

# Mikrotxipak arrainetan: atzo, gaur eta bihar

*Eider Bilbao*

CBET Research Group, Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE-UPV/EHU), Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Plentzia, Euskal Herria.

*Oihane Diaz de Cerio\**

University of Exeter, Biosciences, College of Life & Environmental Sciences, Exeter, UK.

\* oihane.diazdecerio@ehu.eus

DOI: 10.1387/ekaia.14566

Jasoa: 2015-05-29

Onartua: 2015-11-10

**Laburpena:** Mikrotxipak diseinatu dira, besteak beste, itu-organismo, -ehun edo -zelulen artean gertatzen diren transkriptoma- (genomatik transkribatzen edo irakurtzen ari diren geneen mRNA multzoa) -ezberdintasunak ikertzeko. Emaizta gisa, faktore estresatzaile ezberdinen jokatzeko modua edo jarraibidea ikertzea lortu da itsas organismotan, modu zabalean. Hori horrela, lan honen helburu nagusiak dira, batetik, arrainetan ingurune urtarretan ohikoak diren sustantzia kimikoen ekiteko modua aztertzen duten mikrotxipak laburbiltzea eta, bestetik, mikrotxipen inguruan dauden kritikak azaltzea».

**Hitz-gakoak:** arrainak, mikrotxipak, transkriptoma.

**Abstract:** Microarrays have been designed among others, to study transcriptomic differences or differences in the mRNA that is being transcribed, between target organisms, tissues or cells. As result, the transcriptional mode of action of different stress factors are been widely studied in aquatic organisms. Thus, the principal aim of this manuscript, is to summarize fish microarray studies that reveal the mode of action of chemical substances typically found in aquatic environments, as well as, to point out microarray studies derived criticisms.

**Keywords:** fish, micorarray, transcriptome.

## 1. SARRERA: MOLEKULA MAILAKO IKERKETEN EBOLUZIOA UR-EKOTOXIKOLOGIAN

Zientziaren arlo askotan erabiltzen dira gene-sekuentziak, bai markatzaile goiztiar gisa aztertzen diren adierazpen aldaketak, bai gune kontser-

bakorretako mutazioak. Ekotoxikologia arloan zehazki, ingelesezko «early warning» direlakoak erabiltzen hasi ziren estres baten eraginaren adierazle goiztiar gisa [1]. Biomarkatzaile izenarekin ezagunak diren adierazle goiztiar mota hauen artean, gene-adierazpena, organismo batek ematen duen lehenengo erantzuna da estres edo arrotza den seinale baten aurrean. Hori dela eta, molekula mailako ikerketen hastapenetan, ekotoxikologoek geneen adierazpenaren aldaketetan oinarritutako biomarkatzaileen bilaketari ekin zioten.

Arrainetan, molekula mailako biomarkatzaile gisa erabiltzen diren sekuentzia arruntak ondorengoak dira: edozein droga edo kutsatzaileraren efektua aztertzeko detoxifikazio-faseetako entzimak, tartean direla lehenengo faseko P450 zitokromoko entzimak (A1 eta A3 zitokromoak), bigarren faseko glukosilazioaz arduratuko den entzima (glutathion S-transferasa) eta hirugarren faseko ABC garraiatzaileak; kutsatzaile baten xenoestrogenizitate-efektua neurtzeko arrautzen biteloaren sintesiaz arduratuko den bitelogenina; metalen efektupean egondako arrainetan, metalak bahitzen dituen metalotioneina proteina; eta, azkenik, hipoxiapean egondako animalietan induzitzen den hipoxiaren menpeko proteina. Zerrenda hau «n» aldiz luza daiteke, sekuentzia- eta klonazio-teknikek ahalbidetu baitute molekula mailako biomarkatzaile berriak definitzea (ikusi ale honetako Diaz de Cerio eta Bilbao, 2015). Horrela, biomarkatzaile hauen gain- edo azpi-adierazpenak PCR edo qPCR tekniken laguntzarekin ikertu ohi dira. Izan ere, teknika hau Europako kutsatzaileek/drogek eragindako efektuak ikeritzeko jarraibide gisa onartua dago [2].

Arrainetan, 2000. urtetik hona, sekuentzia-andana handia lortu da (ikusi ale honetako Diaz de Cerio eta Bilbao, 2015). Bestalde, uste da biomarkatzaile ezberdinen azterketen baturak animalien osasunaren ideia orokorra emango duela [3]. Hori dela eta, gizakietan aspaldian erabiltzen hasi ziren mikrotxipak, alegia, kristalezko euskarri bati atxikitutako gene-sekuentzien bilduma mikroskopikoak, hibridazio- eta fluoreszentzia-tekniken bidez DNA zein RNA molekula osagarriak detekta ditzaketenak. Hasieran, zebra-arrainaren enbrioien garapena aztertzeko probatu ziren arrainetan [4] eta, ondoren, 2003 urtetik aurrera, tresna erabilgarri gisa zabaldu ziren ekotoxikologian [5].

Mikrotxipei esker, era berean ikertu daitezke gene-sekuentzia ezberdin ugariren gain-adierazpena edo azpi-adierazpena. Horrela, arrain-zelulek pairatutako estresaren aurrean ematen duten erantzunaren inguruko ideia orokorragoa lortzen dugu. Hasieran ehunka gene aztertzeko plataformak azaldu ziren, baina denbora aurrera joan ahala eta sekuentzia teknika hobetu ahala, emendatuz joan zen mikrotxip-plataforma deritzen gene-sekuentzien kopurua (16K, 44K, 1G... etab). Gainera, geneen identifikazioak eta proteinen funtzioak elkarlotzeko tresna informatikoak ere garatu ziren. Ondorioz, mikrotxipetako gene multzoen aldaketetatik, bidezidor

metabolikoen eraentze posibleak aztertzea pasa zen. Beraz, kutsatzaileek, drogek edota estres fisiko-kimikoek arrainetan eragin ditzaketen aldaketa posibleak ondorioztatzea ahalbidetu da, bai eta berauen efektu posibleen inguruko hipotesiak plazaratzea ere. Gainera, molekula mailan gertatutako aldaketak antolaketa-maila biologiko bakoitzean neurtutako biomarkatzailen aldaketekin alderatzean, erraztu egin da substantzia kimikoek / estres fisiko-kimikoek eragin ditzaketen efektuen inguruko ideia orokor eta bateratua eraiki ahal izatea [6-9]. Beraz, aipatutako adierazle goiztiar edo «early warning» kontzeptuak eta mikrotxipek posible egiten duten era bereko gene multzoen azterketek bihurtu dute mikrotxipa ekotoxikologiako tresna indartsu.

## 2. MIKROTXIPAK EKOTOXIKOLOGIAN

Ekotoxikologia arloan zebra-arraina ez den beste arrain espezieetan erabilitako mikrotxipen artean, kutsatzaileen efektuen gaineko ikerketak eta akuikulturarekin lotutako ikerketak daude nagusiki. Azken horien artean, birus zein bakterioek eragindako zoldurek sortzen dituzten efektuak ikertzen dira, batik bat, zoldurok eragindako gaixotasunek arazo ekonomiko larriak sor ditzaketelako. Ikerketa hauek guztiek patogeno batek organismoa zoldu ondoren, giltzurrun, gibel, area zein odol ehunetan eragindako aldaketak aztertzea dute helburu [10-12]. Hau guztia ikuspegi ekotoxikologiko batetik ere bada lagungarria, kutsatzaile asko, hidrokarbuo aromatiko polizikloak besteak beste, immunomodulatzaileak baitira [13].

