



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIA ZEHATZAK ETA NATUR ZIENTZIAK

**Ugalketako disrupzio endokrinoa
Gernika eta Galindoko araztegien
inguruko korrokoietan
(*Chelon labrosus*)**

*LA. Valencia, I. Rojo-Bartolomé,
C. Bizarro, I. Cancio
eta M. Ortiz-Zarragoitia.*

335-341 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.45>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Valencia, A., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Cancio, I., Ortiz-Zarragoitia, M.
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

Valencia, A., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Cancio, I., Ortiz-Zarragoitia, M.

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

Laburpena

Hitz gakoak: xenoestrogenoak, araztegiak, *Chelon labrosus*, intersex egoera, biomarkatzaile molekularrak

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are among the most concerning environmental pollutants due to their effect on animal developmental and reproduction processes. Some EDCs are considered xenoestrogens because they are able to mimic natural estrogen; the most important reproductive hormone in female vertebrates. Waste water treatment plants (WWTP) discharge xenoestrogen to receiving water masses causing fish feminization. In the last years, the effects of the WWTP effluent from Gernika on the local population of thicklip grey mullets, *Chelon labrosus*, has been studied and males with oocytes in their testis (intersex) have been identified. With the aim to continue with the assessment of xenoestrogenic effects in the mullet population from Gernika and extend the study to another potential pollution hot-spot, such as the Galindo WWTP (downstream the city of Bilbao) mullets were captured in June 2013 and February 2014. Histological studies of gonads and gene transcription analysis of xenoestrogen responding genes such as vitellogenin (*vtg*) and *cyp19a1a* aromatase were performed. Novel biomarkers of presence of oocytes such as 5S rRNA and *tffiia* were also assessed transcriptionally. Intersex males which contained oocytes within the testis were observed in Gernika and Galindo. Intersex mullets showed higher 5S/18S rRNA index and *tffiia* transcription levels in gonads than males, and similar to females. These two molecular markers showed a positive correlation with the scored intersex severity index. Transcription levels of *vtg* did not show differences between males and intersex. In summary, results suggest that mullet populations from Galindo and Gernika are exposed to xenoestrogenic chemicals.

335

1. Sarrera eta motibazioa

1.1 Disruptore Endokrinoak (EDC)

Disruptore endokrinoak diren gai kimikoak (EDCak) ingurugiroko kutsatzaile kezkarrienetarikoak dira, animalien garapen eta ugalketan dituzten ondorioak direla eta. Substantzia hauek sistema endokrinoaren funtzionamendu egokia kaltetzen dute, hormonon bidezidorretan eragina dutelarik (Crews et al., 2000). Bestalde, epe luzerako ondorioak izan ditzakete EDCek, esposatutako organismoen ondorengoei eraginez eta populazioen dinamikan kaltegarriak izanik (WHO/UNEP, 2013).

Azken urteetan substantzia kimiko sorta zabal/handi bat EDC modura sailkatuak izan dira. Horien artean, alkilfenolak, ftalatoak, substantzia poliklorinatuak, hidrokarburo aromatiko poliziklikoak, fungizidak eta pestizidak esaterako. Gai kimiko industrialak ingurune urtarretara iristen dira nekazal isurketen, araztegi eta isuri industrialen ondorioz. Autore desberdinek ingurunean agertzen diren EDCen jatorri nagusia giza jarduerak direla dokumentatu dute (Langston et al., 2005; Campbell et al., 2006).

