertzeko: *kiss2*, *gpr54*, *gnrh1*, *gtha*, *lh β* , *fsh β* eta *lhr*. Ar eta emeen arteko desberdintasunak ikusi ziren transkripzio-mailetan; emeetan gametogenesisiaren zeharreko beste arrain espezieetan deskribaturiko patroia ezagunak ikusi zirelarik. Arretan aldiz, ikusitako transkripzio-aldaketak ez ziren hain nabariak izan, batez ere gonadotropinetan, eta kutsadura bezalako kanpo eragile baten efektua izan zitekeela proposatzen da.

Hitz gakoak: burmuina, guruin pituitario, gonada, hormonak, ugalketaren kontrola, *Chelon labrosus*

Abstract

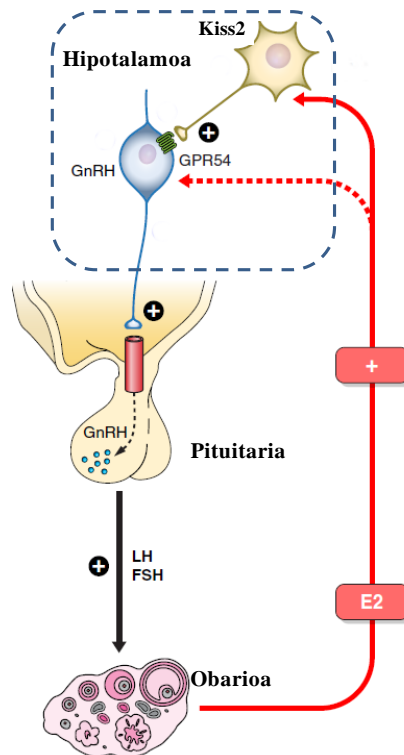
The hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG axis) controls reproduction and gametogenesis in vertebrates. Several genes are involved coordinately in the axis; Transcription patterns of kiss2, gpr54, gnrh1, gtha, lh β , fsh β and lhr were analyzed along the gametogenesis of female and male Chelon labrosus thicklip grey mullets. Differences between males and females were observed. Females showed transcription patterns in accordance with those previously described for other teleosts. However, males showed different transcription profiles, genes not being so strongly regulated along spermatogenesis. Thus, we suggest that environmental factors such as exposure to environmental contaminants may be involved.

Keywords: Brain, pituitary, gonad, hormones, reproduction control, Chelon labrosus

1. Sarrera / momentuko egoera

Ornodunetan burmuinak agintzen ditu gonada-mailako gertaerak, inguruneko kinadak eta portamolde indibidualari zein sozialari loturiko keinuak, ugalketa-prozesuekin integratuz. Honetan oso garrantzitsuak dira hipotalamo eta guruin pituitarioa, zenbait prozesuen turrusta agintzen dutelarik osatzen duten hipotalamo-guruin pituitario-gonada ardatzaren (HPG ardatza) baitan. HPG ardatza osatzen duten organoen arteko komunikazioa (1- irudia) etengabekoa da; bai organoak osatzen dituzten zelulen artean, zein organoen artean. Modu horretan, ardatzaren osagai guztiak sinkronizatuta daude organismoaren bizi-ziklo osoan zehar. Arrainen garapenean ere garrantzi handia du HPG ardatzak. Ardatzaren funtzionamenduan parte hartzen duten geneen transkripzio-eredua arrainen bizi-zikloan eta ugalketa-zikloan zehar aldatuz doa, bakoitzak momentu konkretu batean burutuko baitu bere funtzioa. Kanpoko faktoreek, horien artean hartu-eman sozialek, fotoperiodoak, tenperatura aldaketak, elikagaien eskuragarritasunak zein kutsatzaileen presentziak ere, organo desberdinekin elkarrekintzak sortzen dituzte, ardatzaren funtzionamendua eraenduz edota oztopatuz; edozein fasetan ematen den aldaketak ugalketan desoreka sor dezakeelarik.