Bestalde, aipatu bezala, mikrotxipei esker, substantzia kimiko asko eragiten duten molekula mailako efektua edo/eta sortzen duten efektuaren jarraibidea ezagutu dugu (eragiteko modua, edo ingelesezko «mode of action» —MOA—). Orain arte argitaratutako azterketa gehienak substantzia kimikoen bana-banako azterketak dira (1 Taula). Esaterako, estradiol (E2) disruptore endokrinoaren pean egondako arrainetan, transkribatzen diren geneen mRNA multzoak profil edo transkriptoma zehatz bat azaltzen du: esteroideen bidezidorreko geneak eta lipidoen eta energia metabolismoko geneen adierazpen patroiak aldatuta daude [14-20]. Horrela, *Danio rerio* zebra-arrainean burututako azterketetan ere, arrainaren garapenean zehar eta arrain helduen organoetako profilak konparatuz, gai izan dira estradiolak dituen itu-geneak zehazteko eta, garapenean zehar, E2ak aktibaturiko transkripzio-profila ehun bakoitzerako espezifikoa dela zehazteko [21]. Bide horretan, itu-gene berriak zehazteko gai izan dira, esaterako, hartzaile estrogenikoak (*esr1*, *2a*, edo *2b* eta *gper*). Beraz, hemendik aurrera, geneon adierazpen maila estradiolaren efektua aztertzeke biomarkatzaile berri gisa erabili daiteke.

**1. taula.** Arrain ez-modeloetan mikrotxipak erabili dituzten esperimentuen laburpena. «\*» GEO/EBI datu-basean ez bestetan aurkitutako datuak adierazten dira, artikuluetan argitaratu gabe daudenak.

Ordena	Espeziea	Ehuna/Organoa	Substantzia kimikoa	Landa-azterketak
Anguiliformeak	<i>Anguilla anguilla</i>	Gibela	Metalak (Hg), firosterolak ( $\beta$ -sitosterola)	Tokiko populazioa arrantzatuz [22]
	<i>Carassius auratus</i>	Garuna	Hormonak (17 $\alpha$ ethynil E2)	[23]
Cypriniformeak	<i>Pimephales promelas</i>	Gibela, gonada, garuna	Fungizida (Prochloraz); Isuriak (Hondakin urak); Drogak (Propanolola)	[24-28]
	<i>Cyprinodon variegatus</i>	Zakatzak, Gibela; Gonada	Hormonak (EE2; dietilstilbestrol); Pesticida (metoxi-klorra); Metalak (Zilar nanopartikulak)	[13, 29-30]
Cyprinodontiformeak	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Gibela, Garuna, Larba, Enbrioia	Kimiko ez organikoa eta metalak (Antrazenoa; Ar-tsenikoa; Cr(VI); Cr(III)); kimiko organikoak (PAH, PCB126 eta olio isuria); hormonak (EE2)	Tokiko populazioa arrantzatuz [20, 31-42]
	<i>Gambusia holbrooki</i>	Gibela	Isuriak (papegintza hondakinak)	[43]
Gadiformeak	<i>Gadus morhua</i>	Zakatzak, Gibela Larba	Metala duten sedimentuak (Hg); Hormonak (E2); isuriak (Olioa, gas eta olio ur nahasketa), konposatu organikoak (PAH, fenola, Alkilfenolak)	Tokiko populazioa arrantzatuz [44-50]
	<i>Microgadus tomcod</i>	Enbrioia	Konposatu organikoak (PCB)	[51]

Ordena	Espeziea	Ehuna/Organoa	Substantzia kimikoa	Landa-azterketak
Gasterosteiformeak	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Gibela	Metalak (Cu); konposatu organikoak (Dibenzpantrazenoa), Hormonak (Estradiola)	[19, 52-54]
	<i>Hypomesus transpacificus</i>	Gorputz osoa	Metalak (Cu); konposatu inorganikoak (NH4); Pestizida (esfenbaleratoa)	[55-57]
Osmeriformeak	<i>Chelon labrosus</i>	Gibela	Konposatu organikoak (B(a)P; Nomifenola; TBT)	Kaiolatzea *
	<i>Gillichthys mirabilis</i>	Gibela, Muskulua	Metalak (Cu)	Tokiko populazioa arantzatzuz [58-59]
	<i>Lithognathus mormyrus</i>	Gibela	Metalak (Cd); Tert-butil hidroperoxidoa	Tokiko populazioa arantzatzuz [60-62]
	<i>Micropterus salmoides</i>	Gibela gonada Hipotalamo	Metalak (Cd kloruroa); konposatu organikoak (PCB 126; fenantreno; EE2) pestizidak (Metoxiklor, Dieldrina); herbizida (Atrazine), insektizida (toxafenoa)	[63-68]
	<i>Perca flavescens</i>	Gibela/Usaimen organoa	Metalak (Ni; Cd)	[69-71]
	<i>Sparus aurata</i>	Gibela Giltzurruna Garuna	Kutsaturiko sedimentuak; Kortisol inplantea; drogak	[72-75]
Pleuronectiformeak	<i>Platichthys flesus</i>	Gibela	Metalak (Cd; Kadmio kloruroa Lindanea) pestizidak; Hormonak (17b estradiola), konposatu organikoak (PFOA, metilklorantreno, tert-butil- hidroperoxidoa; PAH; PCB)	Tokiko populazioa arantzatzuz [76-82]
	<i>Pleuronichthys verticalis</i>	Gibela	Disruptore endokrinoak;	Tokiko populazioa arantzatzuz [83-85]
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Gibela	Metalak (Cr(IV))	[86]
	<i>Solea senegalensis</i>	Gibela	Metalak (Kupre sulfatoa)	[87]

Ordena	Espeziea	Ehuna/Organoa	Substantzia kimikoa	Landa-azterketak
Salmomiformeak	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gibela Tumorea; Hepatozitoak; Garuna, arrain osoa; giltzurrunak; odola; gonada; zakatzak	Hormonak (Tamoxifena, E2; dietilstilbestrola, dehidroepiandrosterona; dihidrotosterona; kortisola, dehidroepiandrosterona) ; metalak (Cd, Cr eta Cr VI, Zn) konposatu inorganikoak (Kaltziokloruroa) , konposatu organikoak (nonilfenola;B-naftoflazona, pirenoak; Olioa, PFOA Brominatutako difenil eterra, B(a)P 2,2,4,4-tetrabromodifenil eterra, diindolilmetanoa; Perfluoroalkil azidoa,TCDD) belar-hiltzaile (Atrazina); Hormonak (11-ketotestosterona.); Isuriak (Hondakin urak), drogak (diklofenakoa Ketoprofenoa, klofibratoa, Tranbolona, 4-nitrokinolina-1-oxidoa); Toxinak (Aflatoxina)	Kaiolatzea [17, 88-108]
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Gibela	Isuriak (Hondakin urak); Metalak (Cd Quantum dots-ak)	Tokiko populazioa arrantzatuz [109-110]
	<i>Salmo salar</i>	Gibela, Zakatzak, Usaimen erroseta, Hipotalamoia, Ehun pituariarioa	Kimiko organikoak (Nonilfenola; 3,3',4,4'-tetraklorobifenila; DMSO) Toxinak (Saxitoxina)	[111-113]
	<i>Salmo trutta</i>	Gibela	Hormonak (konposatu estrogenikoak) metalak (Cd) kimiko organikoak (pirenoa; Erretxina azidoak)	Tokiko populazioa arrantzatuz [114-116]
Scorpaeniformesak	<i>Sebastes schlegelii</i>	Gibela	Kimiko organikoak (B(a)P)	[117]