EDCen artean xenoestrogenoak dira kezka gehien sortarazten ari direnak (WHO/UNEP, 2013), ornodun emeetan ugalketarako garrantzitsuena den hormona, estrogenoa, imitatzeke gai direlako. Erraz biometatzeko gaitasun handia edukitzeak, lipofilikoak eta iraunkortasun handikoak direnez (Langston et al., 2005; Porte et al., 2006), arazoak sortarazten dituzte animalien desberdintzapen sexualean eta gametogenesisian. Ingurugiroko estrogenoen artean hormona natural zein sintetikoak aurki ditzakegu. Naturalen artean, animalietatik datozen estrogenoak (17β -estradiola, progesterona...), onddoetatik datozen mikoestrogenoak eta landareetatik datozen fitoestrogenoak (WHO/UNEP, 2013). Xenoestrogeno ez-naturalen artean hormona sintetikoak aurki ditzakegu, hala nola ezagunena den 17α -ethinilestradiola, pilula antisorgailuetan erabiltzen dena. Gorago aipatutako hainbat konposatu kimikoak ere xenoestrogenikoak dira. Guztiak ingurunean aurki daitezke eta bertan dauden organismoekin elkarrengatik gai dira, kontzentrazio baxuetan bada ere. Xenoestrogenoak estrogeno hartzaileei lotzen zaizkie eta ondorioz, efektu kaltegarriak eragiten dituzte beraien eraginpean egon diren bizidunetan. Estrogenoak oso garrantzitsuak dira animalien funtzio desberdinak modu egokian aurrera eraman ahal izateko; beharrezkoak dira garapen, ugalketa, hazkuntza eta ernalketa modu egokian eman daitezen (CSTEE, 1999). Xenoestrogenoen eraginpean egoteak funtzio guzti horien aldaketa ekar dezake eta ondorioz, ugalkortasunaren murrizpena sor dezakete (Jobling et al., 1996).

1.2 Ugalketako disruptzio endokrinorako biomarkatzaileak

Biomarkatzaileak tresna baliagarriak bilakatu dira, kutsatzaile jakin batek organismo batean izan ditzakeen eragin biologikoak ebaluatzeke erabilgarriak baitira, eta horri esker, datu kimikoak erabili ordez, osasun datuetan oinarrituriko ingurugiroko kalitate-azterketak egitea posible bihurtu da (Cajaraville et al., 2000; Bizarro et al., 2014). Biomarkatzaileek organismo bat kutsatzaile baten eraginpean egon ote den eta, horrela izanik, horren aurrean erantzuten ari ote denari buruzko informazioa ematen digute. Normalean aztertzen diren erantzun biologikoak molekula, zelula edota ehun mailakoak dira. Maila baxuko antolaketa biologikoko erantzunek, gerora maila altuagoko antolaketa biologikoetan (fisiologian, organismoan, populazioan) gerta daitezkeen efektuei buruzko abisu goiztiarrak ematen dituzte. Horrela izanik, biomarkatzaileak, epe luzera osasunean eman daitezkeen eraginen epe goiztiarreko adierazleak dira (Cajaraville et al., 2000).

Xenoestrogenoen eragina jasaten duten arrainetan alterazio desberdinak deskribatu dira azken urteetan. Esaterako, bitelogenina (vtg) proteinaren indukzioa, xenoestrogenoen eraginpean dauden ar eta heldugabeetan ematen da. Izan ere, proteina hau obozitoen metaketa-proteinaren aitzindaria da, eta estrogenoaren menpe ekoizten da. Estrogeno exogenoek vtg geneen transkripzioa areagotzen dutenez, konposatu estrogenikoen esposizioaren adierazle (biomarkatzaile) modura erabiltzen da, bai laborategi zein zelaiko ikerketetan. Horretaz gain, xenoestrogenoek sexu-determinazio eta desberdintzapena moldarazten dute. Horren ondorioz aldaketak ematen dira ugalketa zikloan; heldutasuna atzeratzen da, intersex motako gonadak

eratzten dira eta kasurik larrienen erabateko sexu-aldaketa gertatzen da (Devlin eta Nagahama, 2002). Horrelako aldaketa bakoitza xenoestrogenoen eraginen biomarkatzaile gisa balia dezakegu. Hala ere, estrogeno esposizioak eragiten dituen ondorioak, indibiduoaren garapen eta ugalketa fasearen arabera dira, sexu desberdintzapen goiztiarra izanik indibiduoak sentikortasun handiena duen garaia (Piferrer, 2001).