1. irudia: Hipotalamo-guruin Pituitario-Gonada (HPG) ardatza. Hipotalamoak kanpo eta barne kinaden aurrean erantzuten du kisspeptina moduko seinale molekular askatuz. Hauek GPR54 hartzaileak dituzten zeluletan GnRH sortzearen erantzuleak dira. GnRH neuropeptidoak guruin pituitarioa kitzikatzen du LH eta FSH gonadotropinak sortu eta zirkulazio sistemara askatu ditzan. Gonadotropinek gonadaren garapena eta gametoen heltzea bultzatzen dute. Gonadan sintetizatzen diren sexu-esteroideek zirkulazio sistemaren bitartez *feedback* erantzunak (positiboak zein negatiboak) sortzen dituzte HPG ardatzean. (irudia Pinilla et al. 2012tik eraldatua).



Azken urteotan HPG ardatzaren osagai desberdinen azterketa burutu da hainbat arrain espezieetan. Guruin pituitarioan sintetizatzen diren gonadotropina hormonon garrantzia jakina da aspalditik, baina beste hainbat osagaien funtzio zehatzak ezezagunak ziren arrainetan orain dela gutxira arte. Ingurune kinadak hipotalamoan integratzen dira. Bertan, kisspeptinak deritzen neuropeptidoen sistemak pubertaro eta ugalketaren kontrol neuroendokrinoan paper garrantzitsua du (Mechaly et al., 2012; Roa et al., 2008; Zohar et al., 2010), baina arrainetan sistemaren funtzionamendu zehatzaren ezjakintasuna dago oraindik. Kisspeptinen eta beraien hartzaileen arteko elkarrekintzek eragina dute hipotalamoan dauden neurona gonadotropina hormona askatzaileengan (GnRH) eta gerora guruin pituitarioan gertatuko den gonadotropinen jariaketan. Izan ere, askatutako GnRHa guruin pituitarioa iristen da, non gonadotropinen sintesia aktibatuko den. Uste da kisspeptinen sistema ingurune kinada fisikoen eta seinale metabolikoen arteko bitartekaria dela ugalketa ziklo bakoitzean (Tena-Sempere, 2006). Gainera, arrainetan kisspeptina eta GnRHren arteko lotura argia ikusi da orain arte aztertuak izan diren espezieetan (Zohar et al., 2010), beraz, kisspeptinak izango lirarteke ugalketa ziklo bakoitzean ematen den gonadogenesisirako gertakizunen turrustako lehen partaideak.

Bi motako gonadotropinak daude: hormona luteinizatzailea (LH) eta hormona folikulu estimulatzailea (FSH). Bakoitza bi azpiunitatez osatuta dago, komunean duten alfa azpiunitatea (*gtha*) eta bakoitzarentzako espezifikoa den beta azpiunitatea (*lhβ* eta *fshβ*). Gonadotropinak zirkulazio-sisteman zehar guruin pituitariotik gonadetaraino iristen dira, obarioa zein testikuluak kitzikatuz. Izan ere, beharrezkoak dira gametoen eraketaren hastapenerako eta amaierako heltze-prozesua emateko. Gametoen inguruko zelula laguntzaileetan daude kokatuak gonadotropinen hartzaileak: arretan, lh hartzailea (*lhr*)

Leydig-zeluletan dago eta fsh hartzailea (*fshr*) Sertoli-zeluletan; emeetan, *lhr* granulosa-zeluletan dago eta *fshr* aldiz, teka-zeluletan.