Hala ere, existitzen diren sustantzia kimiko guztien MOAk aztertea ezinezkoa da; batetik, merkaturan dagoen substantzia kimikoen kopurua izugarri handia delako eta, bestetik, egunero ari direlako berriak ekoizten. Gainera, kutsatzaileak ez ditugu banan-banan topatzen ingurunean, ur-ekosistemak hainbat gairen nahasketekin kutsatuta baitaude. Hori horrela, orain hamarkada bat argitaratu zen ur-ekosistemetan kutsatzaileen jarraipena egiteko erabili zen lehenengo mikrotxiparen emaitza. Lan hartan, Erresuma Batuko bi Europar platuxa (*P. flesus*) populazio, bata Alde ibaikoa eta bestea Tyne ibaikoa aztertu ziren. Azken hori kronikoki kutsatuta dago [5]. Mikrotxipen bidez, gai izan ziren Tyne ibaiko kutsaduraren ondorioz arrain populazio hartan gain-adierazten eta azpi-adierazten ziren geneak identifikatzeko. Gainera, eskuratutako gene-profilen emaitzak bat zetozen kutsadurapean bizitako arrainetan ohiko diren gene-biomarkatzaileen adierazpen-profilekin. Horrekin guztiarekin, tresna hauek landako laginak aztertze eta kutsatzaileen nahasketak aztertze erabilgarriak izan daitezkeela frogatu zuten. Beste lan batzuetan, jatorri ezezaguna duten ur-emariak aztertu dira, baina sustantzia kimiko guztien karakterizazioa banan-banan burutu ordez, arrain baten molekula mailako profil aldaketak aztertu izan dira mikrotxipen bidez. Horrela, mikrotxipei esker, eta *Pimephales promelas* arraina erabiliz (GEO datu-basean: GSE49098) kutsadura ezezaguna zuen ur-emari batean endokrinoki aktiboak diren sustantzia kimikoen eragiten dituzten geneen adierazpen aldaketak detektatu ahal izan dira. Beraz, uretan zein konposatu dagoen jakin gabe ur masa horren efektua estrogenikoa dela zehazteko, mikrotxipak tresna sentikorrek direla frogatu zen. Gainera, metodologia bera erabiliz, ur-zikinen isurketa-puntu ezberdinetan bizi den *Pleuronichthys verticalis* arrainetan eginiko molekula mailako azterketan, uretan konposatu estrogenikoak bazeudela ondorioztatu zuten. Arrainak jatorriz populazio ezberdinetakoak izan arren eta, beraz, genetikoki heterogeneoak, eta ingurunea eta elikagai aukerak zein kutsadura mailak ezberdinak izan arren, arrainen odoleko hormonien kantitatearen igoera eta arrainen transkripzio-profilak zuzenki erlazionatu ahal izan zituzten [101].

Azkenik, espezieek pairatzen dituzten populazio-beherakaden zergatiak aztertze ere erabili daitezke mikrotxipak, esate baterako aingiren kasuan. Kutsatutako ibaietan bizi diren aingiren ugaltze-arrakastaren azken urteotako beherapenaren arrazoi biologikoak ez daude argi. Hori aztertu nahian, kutsatutako bi lakutan bizi diren aingiren molekula mailako azterketa burutu da orain dela gutxi. Kutsatuen dagoen lakuko aingiretan, energia-ekoizpenaz eta mitokondrietako arnasketaz arduratzen diren entzimen geneen adierazpen maila baxua dela ohartu ziren. Hortaz, arnasketa metabolismoa zuzenean neurtu ez bazuten ere, oro har, ugaltze-migrazioarako prest zeuden aingiretan, kutsadurak energia gabezia eragiten zutela plaza-ratu zuten [22].

Hala ere, laburpen taulatik ondoriozta daitekeen moduan, landa-ikerketak eta estres motak konbinatzen dituzten azterketak ez dira horren ohikoak oraindik.

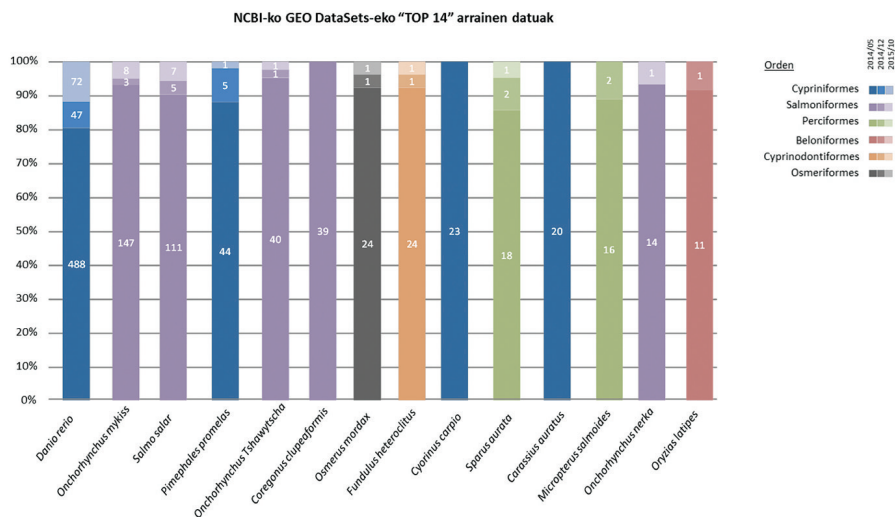
### 3. ARRAINEN MIKROTXIPEN AZTERKETA DATU-BASEETAN

Mikrotxipen garrantzia zein denboran zehar izan duten eboluzioa azterzeko, National Center for Biotechnology Information (NCBI) izeneko Zentroan/Ikergunean arrainen mikrotxipak bilatu dira bi garaitan geneen adierazpenean oinarritutako esperimentuen «GEO DataSets» datu gordailuan.

2014ko maiatzean «arrain» terminoa, eta zehazki arrain hezurduen klasea biltzen duen eta sailkapen zientifikoan erabiltzen den «Actinopterygii» terminoa bilatuz gero, 16.998 sarrera zeuden guztira. Horietatik, 15.760 sarrera mikrotxipak erabiltzen zituzten proiektuetan hibridatutako arrain-laginei zegozkien; 884 sarrera, berriz, mikrotxip-serieei, hau da, esperimentu berean erabilitako lagin-bildumen zehaztasunei; eta gainontzeko 334 sarrerek arrainen mikrotxip-plataformen edo gene-sekuentzien euskarrien diseinuak azaltzen zituzten. Serieen atalean gehien aipatzen diren lehen 10 arrain espezieak hurrengoak dira (1 Irudia): zebra-arraina (*Danio rerio*), amuarraina (*Oncorhynchus mykiss*), izokina (*Salmo salar*), *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Coregonus clupeaformis*, *Osmerus mordax*, *Fundulus heteroclitus*, karpa arrunta (*Cyprinus carpio*), *Saparus aurata*. Horietatik 4 salmoniformeak dira, eta 3, zipriniformeak.

Zortzi hilabete geroago bilaketa bera eginez gero, 17.033 lagin, 963 serie, eta 360 plataforma daude. Serieen artean gertatutako igoera (+80), batez ere zebra-arrainetan burututako ikerketen ondorioa da. Izan ere, 47 serie/esperimentu berri plazaratu dira; beraz, orain guztira zebra-arrainaren 535 serie daude (1 Irudia). Diseinatutako 360 plataformetatik cypriniformeen ordenekoak dira 189, eta talde honetan, besteak beste 157 plataforma dituen zebra-arraina dago. Zebra-arraina arrain modeloa dugu, hau da, laborategian mantentzeko eta hazteko erraza da eta gorputz gardena du garapenean zehar; gainera, biziki ikertu denez, genoma ere ezaguna du (ikus ale honetako Diaz de Cerio eta Bilbao, 2015). Beraz, mikrotxipak garatzen dituzten konpainiek zebra-arrainarekin erabiltzeko espezifikokoak diren mikrotxip-plataforma komertzialak saltzen dituzte. Horrek asko errazten du ikertzailearen lana; batetik, mikrotxipa diseinatzearen pausua aurrezten baitute, eta bestetik, ondoren egin behar diren funtzionaltasunaren inguruko azterketak ere ahalbidetzen baitira. Azken batean, arrainen artetik, *Danio rerio* zebra-arraina da geneen inguruko informazio ezagun gehien duen arraina. Bestalde, zebra-arrainaren ostean, mikrotxip-esperimentu gehien dituzten beste bi espezieak salmoniformeak dira, izokina eta amuarraina alegia, eta akuikulturaren duten balio ekonomikoa dela eta, sakon aztertu dira.





**1. irudia.** —2014ko maiatzetik 2015eko urrira— NCBIko GEO DataSets datu-baseak izan dituen arrain espezie bakoitzeko mikroarrai-azterketa sarrerak. Zutabeak datuen ehunekoak dira. Kolore-degradazioak denbora tarte bakoitzari dagokio: ilunena 2014ko maiatzeko datuei, argiagoa 2014ko abenduko datuei, eta argiena 2015eko urriko datuei. Kolore ezberdinek arrain espezie bakoitza zein ordenari dagokion azaltzen dute. Zutabe barruko datu zuriak datu gordinen balioak dira.