Intersex egoera, espezie gonokoristikoetan (ar eta emeak desberdintzen diren espezieak) barrabilen barruan obozitoak agertzea da (Bahamonde et al., 2013; Bizarro et al., 2014). Xenoestrogenoen eraginaren ondorioz ematen den arrainen gonadetako alteraziorik ezagunena eta deigarriena da.

Cyp19 aromatasak hormona esteroideoen sintesian jarduten dira, androgenoak estrogeno bihurtzen duten entzimak dira. Ornodunen estrogeno maila erregulatzen dute aromatasek, ondorioz, arrainen sexu-determinazio eta -desberdintzapenean oso garrantzitsuak dira (Devlin eta Nagahama, 2002). Arrainetan bi aromata isoforma deskribatu dira, *cyp19a1a* eta *cyp19a1b*. Beraien desberdintasun nagusia agertzen duten ehun transkripzio diferentia da; *cyp19a1a* obarioan adierazten da batez ere eta *cyp19a1b* burmuinean. Gene hauek EDCen iturri geneak dira eta horrek alterazioak sor ditzake estrogenoaren menpe dauden prozesuetan. Ondorioz, aromata genearen transkripzio mailen desorekak EDC aurreko biomarkatzaile indartsuak dira (Diotel et al., 2010; Bizarro et al., 2014).

Azken urteetan gure ikerketa taldeak zenbait biomarkatzaile molekular berri aurkitu ditu, obozitoen presentziaz modu errazean ohartarazi dezaketenak. 5S rRNA, erribosomen azpiunitate handiena eratze beharrezkoa den RNA erribosomikoa da. Ikusi denez, garatzen ari diren arrain-obozitoetan transkripzio oso altua ematen da (Diaz de Cerio et al., 2012; Ortiz-Zarragoitia et al., 2014). Berdina gertatzen da bere transkripzioaren erregulazioan eta zitosoleko metaketan parte hartzen duen *tfiia*, transkripzio faktore IIIA-rekin. 5S rRNA-ren pilaketa, ernalketa arrakastatsu baten ondoren enbrioaren hasierako garapena sostengatzeko beharrezkoa dela hipotetizatu da (Diaz de Cerio et al., 2012; Ortiz-Zarragoitia et al., 2014), horrela enbrioak proteinen sintesirako beharko dituen erribosomak eskuragarri izango dituelarik. Obozitoetan ematen den 5S rRNA eta TFIIIA transkripzio altuak, hauek sexu-biomarkatzaile bezala, eta arretan eragin xenoestrogenikoen adierazle gisa erabiltzea ahalbidetzen du (Diaz de Cerio et al., 2012).

1.3. Araztegien efektu xenoestrogenikoak

90. hamarkadaz geroztik araztegi-tako isurpenek, Erresuma Batu eta Estatu Batuetako ur gezetako arrainengan eragin estrogenikoak izan dutela igarri da (Jobling, 1998). Araztegiek beraien isurietan mota askotako EDCak askatzen dituzte. Substantzia guztiak nahasketa kimiko konplexuetan agertzen dira, eragin gehigarri edo sinergistikoak sortarazi daitezkeelarik bertako biotaren gainean. Zelai ikerketa desberdinetan substantzia hauen presentziaren eta bertako arrain populazioetan ematen diren eragin estrogenikoen arteko korrelazioa badagoela ikusi da (Sumpter and Jobling 1995; Jobling et al., 1998; Puy-Azurmendi et al., 2013).