Gonadetan azkenik hormona esteroideen sintesia gertatzen da; arretan gonadotropinek 11-ketotestosteronaren sintesia estimulatu dute eta emeetan berriz, 17 β -estradiolarena (Swanson et al., 2003). Esteroideak gonadetan gametogenesisia eragiteaz gain gonadetatik burmuinera ere garraiatzen dira, izan ere, guruin pituitario zein hipotalamoan estrogenu eta androgenoen hartzaile ugari daude (Zohar et al., 2010ean berrikusita). Sexu-estatusaren adierazle izatea da hormona hauen funtzioetako bat; hau da, burmuinari organismoaren sexu-garapenari buruzko informazioa ematen diote eta bertan gertatu beharreko aldaketan eragileak ere badira. Beraz, *feedback* eragina dute HPG ardatzean, gametogenesisiaren hasierako faseetan positiboa eta azken faseetan aldiz negatiboa (Levavi-Sivan, 2010).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Chelon labrosus espezieko korrokoikiak interesekoak dira ingurumen-toxikologiaren arloan, izan ere, kutsaduraren espezie zentinelak modura erabili daitezke (Ortiz-Zarragoitia et al., 2014). Hau horrela, azken 10 urteetan euskal kostaldeko korrokoiki-populazio desberdinetan azterketak burutu dira (Bizarro et al., 2014; Diaz de Cerio et al., 2012; Puy-Azumendi et al., 2013; Sardi et al., 2015; Valencia et al., 2016) eta xenoestrogenoen esposizioaren ondorioz feminizaturiko korrokoikien populazioak aurkitu izan ditugu, Pasaian, Bilboko itsasadarrean, Gernikan zein Ondarroan. Xenoestrogenoen efektu nabarmenena ar intersexen agerpena da. Arren gonadetan obozitoen agerpenari deritza intersex egoera, obozitoak hodi espermatikoetan barrena daudelarik. Intersex egoeraren bilakaeran zehar ematen diren aldaketa molekularrik ez dira guztiz ezagutzen oraindik.

Orain euskal kostaldeko korrokoikien ziklo gametogenikoaren karakterizazioa burutzen ari gara, Pasaiaiko populazioa erreferentziatzat hartuta, gametogenesisiaren urrats ezberdinetan parte hartzen duten geneen transkripzioa neurtuz. Beraz, ikerketa honen helburua *Chelon labrosus* espezieko korrokoikien HPG ardatzean maila desberdinetan parte hartzen duten geneen transkribapena aztertzea da, horretarako ugalketa ziklo osoan zeharreko aldaketak aztertuz. Horretarako, *kiss2* kisspeptina, *gpr54* (*kiss1* genearen hartzailea), *gnrh1*, LH eta FSH hormonaren α eta β azpiunitateak eta *lhr* kodetzen dituzten geneen azterketa burutu da. Eme eta arren gametogenesisian zehar ematen diren geneen transkripzio aldaketak ulertzeak ar intersexen bilakaeran eman behar izan diren aldaketak ulertzea ahalbidetuko du, beraz, lan honen luzera begirako helburua ar intersexetan aurretik ar eta emeetan azterturiko geneen transkripzio mailak neurtzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1 Itu-geneen sekuentzien lorpena