Gainera, sekuentziazio ugariari esker, azken urteotan arrain askoren sekuentziak lortu dira eta horrek nabarmen emendatu ditu mikrotxipen bidezko azterketen argitaratzeak. Beraz, datozen urteotan modelo ez diren arrainen kasuan ere, datu-baseetako lagin, serie eta plataforma kopurua nabarmen emendatzea espero da, komertzialki diseinatutako euskarriak zein ikertzaileak berak diseinatutako euskarriak direla bide.

#### 4. EKOTOXIKOLOGIAN MOLEKULA MAILAKO AZTERKETAK ERABILTZEAREN AURKAKO AHOTS KRITIKOAK

Orain gutxi arte, sekuentziazio arrainak mikrotxipak diseinatzeko erabili izan dira. Zergatia ingelesezko «*high throughput*» delakoa da. Teknika multzo horrek aldi berean ehunka edo milaka gene aztertzeko aukera ematen du eta. Ur-ekotoxikologian, adibidez, abantailatsua da; izan ere, zenbat eta itu gehiago neurtu orduan eta organismoaren/populazioaren osasun egoera ondorioztatzeko aukera handiagoa baitago. Kasurik onenean, biomarkatzaile ezberdinen batera edo multzoak antolaketa maila biologiko

ezberdinetako neurketak bilduko ditu: molekula, zelula, ehun, eta organismo mailakoak, alegia [118]. Mikotxipek, ordea, molekula mailako ikuspegia besterik ez digute ematen, ez baita lortu geneen profil zehatza efektu zehatzekin zuzenean lotzea. Hala ere, mikrotxipen profilen emaitzek eta geneen bidezidorren aberaste analisisiek efektu metaboliko zein fisiologikoen inguruko hipotesiak sortzea ahalbidetzen dute, eta organismoak/animaliak azal ditzakeen osasun aldaketak balioztatzen laguntzen dute.

Nahiz eta kutsatzaileen efektuaren gaineko hipotesiak sorrarazteko potentziala baduten, kutsaduraren jarraipenerako erabili den mikrotxip kopurua urria da oraindik, 1. taulan laburtu den moduan. Izan ere, asko dira metodo honekin kritikoak diren ahotsak; organismo baten gene mailako aldaketetatik ondoriozta al daitezke organismo horrek bere ingurunean pairatzen dituen kutsatzaileen efektuak? Hau da, nola dakigu moldaera bat ez ote den? Edo/eta erantzun itzulgarri bat ote den? Gainera, geneen adierazpen mailatik organismo osoaren egoera biologikoa zehaztea ez da erraza [119]. Kritika horiek isilarazi eta mikrotxipen baliagarritasuna erakutsi nahian, konparazioak egin izan dira antolaketa maila ezberdinetan. Horrela, Vidal-Dorsch eta bere taldea gai izan ziren 2012an gibeledako transkriptomako aldaketak *Gillichthys mirabilis* arrainaren egoera biologikoarekin erlazionatzeko. Gibelean neurtutako transkripzio mailen aldaketek, zehazki 75 generenek, hazkuntza eta immunitate erantzuna gauzatzen ari zela adierazten zuten eta aldaketok gonadetan behatutako patologiarekin bat zetozen.

Bestalde, mikrotxipetatik eskuratutako geneen profil-aldaketei egotzitako funtzioak ugaztunetan dugun informazioaren arabekoak dira. Hau da, gene baten funtzioaren esleipena edo anotazioa ugaztunetan eginiko azterketetan oinarritzen da, salbuespenak salbuespen. Gaur egun, arrain baten gene-sekuentzia berriaren identifikazioa datu-baseetan dagoen informazioarekin alderatuz egiten da; sekuentziok homologia handia baldin badute, sekuentzia berdina izan daitekeela onartzen da, eta, beraz, funtzio bera izango dutela. Hortaz, beste behin, informazioa guztiz hipotetikoa da. Zein puntutaraino dira ugaztunak eta arrainak konparagarriak? Bi animalia taldeetan konposatu kimiko batek gene baten gain-adierazpena/azpi-adierazpena eragiteak ez du esan nahi bietan erantzun berdina eragingo duenik. Izan ere, gene bat beraren funtzioa ezberdina izan daiteke animalia batetik bestera. Hori dela eta, zenbat eta arrainen genoma edo arrainen transkriptoma gehiago ezagutu orduan eta espeziearekiko espezifikoa diren geneen isoforma eta gene-sekuentzia gehiago ezagutuko dira, eta berauen funtzionaltasuna ezagutzeko aukera handiagoa izango da.

Ikuspuntu kritiko hauek ez dira mikrotxipen esparrura mugatzen; gaur egun, sentikorragoak diren eta kuantitatiboak diren sekuentziazio-teknika berriei ere esleitu dakieke. Dela metodo bat dela bestea, ekotoxikologia arloan ikerketa gehiago beharko lirateke batez ere, estres mota ezberdinen nahasketek edo ingurune aldagaien konbinazioek eragiten dituzten mo-

lekula mailako aldaketak eta ondorio biologikoak elkarlotzeko. Erakutsi bezala, beharrian hau aldarrikatzen duten ikertzaileak gero eta gehiago dira [120-121]. Hau da, kutsaduraren jarraipenean, molekula mailatik abiatuta ekosistema mailara estrapolatzeko gaitasuna sakonago landu behar da, erabilitako molekula mailako biomarkatzaile goiztiarrek benetako balio ekologikoa izan dezaten.

Beraz, mikrotxipak lagungarriak dira ekotoxikologian, hipotesi berriak eraikitzen laguntzen dute, baina konparatiboagoa den molekula mailako zientzia baten beharrea aurkitzen gara. Batetik, konparazio horizontala bermatzen duena, espeziearekiko espezifikoa diren aldaketak aztertuko dituen: gene berriak, isoforma ezberdinak, mutazioak eta abar zehaztuko dituen. Bestetik, konparazio bertikala: molekula mailan ikusten den espezie bakoitzaren gene-profilen aldaketek funtzio mailan esan nahi dutena hobeto zehazteko, bai eta efektuak hobeto estrapolatzeko ere.

Metodo posible hauen artean, RNA-seq delakoak mikrotxipak ordezkatuko dituela zabaltzen hasia da. Izan ere, badirudi RNA-seq-ak mikrotxipen mugetako batzuk gaintzen dituela *high throughput* sekuentziazio teknologien bidezko transkriptoak sekuentziaztean; besteak beste, RNA-seq ez da oinarritzen genom/transkriptomen anotazioetan eta, beraz, transkripto berriak azter daitezke maila baxuan adierazi arren, ez ditu hibridazio ez-espezifikoen desabantailak, eta aleloen menpeko espresioa aztertzea egiten du posible [122]. Hala ere, RNA-seq teknologia berriegia da ikertzaile askorentzat oraindik, analisiak mikrotxipak baino garestiagoak dira eta datuen metaketa eta analisisa konplexua. Beraz, badirudi muga hauek gaintu bitartean, mikrotxipen erabilpena nagusi izango dela oraindik [122].

## 5. LABURDURA ZERRENDA

K: kilo.

G: Giga.

GEO: Ingeleseko «Gene Expression Omnibus» datu-basea.

NCBI: Ingeleseko «National Center for Biotechnology Information» datu-basea.

PCR: Ingeleseko Polymerase Chain reaction, euskeraz, Polimerasak kateatutako erreakzioa.

qPCR: PCR kuantitatiboa.

PAH: ingelesezko Polycyclic aromatic hydrocarbon, euskeraz, hidrokarburu polizikliko aromatikoa.

MOA: ingelesezko «Mode of action», euskerazko jarraibidea edo eragiteko modua.