Euskal Herrian antzemandako lehenengo efektu xenoestrogenikoak, Gernikako araztegiaren inguruetan bizi den *Chelon labrosus* korroko populazioan deskribatu ziren. Bertan intersex arrak aurkitu ziren 2007. urtez geroztik (Puy-Azurmendi et al., 2013). Intersex egoeraz gain, bertako arrek *vtg* maila altuak zituzten. Arrain horien behazunean alkilfenolen kontzentrazio altuak aurkitu ziren ere (Puy-Azurmendi et al., 2013). Alkilfenolak detergenteetan erabiltzen dira eta lortutako emaitzak adierazten dutenez jatorria Gernikako araztegiaren funtzionamendu desegokia litzateke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Euskal kostaldeko beste hainbat guneeetan ere EDCen presentzia detektatu da ur-analisen bitartez (Bizarro et al., 2014); Pasaia, Deba, Ondarroa eta Santurtzi esaterako. Kutsatzaileen eragin biologikoei dagokienez, intersex arrak aurkitu izan dira eta horrekin batera *vtg* eta *cyp19a1b* aromatasaren transkripzio maila altuak ikusi izan dira bertako korroko populazioetan (Bizarro et al., 2014). Pasaia-ko portuan bestetik, arrantzatutako ar intersexetan 5S rRNA eta

tfiia transkripzio mailak arrenak baino altuagoak zirela ikusi da, ar eta emeen tarteko baloreak erakutsiz (Diaz de Cerio et al., 2012).

Gernikako egoera denboran zehar aztertzea interesgarria litzatekeenez (araztegia ixteko eta Bermeora eramateko plangintzaren baitan), bi garai desberdinetan bertako korrokoiei-populazioa aztertzea erabaki zen. Horretaz gain, araztegi handiago baten egoera aztertzea ere garrantzitsua litzatekeela kontutan harturik, Galindoko (Barakaldo) araztegi inguruko *Chelon labrosus* populazioa ere ikertu zen. Arrainen ikerketarako aurretik aipaturiko biomarkatzaileak erabiltzea erabaki zen, kutsatzaile xeonoestrogenikoen eraginaren adierazle onak direlako (*vtg*, *cyp19a1a*, *tfiia*, 5S rRNA) eta horiekin batera arrainen gonadak histologikoki aztertzea, intersex indibiduoak bereizi ahal izateko. Beraz, ikerketaren helburuak hauek izan ziren:

- 1) Korrokoien gonadetan alterazio histopatologikoen presentzia ikertzea, batez ere intersex egoeraren maiztasunaren analisisian arreta jarritz.
- 2) Gonadetako 5S rRNAren transkripzioaren kuantifikazioa egitea eta 5S rRNA/18S rRNA indizea kalkulatzeko.
- 3) Obozitoen garapenarekin erlazionaturiko geneen (*tfiia*, *cyp19a1a* gonadatan eta *vtg* gibelean) transkripzio maila neurtzea.

3. Ikerketaren muina

Chelon labrosus espezieko korrokoiak arrantzatu ziren Gernikan eta Galindon, 2013ko ekainean eta 2014ko otsailean, ugalketa zikloaren bi fase desberdinetako indibiduoak aztertu ahal izateko.

3.1 Histologia eta histopatologia

Analisi histologikoen bitartez, indibiduo bakoitzaren sexua eta ugalketa zikloaren fasea zehaztu zen. Horrela, honakoa ikusi zen: korrokoiei eme guztiak (Gernika zein Galindokoa eta aztertutako bi garaietan) fase aurre-bitelogenikoan zeuden (1a irudia), hau da, ugalketa zikloaren fase goiztiarretan agertzen ziren. Galindoko arrak gametogenesiaren fase goiztiarretan zeuden ere ekainean, aldiz otsailean ale batzuk espermatogenesiaren fase aurreratuagoetan zeuden. Gernikako korrokoien kasuan, Galindoko joera berdina agertu zuten baina otsaileko laginetan espermatogenesi fase aurreratuagoetan zeuden indibiduo kopurua altuagoa zen (1b irudia).