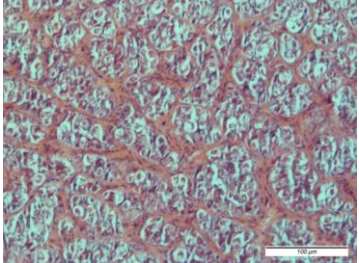
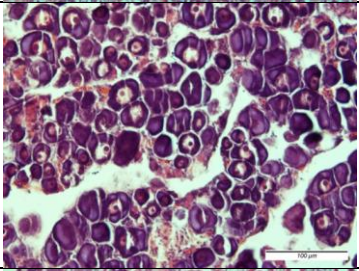
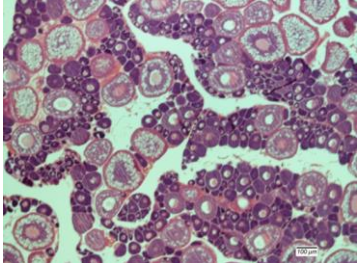
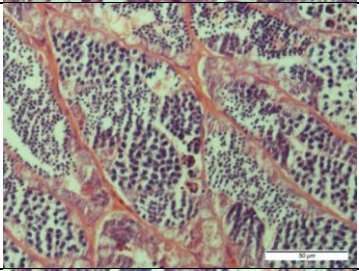
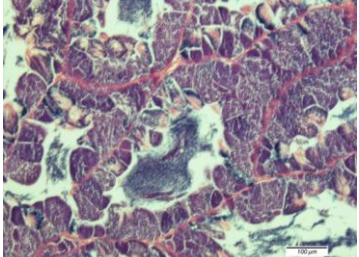
Korrokoikien genoma sekuentziatu gabe egonik, intereseko geneen sekuentziak banaka lortu behar izan genituen. Intereseko geneen sekuentziak lortzeko hasle ez espezifikoa erabili ziren, filogenetikoki gertu dauden beste arrain-espezie batzuen sekuentziak erreferentziatzat erabilita. Hasle horiek korrokoikien laginen gainean PCR arruntak egiteko erabili ziren, ondorioz gure intereseko sekuentzien zatien amplifikazioa lortu zelarik. Behin gene bakoitzaren sekuentzia zehatza lortuta, hasle espezifikoa diseinatu ziren qPCR bidezko transkripzio-analisiak burutu ahal izateko.

3.2 Laginen aukeraketa, sailkapena eta prestaketa

Korrokoikiak Pasaiaiko portuan arrantzatu ziren gametogenesisi ziklo oso batean zehar (azaroa-urtarrila). Tokian bertan burmuina, guruin pituitarioa eta gonada disezionatu ziren, zuzenean izoztu eta -80°C-tan mantendu ziren.

Korroko bakoitzaren sexua eta fase gametogenikoa zehaztu zen gonadaren azterketa histologikoa burutuz (2. irudia). Ondoren, sexu desberdineko eta fase gametogeniko desberdineko indibiduen laginetatik RNA erauzi, cDNA sintetizatu eta itu-geneen transkripzio-maila neurtu zen qPCR bidez.

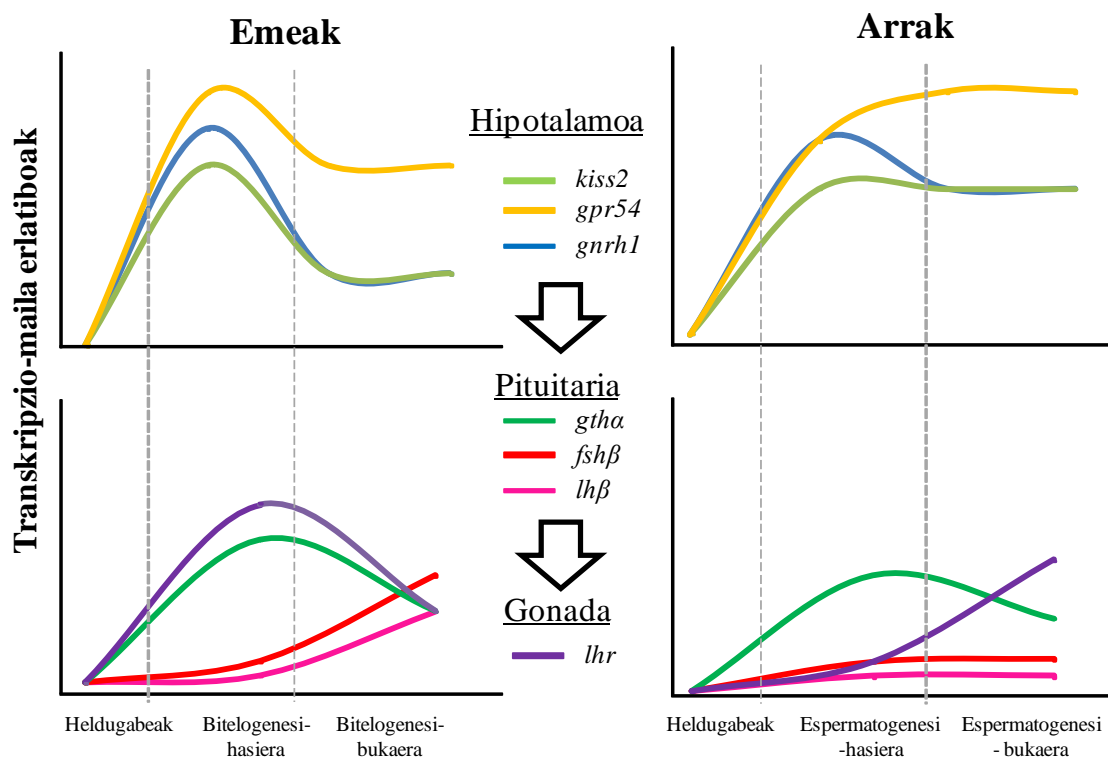
2.irudia. Aztertutako korrokiak histologikoki sailkatzeko erabili ziren irizpideak eta aurkitutako fase gametogeniko bakoitzeko ebaki histologiko adierazgarriena.