E2: etinil estradiola.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] PIÑA, B., CASADO, M. eta QUIRÓS, L. 2007. «Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring». *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 26, 1145-1154.
- [2] EC 2014. European commission Technical report 2014-077. «Technical report on aquatic effect-based monitoring tools». P. 76.
- [3] FORBES, VE., PALMQVIST A. eta BACH, L. 2006. «The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology». *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, :272-280.
- [4] TON, C., STAMATIOU, D., DZAU, V.J., eta LIEW, C.C. 2002. «Construction of a ebrafish cDNA microarray: gene expression profiling of the zebrafish during Development». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 1134-1142.
- [5] WILLIAMS, T.D., GENSBURG, K., MINCHIN, S.D. eta CHIPMAN, J.K. 2003. «A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*)». *Aquat. Toxicol.* 65: 141-157.
- [6] EPA, 2004. «U.S. Environmental Protection Agency. Potential implications of genomics for regulatoru and risk assessment applications at EPA». Genomics Task Force Withepaper. Washington, USA. EPA 100/B-04/002.
- [7] ICES. 2004. «Biological monitoring: General guidelines for quality assurance». In:Rees H (Ed). *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No.32: 44.
- [8] ICES. 2005. «Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC)», 18-22. April 2005, Reykjavik, Iceland. ICES CM2005/E:08. pp:94.
- [9] ICES. 2006. «Report of the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WGBEC)», 27-31. March 2006, Copenhagen, Denmark, ICES-CM 2006/MHC:04. pp:79.
- [10] BYON, J.Y., OHIRA, T., HIRONO, I., eta AOKI, T. 2005. «Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination». *Fish Shellfish Immunol.*18(2):135-47.
- [11] EWART, K.W., BELANGER, J.C., WILLIAMS, J., KARAKACH, T., PENNY, S. TSOI S.C.M., RICHARDS, R.C. eta DOUGLAS, S.E. 2005. «Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology». *Developmental & Comparative Immunology*. 29:333-347.
- [12] NAKAYAMA, K., KITAMURA, S.I., MURAKAMI, Y., SONG, J.Y., JUNG, S.J., OH, M.J., IWATA, H. eta TANABE, S. 2008. «Toxicogenomic analysis of immune system-related genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to heavy oil». *Mar.Poll.Bull.* 57:445-452.
- [13] REYNAUD, S eta DESCHAUX, P. 2006. «The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review». *Aquatic Toxicology*.7: 229-238.

- [14] KNOEBL, I., BLUM, J.L., HEMMER, M.J. eta DENSLOW, N.D. 2006. «Temporal gene induction patterns in sheepshead minnow exposed to 17 $\beta$ -estradiol». *J. Exp. Zool. Part A: Comp. Exper. Biol.* 305:707-719.
- [15] SKILLMAN, A.D., NAGLER, J.J., HOOK, S.E., SMALL, J.A. eta SCHULTZ, I. 2006. «Dynamics of 17-ethynylestradiol exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): absorption, tissue distribution, and hepatic gene expression pattern». *Environ Toxicol Chem.* 25:2997-3005.
- [16] HOOK, S.E., SKILLMAN, A.D., SMALL, J.A. eta SCHULTZ, I.R. 2006b. Dose response relationships in gene expression profiles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* exposed to ethynylestradiol». *Mar. Environ. Res.* 62:S151-154.
- [17] GARCIA-REYERO, N., GRIFFITT, J., LIU, L., KROLL, K.J., FARMERIE, W.G., BARBER, D.S. eta DENSLOW, N.D. 2008. «Construction of a robust microarray from a non-model species largemouth bass, *Microp-terus salmoides* (Lacèpede), using pyrosequencing technology». *J.Fish Biol.* 72: 2354-2376.
- [18] BENNINGHOFF, A.D., eta WILLIAMS, D.E. 2008. «Identification of a transcriptional fingerprint of estrogen exposure in rainbow trout liver». *Toxicol. Sci.* 101 (1): 65-80.
- [19] KATSIADAKI, I., WILLIAMS, T.D., BALL, J.S., BEAN, T.P., SANDERS, M.B., WU, H., SANTOS, E.M., BROWN, M.M., BAKER, P., ORTEGA, F., FALCIANI, F., CRAFT, J.A., TYLER, C.R., VIANT, M.R. eta CHIPMAN, J.K. 2010. «Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to ethinyl-estradiol». *Aquat Toxicol* 97(3):174-87.
- [20] DOYLE, M.A., BOSKER, T., MARTYNIUK, C.J., MACLATCHY, D.L. eta MUNKITTRICK, K.R. 2013. «The effects of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) on molecular signaling cascades in mummichog (*Fundulus heteroclitus*)». *Aquatic Toxicology.* 134-135: 34-46.
- [21] HAO, R., BONDESSON, M., SINGH, A.V., RIU, A., MCCOLLUM, C.W., KNUDSEN, T.B., GORELICK, D.A. eta GUSTAFSSON, J.A. 2013. «Identification of Estrogen Target Genes during Zebrafish Embryonic Development through Transcriptomic Analysis». *PLOS.* DOI: 10.1371/journal.pone.0079020.
- [22] PUJOLAR, J.M., MARINO, I.A.M., MILAN, M., COPPE, A., MAES, G., CAPOCCIONI, F., CICCOTTI, E., BERVOETS, L., COVACI, A., BEL-PAIRE, C., CRAMB, G., PATARNELLO, T., BARGELLONI, L., BORTOLUZZI, S. eta ZANE, L. 2012. «Surviving in a toxic world: transcriptomics and gene expression profiling in response to environmental pollution in the critically endangered European eel». *BMC Genomics.* 13: 507.
- [23] MARTYNIUK, C.J., XIONG, H., CRUMP, K., CHIU, S., SARDANA, R., NADLER, A., GERRIE, E.R., XIA, X. eta TRUDEAU, V.L. 2006. «Gene expression profiling in the neuroendocrine brain of male goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17  $\alpha$ -ethinylestradiol». *Physiol Genom.* 27(3):328-36.

- [24] MARTINOVIĆ-WEIGELT, D., MEHINTO, A.C., ANKLEY, G.T., DENSLOW, N.D., BARBER, L.B., LEE, K.E., KING, R.J., SCHOENFUSS, H.L., SCHROEDER, A.L. eta VILLENEUVE, D.L. 2014. «Transcriptomic effects-based monitoring for endocrine active chemicals: assessing relative contribution of treated wastewater to downstream pollution». *Environ. Sci. Technol.* 48 (4): 2385-2394.
- [25] BERNINGER, J.P., MARTINOVIĆ-WEIGELT, D., GARCIA-REYERO, N., ESCALON, L., PERKINS, E.J., ANKLEY, G.T. eta VILLENEUVE, D.L. 2014. «Using transcriptomic tools to evaluate biological effects across effluent gradients at a diverse set of study sites in Minnesota, USA». *Environ. Sci. Technol.* 48 (4), pp 2404-2412.
- [26] COSTIGAN, S.L., WERNER, J., OUELLET, J.D., HILL, L.G. eta LAW, R.D. 2012. «Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents». *Aquatic Toxicology*. 122-123: 44-55.
- [27] LORENZI, V., MEHINTO, A.C., DENSLOW, N.D. eta SCHLENK, D. 2012. «Effects of exposure to the  $\beta$ -blocker propranolol on the reproductive behavior and gene expression of the fathead minnow, *Pimephales promelas*». *Aquatic Toxicology*. 116-117: 8-15.
- [28] SKOLNESS, S.Y., DURHAN, E.J., GARCIA-REYERO, N., JENSEN, K.M., KAHL, M.D., MAKYNEN, E.A., MARTINOVIC-WEIGELTD, D., PERKINS, E., VILLENEUVE, D.L. eta ANKLEY, G.T. 2011. «Effects of a short-term exposure to the fungicide prochloraz on endocrine function and gene expression in female fathead minnows (*Pimephales promelas*)» *Aquatic Toxicology* 103: 170-178.
- [29] LARKIN P. 2003. «Expression profiling of estrogenic compounds using a sheepshead minnow cDNA macroarray environ health perspect». 2003 May; 111(6): 839-840.
- [30] GRIFFITT, R.J., BROWN-PETERSON, N.J., SAVIN, D., MANNING, S., BOUBE, I., RYAN, Y. eta BROUWERY, M. 2012. «Effects of chronic nanoparticulate silver exposure to adult and juvenile sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*)». *Environ. Toxicol. Chem.* 31: 160-167.
- [31] PETERSON, J.S.K. eta BAIN L.J. 2004. «Differential gene expression in anthracene-exposed mummichogs (*Fundulus heteroclitus*)». *Aquatic Toxicology*. 66: 345-355.
- [32] GONZALEZ, H.O., ROLING, J.A., BALDWIN, W.S. eta BAIN, L.J. 2006. «Physiological changes and differential gene expression in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) exposed to arsenic». *Aquat. Toxicol.* 77(1):43-52.
- [33] GONZALEZ, H.O., HU, J., GAWORECKI, K.M., ROLING, J.A., BALDWIN, W.S., GARDEA-TORRESDEY, J.L. eta BAIN, L.J. 2010. «Dose-responsive gene expression changes in juvenile and adult mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) after arsenic exposure». *Mar Environ Res.* 70(2): 133-41.