Gonadaren azterketa histopatologikoari dagokionez, Galindon aurkitutako intersex indibiduen maiztasuna baxua izan zen, laginketa bakoitzean indibiduo intersex bakarra aurkitu zelarik, beti ere testikulan agertzen ziren obozitoak aurre-bitelogenikoak zirelarik. Ar horien intersex indizea 3 izan zen, testikulan zehar aurkitutako obozito kopurua altua izan baitzen. Gernikan, ekainean intersexen maiztasuna %36-koa izan zen eta intersex indizea 1 (1c irudia) eta 3 bitartean. Otsailean aldiz, maiztasuna askoz ere altuagoa izan zen, %90-koa hain zuzen ere. Kasu horretan ere hiru intersex balio desberdinak ahal izan ziren, indibiduo baten kasuan, obozito bakarra aurkitu zen testikulan, baina fase aurreratu batean zegoena (obozito bitelogenikoa).

3.2 Biomarkatzaile molekularrak: 5S/18S rRNA, *tfiia*, *cyp19a1* eta *vtg*

5S/18S rRNA indizeak eme eta arrak desberdintzea ahalbidetzen du (1d irudia). Emeen indizeak 1 baino altuagoak izaten dira, obozitoetan dagoen 5S rRNA pilaketaren ondorioz. Arrak aldiz, zero baino baxuagoak diren indizeak aurkezten dituzte, beraien 5S kantitatea 18S rRNA baino erlatiboki baxuagoa delako. Intersex indibiduen kasuan, beraien gonadetan agertzen diren obozitoen eraginez, arren eta emeen arteko indizeak erakusten dituzte; betiere, zenbait intersex indibiduok arren indize berak eta beste zenbaitek emeen indize berdinak dituztelarik. Izan ere, intersex egoeraren larritasunaren eta 5S/18S rRNA indizearen arteko erlazioa dago, intersex indize larrienen kasuan balioa ere altua izanik, gonadan agertzen den obozito kantitate altuaren eraginez.

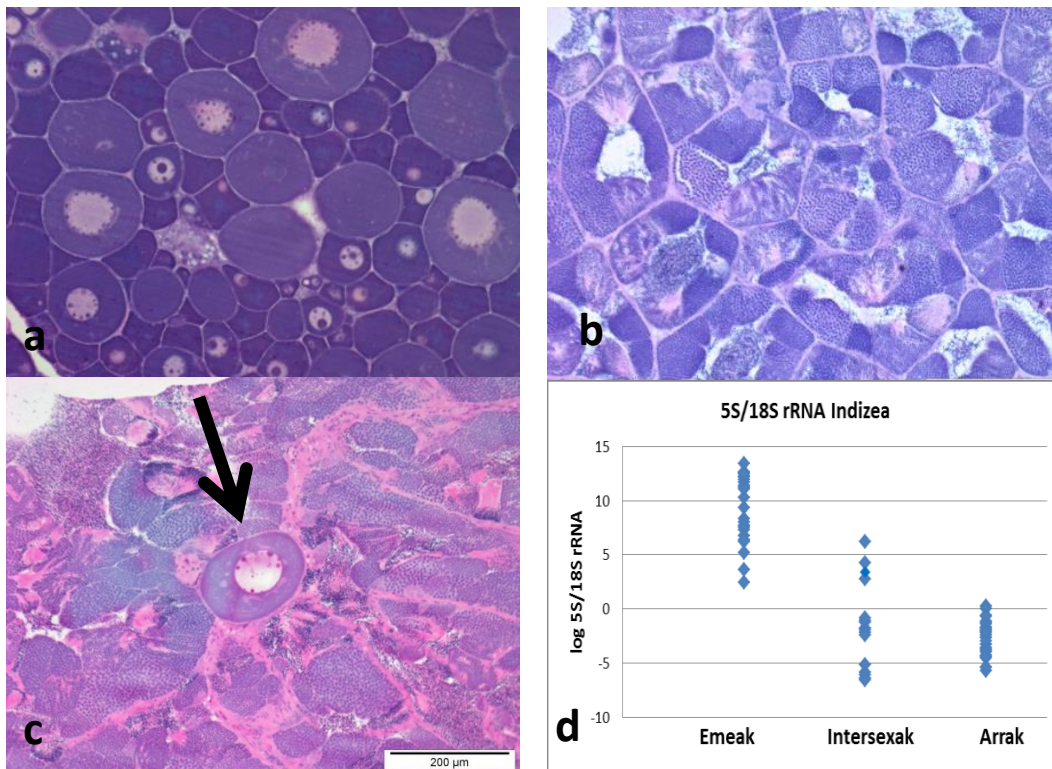
TFIIIA-ri dagokionez, bere transkripzio maila ar eta emeetan 5S/18S rRNA indizearekin guztiz bat zetorren. Gernikako intersex arrek, beste ar eta emeen arteko TFIIIA transkripzio