Heldugabeak	Zelulen garapen goiztiarra de la eta, ezin dira ar edo eme bezala sailkatu	
Emeak	Bitelogenesi hasiera Obozito prebitelogenikoak bereiz daitezke	
	Bitelogenesi fase aurreratua Bitelogenesisian aurrera egin dute eta obozito handiek bitelogenina pikorrak ditzte barruan	
Arrak	Espermatogenesi hasiera Folikuloetan espermatogoniak eta espermatozitoak nagusi dira	
	Espermatogenesi amaiera Folikuluaren erdialdean espermatozoiden dentsitate handia ikusten da	

3.3 Itu geneen transkripzio-aldaketa ar eta emeen gametogenesisian zehar

Emeen kasuan, burmuineko *kiss2*, *gpr54* eta *gnrh1* geneek antzeko transkripzio-patroia aurkeztu zuten gametogenesisian zehar (3. Irudia). Maila altuenak bitelogenesiaren aurretik deskribatu ziren, ondoren jaitsiz eta konstante mantenduz bitelogenesiaren amaieran. Transkripzio-patroi hau beste arrain espezie batzuetan deskribatu da eta ondorioztatu daiteke kisspeptinaren eta bere hartzailearen beharra dagoela ugaltze-ziklo berri bakoitzean obogenesi-prozesua abiarazteko. Guruin pituitarioan, *gtha* transkripzio-mailak bitelogenesiaren hasiera-fasean agertu ziren altuen, *lhβ* eta *fshβ*-ri dagokienez aldiz, transkripzioaren emendioa bitelogenesiaren hasieratik bukaerara detektatu zen (3. irudia). Bitelogenesi-prozesuan aurrera egin eta obozitoen haztea burutu ahal izateko LH eta FSH hormonak guztiz beharrezkoak direnaren seinale. Salmonidoetan LHren maila altuenak obogenesiaren amaieran ematen direla ikusi da, obozitoen azken heltze prozesurako beharrezkoa izanik (Levavi-Sivan et al., 2010). Aldiz, salmonidoetan ere, bitelogenesian zeharreko odoleko FSH-mailen handipena gertatzen da, azken heltze-fasean jaitsiera bortitza gertatuz (Levavi-Sivan et al., 2010). Lan honetan aztertutako korrokoiei emeak bitelogenesiaren fase aurreratuan zeuden, baina artean ez zituzten gameto guztiz helduak, beraz, *fshβ* mailak oraindik pilatze-fasean zeuden. LHren hartzaileak obogenesiaren hasieran, LH emendioa eman aurretik, izan zituen transkripzio-maila altuenak azterturiko korrokoiei emetan (3. irudia). Ondorioz, emetan gonadotropinen bi geneetan joera berdina ikusi zen, obogenesia aurrera egin ahala, gonadotropinen geneen transkripzio mailen emendioa gertatu zelarik.