- [34] GAWORECKI, K.M., CHAPMAN, R.W., NEELY, M.G., D'AMICO, A.R. eta BAIN, L.J. 2012. «Arsenic exposure to killifish during embryogenesis alters muscle development». *Toxicol Sci.* 125(2):522-31.
- [35] FISHER, M.A. eta OLEKSIK, M. F. 2007. «Convergence and divergence in gene expression among natural populations exposed to pollution». *BMC Genomics.* 2007; 8: 108.
- [36] OLEKSIK, M.F. 2008. «Changes in gene expression due to chronic exposure to environmental pollutants». *Aquat Toxicol.* 90:161-171.
- [37] ROLING, J.A., BAIN, L.J., GARDEA-TORRESDEY, J., BADER, J. eta BALDWIN, W.S. 2006. «Hexavalent chromium reduces larval growth and alters gene expression in mummichog (*Fundulus heteroclitus*)». *Environ Toxicol Chem.* 25(10): 2725-2733.
- [38] WHITEHEAD, A., DUBANSKY, B., BODINIER, C., GARCIA, T.I., MILES, S., PILLEY, C., RAGHUNATHAN, V., ROACH, J.L., WALKER, N., WALTER, R.B., RICE, C.D. eta GALVEZ, F. 2011. «Genomic and physiological footprint of the Deepwater Horizon oil spill on resident marsh fishes. PNAS.
- [39] WHITEHEAD, A., PILCHER, W., CHAMPLIN, D. eta NACCI, D. 2012. «Common mechanism underlies repeated evolution of extreme pollution tolerance. *Proc Biol Sci.* 279(1728):427-33.
- [40] OLEKSIK, M.F., KARCHNER, S.I., JENNY, M.J., FRANKS, D.G., WELCH, D.B. eta HAHN, M.E. 2011. «Transcriptomic assessment of resistance to effects of an aryl hydrocarbon receptor (AHR) agonist in embryos of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a marine Superfund site. *BMC Genomics* 12(1): 263.
- [41] ROLING, J.A., BAIN, L.J., GARDEA-TORRESDEY, J., KEY, P.B. eta BALDWIN, W.S. 2007. «Using mummichog (*Fundulus heteroclitus*) arrays to monitor the effectiveness of remediation at a superfund site in Charleston, South Carolina, U.S.A». *Environ Toxicol Chem.* 26(6):1205-1213.
- [42] MAPLES, N.L. eta BAIN, L.J. 2004. «Trivalent chromium alters gene expression in the mummichog (*Fundulus heteroclitus*)». *Environ Toxicol Chem.* 23, 626-631.
- [43] BROCKMEIER, E.K., JAYASINGHE, B.S., PINE, W.E., WILKINSON, K.A. eta DENSLow, N.D. 2014. «Exposure to paper mill effluent at a site in north central Florida elicits molecular-level changes in gene expression indicative of progesterone and androgen exposure». *PlosOne.* DOI: 10.1371/journal.pone.0106644.
- [44] OLSVIK, P.A., BRATTÅS, M., LIE, K.K. eta GOKSØYR, A. 2010. «Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway». *Chemosphere.* 12/2010; 83(4):552-63.
- [46] LIE, K.K., MEIER, S. eta OLSVIK, P.A. 2009a. «Effects of environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production on Atlantic cod (*Gadus morhua*)» *Comp Biochem Physiol.* 150: 141-149.

- [47] LIE, K.K., MEIER, S. eta OLSVIK, P. 2009s. «Stress and endocrine disruption in Atlantic cod (*Gadus morhua*) following exposure to environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production». *Environ Toxicol Chem.*
- [48] OLSVIK, P.A., HANSEN, B.H., NORDTUG, T., MOREN, M., HOLEN, E. eta LIE, K.K. 2011. «Transcriptional evidence for low contribution of oil droplets to acute toxicity from dispersed oil in first feeding Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae». *Comp. Biochem. Physiol.* 154: 333-345.
- [49] HOLTH, T.F., THORSEN, A., OLSVIK, P.A. eta HYLLAND, K. 2010. «Long-term exposure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to components of produced water: condition, gonad maturation, and gene expression». *Canadian J. Fish. Aqua. Sci.* 67( 10):1685-1698.
- [50] LIE, K.K., LANZEN, A., BREILID, H. eta OLSVIK, P.A. 2009c. «Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray». *Environ Toxicol Chem.* 28: 1711-1721.
- [51] CARLSON, E.A., ROY, N.K eta WIRGIN, I.I. 2009. «Microarray analysis of polychlorinated biphenyl mixture-induced changes in gene expression among Atlantic tomcod populations displaying differential sensitivity to halogenated aromatic hydrocarbons». *Environ. Toxicol. Chem.* 28(4)759-771.
- [52] SANTOS, E.M., BALL, J.S., WILLIAMS, T.D., WU, H., ORTEGA, F., VAN AERLE, R., KATSIADAKI, I., FALCIANI, F., VIANT, M.R., CHIPMAN, J.K. eta TYLER, C.R. 2010. «Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environ Sci Technol* 44(2):820-826.
- [53] WILLIAMS, T.D., WU, H., SANTOS, E.M., BALL, J., KATSIADAKI, I., BROWN, M.M., BAKER, P., ORTEGA, F., FALCIANI, F., CRAFT, J.A., TYLER, C.R., CHIPMAN, J.K. eta VIANT, M.R. 2009. «Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to environmentally relevant concentrations of dibenzanthracene». *Environ Sci Technol* 43(16):6341-8.
- [54] GEOGHEGAN, F., KATSIADAKI, I., WILLIAMS, T.D. eta CHIPMAN, J.K. 2008. «A cDNA microarray for the three-spined stickle back, *Gasterosteus aculeatus* L. and analysis of the interactive effects of oestradiol and dibenzanthracene exposures». *J. Fish Biol.* 72: 2133-2153.
- [55] CONNON, R.E., BEGGEL, S., D'ABRONZO, L.S., GEIST, J.P., PFEIFF, J., LOGUINOV, A.V., VULPE, C.D. eta WERNER, I. 2011a. «Linking molecular biomarkers with higher level condition indicators to identify effects of copper exposures on the endangered delta smelt (*Hypomesus transpacificus*)». *Environ Toxicol Chem.* 30(2):290-300.
- [56] CONNON, R.E., DEANOVIC, L.A., FRITSCH, E.B., D'ABRONZO, L.S. eta WERNER, I. 2011b. «Sublethal responses to ammonia exposure in the endangered delta smelt; *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae)». *Aquat. Toxicol.* 105:369-377.