mailak zeuzkaten. Galindoko intersexei dagokienez, nahiz eta obozito asko eduki barrabilean, obozitoak gonadaren zati batean lokalizaturik egoteak TFIIIA transkripzio-mailak Gernikako larritasun bereko indibiduenena baino baxuagoa izatea ekarri zuen.

Galindoko korrokoien *cyp19a1a* transkripzio maila altuena emeetan eman zen eta baxuena arretan, intersexak erdibideko transkripzioa zutelarik. Gernikan aldiz, ez zen sexuen arteko desberdintasunik antzeman. Gernikako emeen *cyp19a1a* transkripzio baxua bertako kutsatzaile kontzentrazioaren ondorioa izan daiteke, izan ere, zenbait EDCek obozitoen hazkuntzaren erregulazio estrogenikoa inhibitu dezakete. Horrela izanik, Gernikako populazioak EDCen eragin konplexuagoak dutela esan daiteke.

Ar normaletan *vtg*-ren transkripziorik ez aurkitzea espero da. Ikerketa honetan, bi gunetako ar eta intersex arretan *vtg* transkripzioa antzeman zen. Hala ere, Gernikako arren transkripzio mailak altuagoak zirela ikusi zen, bertako xenoestrogenoekiko esposizioa altuagoa izan zitekeela adieraziz.

1.irudia. (a) Korrokoi eme baten gonadaren ebakia non obozito aurre-bitelogenikoak ikusi daitezkeen. (b) Korrokoi ar baten gonada garatuaren ebakia. Hodi espermatogenikoetan garapen fase desberdinetan dauden zelula espermatogenikoak ikusi daitezke. (c) Korrokoi intersex (1 indizea) baten gonadaren ebakia, non obozito bat ikusi daiteke barrabilean txertaturik (gezia markaturik). (d) Eme, ar eta intersex indibiduen gonadako 5S/18S rRNA indizea. Puntu bakoitza indibiduo bati dagokio.



4. Ondorioak

Gonaden histopatologia eta gonada zein gibleko xenoestrogenoen esposizioaren adierazle diren geneen transkripzio mailak aztertu ondoren, ondorengo ondorioetara iritsi ginen:

- 1) *Chelon labrosus* korrokoi intersexen presentzia deskribatu zen Gernika eta Galindoko araztegien inguruetan. Intersex indibiduoek obozito kantitate desberdinei dagokien intersex indizeak erakusten zituzten.
- 2) Korrokoi eme, ar eta intersexak 5S/18S rRNA indizearen eta *tfiia*-ren transkripzio mailaren arabera bereiztea posible izan zen.
- 3) Intersex larritasun indizearen eta bai 5S/18S rRNA indizea zein *tfiia* transkripzio mailarekin korrelazio positiboa aurkitu zen.
- 4) Gernikako sexu desberdineko indibiduen arteko *cyp19a1a* transkripzio desberdintasun ezak EDCekiko esposizioa iradokitzen zuen.
- 5) Gernika zein Galindoko *vtg* transkripzio mailak, bi populazioak konposatu xenoestrogenikoen eraginpean zeudela adierazi zuen.
- 6) Gernikako intersex arren mazitasun altuagoak eta xenoestrogenizitatearen adierazle diren biomarkatzaileen erantzun nabarmenagoak, Gernikako populazioa Galindokoa baino xenoestrogenoen eragin handiagoa jasaten ari zelaren adierazle dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Intersex egoeraren eragileak zein diren ez dago argi. Ezin da jakin ikerketa honetan aurkitutako intersex arrainak noiztik diren intersex, noiztik hasi diren obozitoak garatzen beraien gonadetan; ezta ere zein izan den horren eragilea. Prozesu guztia maila zelularrean ondo ulertu ahal izateko eman beharreko lehenengo urratsa, gonada ar eta emeen garapenean eragina duten geneak zeintsu diren ulertu, eta horien transkripzio maila gonadaren bilakaeran zehar kuantifikatzea izango litzateke. Horrekin batera, intersex indibiduoetan ematen den itu geneen transkripzio maila aztertzea eta teknika desberdinak erabiliz, gonadetako zelula desberdinen (eta ez soilik gametoak) bilakaera aztertzea beharrezkoa da. Lortzen diren datuekin, intersex arrainentzako biomarkatzaile goiztiarren diseinua posible izango da; xenoestrogenoen presentziaren arriskuak hobeto kudeatze-aldera.

6. Erreferentziak

- Bahamonde, P.A., Munkittrick, K.R., Martyniuk, C.J., (2013): Intersex in teleost fish: are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 25-35
- 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
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. (2000): The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total. Environ.* 247, 295-311.
- Campbell, C.G., Borglin, S.E., Green, F.B., Grayson, A., Wozni, E., Stringfellow, W.T. (2006): Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: a review. *Chemosphere* 65, 1256-80.
- Crews, D., Wilingham, E., Skipper, J.K. (2000): Endocrine disruptors: present issues, future directions. *Quarterly Rev. Biol.* 75, 243-269.
- CSTEE. (1999): Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology test methods. DG XXIV, European Commission.

- Devlin, R.H., Nagahama, Y. (2002): Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*. 208, 191-364.
- 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.
- Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S., Pellegrini, P., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O. (2010): Aromatase in the brain of teleost fish: Expression, regulation and putative functions. *Neuroendocrinol.* 31, 172-192
- Jobling, S., Sheahan, D.A., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. (1996): Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194-202.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. (1998): Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., Vane, C.H. (2005): Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment. *J. Mar. Biol. Ass. UK* 85, 1-31.
- McDonough, C.J., Roumillat, W.A., Wenner, C.A. (2005): Sexual differentiation and gonad development in striped mullet (*Mugil cephalus* L.) from South Carolina estuaries. *Fish. Bull.* 103, 601-619.
- 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
- Piferrer, F. (2001): Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*. 197, 229-281.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L. (2006): Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 303-315.
- 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.
- Sumpter, J.P., Jobling, S. (1995): Vitellogenesis as a biomarker for oestrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health. Perspect.* 103 (Suppl.7), 173-8
- Valencia, A. (2014): Reproductive endocrine disruption in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) captured downstream of the WWTPs of Gernika and Galindo. Master Thesis Project. University of the Basque Country
- WHO/UNEP. (2013): State of the science of endocrine disrupting chemicals. Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K.A., R. Thomas Zoeller, R.T. (arg) World Health Organization

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerketa hau, Espainiar MINECO (SEXOVUM AGL2012-33477), Eusko Jaurlaritza (SAIOTEK OVUM-II S-PE12UN086; SAIOTEK FROMOVUM S-PE13UN101, SAIOTEK TOXADEN S-PE13UN131 eta Ikerketa Talde Finkatuak IT-810-13) eta UPV/EHU (UFI 11/37) ikerketa proiektuen bitartez finantzatua izan zen.
- Lan hau Ingurugiro Kutsadura eta Toxikologia masterreko, “Reproductive endocrine disruption in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) captured downstream of the WWTPs of Gernika and Galindo”, master amaierako lanetik eratorritakoa da.