3.irudia. Itu-geneen transkripzio-mailaren joera korrokoiei emeen eta arraren gametogenesisian. Geneak bi taldetan banatu dira: HPG ardatzaren hasieran (hipotalamoa-burmuina) kokatuta dauden *kiss2*, *gpr54* eta *gnrh1*, eta ardatzaren hurrengo urratsetan (guruin pituitarioa eta gonada) kokatuta dauden *gtha*, *fshβ*, *lhβ* eta *lhr* (lau grafikoak eskala berdinean daude).



Korrokoari arretan (3. irudia), geneen transkripzio-mailen joerak emeen desberdinak izan ziren. Espermatogenesisian zehar ikusitako aldaketak ez ziren hain nabariak izan, batez ere guruin pituitarioko geneetan. *gnrh1* transkripzio-mailak espermatogenesisiaren hasieran emendatu ziren, gero behera egin zuten eta konstante mantendu ziren espermatogenesisi amaieran. *kiss2* eta *gpr54* geneek ere goraka egin zuten hasierako fasean, baina ez emeetan bezain nabarmen, ondoren transkripzio-mailak konstante mantendu ziren. Guruin pituitarioko gonadotropinei dagokienez, *gth α* -k emeetan ikusitako joera berdina erakutsi zuen, non espermatogenesisiaren hasieran igo eta ondoren jaitsi egiten zen, baina bi β azpiunitateek ez zuten ia aldaketarik jasan eta konstante mantendu ziren fase guztietan zehar. *Lhr*-aren gainespresioa espermatogenesisi hasieratik amaierara eman zen testikuluetan, hau ere emeekiko desberdina izanik. Salmonidoekin alderatuz, korrokoiek gonadotropinen transkripzio patroia desberdina erakutsi zuten. Orokorrean FSH mailak espermatogenesisian zehar igotzen dira, LHa espermatogenesisi amaieran beharrezkoa den bitartean, espermatozoideen heltzea eta kanporatzea gerta daitezten (Levavi-Sivan et al., 2010). Lan honetan, eta arestian esan bezala, ez ditugu lortu guztiz helduak zeuden indibiduoak, eta beraz gonadotropinen maila maximoak agian detektatu gabe geratu dira. Aztertuak izan diren arrain espezieen artean gonadotropinen espresioari dagokionez, patroia desberdinak daudela ikusi da (Li et al., 2005ean berrikusia) eta ez litzateke arraroa izango espeziaren ezaugarrien arabera gonadotropinen transkripzio-patroia desberdinak izatea. Hala ere, eta kontutan izanik Pasaia leku kutsatua dela eta bertan intersexak diren korrokoiak detektatu direla, kutsatzaile kimikoek arren gametogenesisian izan dezaketen eragina ezin dugu alboratu. Sardi eta laguntzaileek (2015), Pasaia korrokoietan esteroidogenesiko geneen transkripzioa apaltzen zela deskribatu zuten, bertako kutsadura-mailen eragina azpimarratuz. Hortaz, HPG ardatza ere arretan kaltetuta egon daitekeela kontutan hartu beharko genuke. Berriki, Pasaia arren espermaren mugikortasuna eta morfologia ikertzen hasi gara eta lortuko diren emaitzak lagunduko dute arren espermatogenesisia kaltetuta ote dagoen argitzen.

4. Ondorioak

Chelon labrosus espezieko korrokoien gametogenesisian zehar HPG ardatzaren parte-hartzaile diren hainbat geneen transkripzio-mailak neurtu ondoren, hurrengo ondorioetara iritsi gara:

- 1) Emeetan eman ziren transkripzio-mailen aldaketak arretan eman zirenak baino nabariagoak izan ziren.
- 2) *kiss2*, *gpr54* eta *gnrh1* geneen transkripzioaren emendioa gametogenesisiaren hasierako fasean eman zen bi sexutan, gene hauek gametogenesisi goiztiarrean duten kontrola nabarmenduz.
- 3) Emeetan *lh β* eta *fsh β* geneen gorakada bitelogenesi prozesuan zeharrekoa izan zen, orain arte beste arrain espezieetan deskribatu denaren antzera.
- 4) Arretan ez zen *lh β* eta *fsh β* geneen aldaketa nabarmenik ikusi. Honek eta *lhr*-ren emendio berantiarrak kanpo faktoreek eragindako efektuak islatu ditzake.