- [57] CONNON, R.E., GEIST, J., PFEIFF, J., LOGUINOV, A.V., D'ABRONZO, L.S., WINTZ, H., VULPEC, D. eta WERNER, I. 2009. «Linking mechanistic and behavioral responses to sublethal esfenvalerate exposure in the endangered delta smelt; *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae). BMC Genomics. 10:608
- [58] GRACEY, A.Y. 2008. «The *Gillichthys mirabilis* Cooper array: a platform to investigate the molecular basis of phenotypic plasticity». J. Fish Biol. 72: 2118-2132.
- [59] VIDAL-DORSCH, D.E., BAY, S.M., MAYS, M.A., GREENSTEIN, D.J., YOUNG, D., WOLF, J.C., PHAM, D., LOGUINOV, A.V. eta VULPE, C. 2012. «Using gene expression to assess the status of fish from anthropogenically influenced estuarine wetlands». Environ Sci Technol. 46(1):69-77.
- [60] AUSLANDER, M., NEUMANN, P.M. eta TOM, M. 2010. «The effect of tert-butyl hydroperoxide on hepatic transcriptome expression patterns in the striped sea bream (*Lithognathus mormyrus*; Teleostei)». Free Radic Res;44(9):991-1003.
- [61] AUSLANDER, M., YUDKOVSKI, Y., CHALIFA-CASPI, V., HERUT, B., OPHIR, R., REINHARDT, R. NEUMANN, P. M. eta TOM, M. 2008. «Pollution-affected fish hepatic transcriptome and its expression patterns on exposure to cadmium». Mar Biotechnol (NY). 10(3):250-61.
- [62] YUDKOVSKI, Y., RAMŠAK, A., AUSLAND, M. eta TOM, M. 2010. «Potential of the hepatic transcriptome expression profile of the striped sea-bream (*Lithognathus mormyrus*) as an environmental biomarker». Biomarkers. 15(7):625-38.
- [63] SANCHEZ, B.C, CARTER, B., HAMMERS, H.R. eta SEPÚLVEDA, M.S. 2011. «Transcriptional response of hepatic largemouth bass (*Micropterus salmoides*) mRNA upon exposure to environmental contaminants». J Appl Toxicol 31: 108-116.
- [64] COLLI-DULÁ, R., ZÚÑIGA-AGUILAR, J.J., ALBORES-MEDINA, A. eta ZAPATA-PEREZ, O. 2009. «Identification of genes expressed as a result of lindane exposure in *Oreochromis niloticus* using differential display». Ecotoxicol. Environ. Safety. 72: 1406-1412.
- [65] MARTYNIUK, C.J, DOPERALSKI, N.J., KROLL, K.J., BARBER, D.S. eta DENSLOW, N.D. 2013. «Sexually dimorphic transcriptomic responses in the teleostean hypothalamus: A case study with the organochlorine pesticide dieldrin». NeuroToxicology. 34: 105-117.
- [66] MARTYNIUK, C.J., FESWICK, A., SPADE, D.J., KROLL, K.J. BARBER, D.S. eta DENSLOW, N.D. 2010. «Effects of acute dieldrin exposure on neurotransmitters and global gene transcription in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) hypothalamus». Neurotoxicology. 31(4):356-66.
- [67] MARTYNIUK, C.J., SPADE, D.J., BLUM, J.L., KROLL, K.J. eta DENSLOW, N.D. 2011. «Methoxychlor affects multiple hormone signaling pathways in the largemouth bass (*Micropterus salmoides*) liver». Aquat Toxicol. 101:483-492.

- [68] MEHINTO, A.C., PRUCH, M.S., C., COLLI-DULA, R.C., KROLL, K.J., LAVELLE, C.M., BARBER, D.S., VULPE, C.D. eta DENSLow, N.D. 2014. «Gene networks and toxicity pathways induced by acute cadmium exposure in adult largemouth bass (*Micropterus salmoides*)». *Aquatic Toxicology*. 152, 186-194.
- [69] HOUDE, M., GIRAUDO, M., DOUVILLE, M, BOUGAS, B., COUTURE, P., DE SILVA, A.O., SPENCER, C., LAIRE, S., VERREAULT, J., BERNATCHEZ, L. eta GAGNON, C. 2014. «A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*)». *Science of The Total Environment*. 497-498: 307-318.
- [70] AZIZISHIRAZI, A., DEW, W.A., BOUGAS, V., DASHTBAN, M., BERNATCHEZ, L. eta PYLE, G.G. 2014. «Chemosensory mediated behaviors and gene transcription profiles in wild yellow perch (*Perca flavescens*) from metal contaminated lakes». *Ecotoxicol Environ Saf*. 106:239-45.
- [71] BOUGAS, B., NORMANDEAU, E., PIERRON, F., CAMPBELL, P.G.C, BERNATCHEZ, L. eta COUTURE, P. 2013. «How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) – Results from a 1000 candidate-gene microarray». *Aquatic Toxicology*. 142-143: 355-364.
- [72] RIBETTO, C. E, BAKER, M., SÁŠIK, R., ZUO, Y., HARDIMAN, G. eta CARNEVALI, O. 2011. «Biological effects of marine contaminated sediments on *Sparus aurata* juveniles». *Aquat Toxicol* 104(3-4):308-316.
- [73] SARROPOULOU, E. eta FERNANDES, J.M.O. 2011. «Comparative genomics in teleost species: Knowledge transfer by linking the genomes of model and non-model fish species». *Comp. Biochem. Physiol. Part D* 6: 92-102.
- [74] SARROPOULOU, E., KOTOULAS, G., POWER, D.M. eta GEISLER, R. 2005. «Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology». *Physiol Genom*. 23: 182-191.
- [75] FERRARESSO, S., VITULO, N., MININNI, A.N., ROMUALDI, C., CARDAZZO, B., NEGRISOLO, E., REINHARDT, R., CANARIO, A.V.M., PATARNELLO, T. eta BARGELLONI, L. 2008. «Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) ». *BMC Genomics* 2008, 9:580 doi:10.1186/1471-2164-9-580. \*
- [76] SHEADER, D.L., WILLIAMS, T.D., LYONS, B.P. eta CHIPMAN, J.K. 2006. «Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray». *Mar Environ Res*. 62:33-44.
- [77] LEAVER, M.J., DIAB, A., BOUKOUVALA, E., WILLIAMS, T.D., CHIPMAN, J.K., MOFFAT, C.F., ROBINSON, C.D. eta GEORGE, S.G. 2010. «Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply pol-

- luted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways». *Aquat Toxicol.* 96:234-245.
- [78] WILLIAMS, L.M. eta OLEKSIK, M.F. 2008b. «Signatures of selection in natural populations adapted to chronic pollution». *BMC Evol Biol.* 8:282.
- [79] WILLIAMS, T., DIAB, A., GEORGE, S., GODFREY, R., SABINE, V., CONESA, A., MINCHIN, S., WATTS, P. eta CHIPMAN, J. 2006. «Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose». *Environ. Sci. Technol.* 40:6479-6488.
- [80] WILLIAMS, T.D., DIAB, A., ORTEGA, F., SABINE, V., GODFREY, E., FALCIANI, F., CHIPMAN, J.K. eta GEORGE, S.G. 2008a. «Transcriptional responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants». *Aquat. Toxicol.* 90(2): 83-91.
- [81] WILLIAMS, T.D., DIAB, A.M., GEORGE, S.G., SABINE, V. eta CHIPMAN, J.K. 2007. «Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17- $\beta$  estradiol». *Toxicol. Letters.* 168(3):236-248.
- [82] FALCIANI, F., DIAB, A.M., SABINE, V., WILLIAMS, T.D., ORTEGA, F., GEORGE, S.G. eta CHIPMAN, J.K. 2008. «Hepatic transcriptomic profiles of European flounder (*Platichthys flesus*) from field sites and computational approaches to predict site from stress gene responses following exposure to model toxicants». *Aqua. Toxicol.* 90: 92-101.
- [83] BAKER, M.E., VIDAL-DORSCH, D.E., RIBECCO, C., SPRAGUE, L.J., ANGERT, M., LEKMINE, N., LUDKA, C., MARTELLA, A., RICCIARDELLI, E., BAY, S.M., GULLY, J.R., KELLEY, K.M., SCHLENK, D., CARNEVALI, O., ŠÁŠIK, R. eta HARDIMAN, G. 2013. «Molecular analysis of endocrine disruption in hornyhead turbot at wastewater outfalls in southern california using a second generation multi-species microarray». *PLoS One.* 2013; 8(9): e75553.
- [84] BAKER, M.E., RUGGERI, B., SPRAGUE, L.J., ECKHARDT-LUDKA, C., LAPIRA, J., WICK, I., SOVERCHIA, L., UBALDI, M., POLZONETTI-MAGNI, A.M., VIDAL-DORSCH, D., BAY, S., GULLY, J.R., REYES, J.A., KELLEY, K.M., SCHLENK, D., BREEN, E.C., ŠÁŠIK, R. eta HARDIMAN, G. 2009. «Analysis of endocrine disruption in Southern California coastal fish using an aquatic multispecies microarray». *Environ Health Perspect.* 117(2): 223-230.
- [85] VIDAL-DORSCH, D.E., BAY, S.M., RIBECCO, C., SPRAGUE, L.J., ANGERT, M., LUDK, C., RICCIARDELLI, E., CARNEVALI, O., GREENSTEIN, D.J., SCHLENK, D., KELLEY, K.M., REYES, J.A., SNYDER, S., VANDERFORD, B., WIBORG, L.C., PETSCHAUERH, D., SASIK, R., BAKER, M. eta HARDIMAN, G. 2013. «Genomic and phenotypic response of hornyhead turbot exposed to municipal wastewater effluents». *Aquatic Toxicology.* 140-141: 174-184.