5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Chelon labrosus espezieko korrokoien gametogenesisiaren ezagupena hobetzeko, HPG ardatzaren parte diren beste hainbat generen azterketa burutuko da (adibidez, *vasa*, *foxl2*, *dmrt1*). Baita ere, korrokoien intersexen azterketa burutuko da arretan, ikusi diren gene transkripzioen joerak hobeto ulertzeko baliagarri izango dena, eta batez ere, kutsatzaileen efektuak zein diren ikustarazteko aukera emango duena.

6. Erreferentziak

- 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
- Diaz de Cerio, O., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cancio, I., (2012). 5S rRNA and accompanying proteins in gonads: powerful markers to identify sex and reproductive endocrine disruption in fish. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7763-7771.
- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E. L., Gómez, A., & Lareyre, J. J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 412-437.
- Li, C. J., Zhou, L., Wang, Y., Hong, Y. H., & Gui, J. F. (2005). Molecular and expression characterization of three gonadotropin subunits common alpha, FSHbeta and LHbeta in groupers. *Mol Cell Endocrinol.* 233, 33-46.
- Mateos, J., Mananos, E., Martinez-Rodriguez, G., Carrillo, M., Querat, B., & Zanuy, S. (2003). Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (alpha, FSHbeta, and LHbeta) and their expression during the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 133, 216-232.
- Mechaly, A. S., Vinas, J., & Piferrer, F. (2012). Sex-specific changes in the expression of kisspeptin, kisspeptin receptor, gonadotropins and gonadotropin receptors in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during a full reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 162(4), 364-371.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Bizarro, C., Rojo-Bartolomé, I., Diaz de Cerio, O., Cajaraville, M.P., Cancio, I., (2014). Mugilid fish are sentinels of exposure to endocrine disrupting compounds in coastal and estuarine environments. *Mar. Drugs* 12, 4756-4782.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Miller, R.P., Tena-Sempere, M. (2010). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92, 1235-1316.
- Puy-Azurmendi, E., Ortiz-Zarragoitia, M., Villagrasa, M., Kuster, M., Aragón, P., Atienza, J., Puchades, R., Maquieira, A., Domínguez, C., López de Alda, M., Fernandes, D., Porte, C., Bayona, J.M., Barceló, D., Cajaraville, M.P. (2013). Exposure and effects of endocrine disruptors in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay). *Sci. Total. Environ.* 443, 233-244.
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 48-69.
- Sardi, A.E., Bizarro, C., Cajaraville, M.P., Ortiz-Zarragoitia, M., (2015). Steroidogenesis and phase II conjugation during the gametogenesis of thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from a population showing intersex condition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 221, 144-145.
- Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 53-59.
- Tena-Sempere, M., (2006). KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* 83, 275-281.
- Valencia, A., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Cancio, I., Ortiz-Zarragoitia, M. (2016). Alteration in molecular markers of oocyte development and intersex condition in mullets impacted by wastewater treatment plant effluents. *Gen Comp Endocrinol (argitaratzeaz)*
- Zohar, Y., Munoz-Cueto, J. A., Elizur, A., & Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165(3), 438-455.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerketa hau, Espainiar MINECO (SEXOVUM AGL2012-33477; ATREoVO ALG2015-63936R), Eusko Jaurlaritza (Doktoretza aurreko beka A.V.-ri, Ikerketa Talde Finkatuak IT-810-13) eta UPV/EHU (UFI 11/37) ikerketa proiektuen bitartez finantzatua izan zen.