- [86] CHAPMAN, L.M., ROLING, J.A., BINGHAM, L.K., HERALD, M.R. eta BALDWIN, W.S. 2004. «Construction of a subtractive library from hexavalent chromium treated winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) reveals alterations in non-selenium glutathione peroxidases». *Aquat. Toxicol.* 67: 181-194.
- [87] OSUNA-JIMÉNEZ, I., WILLIAMS, T.D., PRIETO-ÁLAMO, M.A., ABRIL, N., CHIPMAN, J.K. eta PUEYO, C. 2009. «Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays». *Fish Shellfish Immunol.* 26 : 699-706.
- [88] TILTON, S.C., GERWICK, L.G., HENDRICKS, J.D., ROSATO, C.S., CORLEY-SMITH, G., GIVAN, S.A., BAILEY, G.S., BAYNE, C.J. eta WILLIAMS, D.E. 2005. «Use of a rainbow trout oligonucleotide microarray to determine transcriptional patterns in Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma compared to adjacent liver». *Toxicol. Sci.* 88(2):319-330.
- [89] FINNE, E.F., COOPER, G.A., KOOP, B.F., HYLLAND, K. eta TOLLEFSEN, K.E. 2007. «Toxicogenomic responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes exposed to model chemicals and a synthetic mixture». *Aqua.Toxicol.* 81: 293-303.
- [90] LIU Q1, BASU N, GOETZ G, JIANG N, HUTZ RJ, TONELLATO PJ eta CARVAN MJ. 2013. Differential gene expression associated with dietary methylmercury (MeHg) exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology.* 22(4):740-51.
- [91] ALURU, N. eta VIJAYAN, M.M. 2008. «Brain transcriptomics in response to beta-naphthoflavone treatment in rainbow trout: the role of aryl hydrocarbon receptor signaling». *Aquat. Toxicol.* 87(1):1-12.
- [92] KOSKINEN, H., PEHKONEN, P., VEHNÄINEN, E., KRASNOV, A., REXROAD, C., AFANASYEV, S., MÖLSA, H. eta OIKARI, A. 2004. «Response of rainbow trout transcriptome to modelchemical contaminants». *Biochem.Bioph Res Com.* 320: 745-753.
- [93] KRASNOV, A., KOSKINEN, H., REXROAD, C., AFANASYEV, S., MÖLSA, H. eta OIKARI, A. 2004. «Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)». *Aquat Toxicol.* 74: 70-81.
- [94] HOOK, S.E., LAMP, M.A., FEBBO, E.J., WARD, J.A. eta PARKERTON, T.F. 2010. «Temporal patterns in the transcriptomic response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to crude oil». *Aquat. Toxicol.* 99:320-329.
- [95] TILTON, S.C., ORNER, G.A., BENNINGHOFF, A.D., CARPENTER, H.M., HENDRICKS, J.D., PEREIRA, C.B. eta WILLIAMS, D.E. 2008. «Genomic profiling reveals an alternate mechanism for hepatic tumor promotion by perfluorooctanoic acid in rainbow trout». *Environ. Health Persp.* 116 (8).
- [96] MOS, L., COOPER, G.A., SERBEN, K., CAMERON, M. eta KOOP, B.F. 2008. «Effects of diesel on survival, growth, and gene expression in rain-

- bow trout (*Oncorhynchus mykiss* fry». Environm Sci Technol. 42: 2656-2662.
- [97] HOOK ,S.E., SKILLMAN, A.D., GOPALAN, B., SMALL, J.A. eta SCHULTZ, I.R. 2008. «Gene expression profiles in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a simple chemical mixture». Toxicol. Sci. 102(1): 42-60.
- [98] HOOK, S.E., SKILLMAN, A.D., SMALL, J.A. eta SCHULTZ, I.R. 2006. «Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants». Aquat. Toxicol.77:372-385.
- [99] HOOK, S.E., SKILLMAN, A.D., SMALL, J.A. eta SCHULTZ, I.R. 2007. «Temporal changes in gene expression in rainbow trout exposed to ethynyl estradiol». Com. Biochem. Physiol. Part C 145:73-85.
- [100] TILTON, S.C., HENDRICKS, J.D., ORNER, G.A., PEREIRA, C.B., BALLEY, G.S. eta WILLIAMS, D.E. 2007. «Gene expression analysis during tumor enhancement by the dietary phytochemical,3,3#-diindolylmethane, in rainbow trout». Carcinogenesis. 28(7):1589-1598.
- [101] BENNINGHOFF, A.D., ORNER, G.A., BUCHNER, C.H., HENDRICKS, J.D., DUFFY, A.M. eta WILLIAMS, D.E. 2012. «Promotion of hepatocarcinogenesis by perfluoroalkyl acids in rainbow trout». Toxicol Sci. 125(1):69-78.
- [102] HOGSTRAND, C., BALESARIA, S. eta GLOVER, C.N. 2002. «Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout». Comp. Biochem. Physiol. 133:523-535.
- [103] SHELLEY L.K., ROSS, P.S., MILLER KM., KAUKINEN KH eta KENNEDY CJ. 2012. «Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression». Aquatic Toxicology. 124-125: 217-226.
- [104] ROLLAND A. D, LARDENOIS A, GOUPIL AS, LAREYRE JJ, HOULGATTE R, CHALMEL F eta LE GAC, F. «Profiling of Androgen Response in Rainbow Trout Pubertal Testis: Relevance to Male Gonad Development and Spermatogenesis». PLoS ONE 8(1): e53302.
- [105] CUKLEV, F., FICK, J., CVIJOVIC, M., KRISTIANSSON, E., FÖRLIND, L. eta LARSSON, D.G.J. 2012. «Does ketoprofen or diclofenac pose the lowest risk to fish?» Journal of Hazardous Materials. 229-230: 100-106.
- [106] CUKLEV, F., GUNNARSSON, L., CVIJOVIC, M., KRISTIANSSON E., RUTGERSSON C., BJÖRLENIUS B. eta LARSSON D.G.J. 2012b. «Global hepatic gene expression in rainbow trout exposed to sewage effluents: A comparison of different sewage treatment technologies». Science of The Total Environment. 427-428: 106-114.
- [107] CUKLEV, F., KRISTIANSSON, E., FICK, J., ASKER, N., FÖRLIN, L. eta LARSSON, D.G.J. 2011. «Diclofenac in fish: Blood plasma levels similar to human therapeutic levels affect global hepatic gene expression». Environ Toxicol Chem 30:2126-2134.

- [108] INGS, J.S., SERVOS, M.R. eta VIJAYAN, M.M. 2011. «Hepatic transcriptomics and protein expression in rainbow trout exposed to municipal wastewater effluent». *Environ Sci Technol.* 45(6):2368-76.
- [109] OSACHOFF, H.L., VAN AGGELEN, G.C., MOMMSEN, T.P. eta KENNEDY, C.J. 2013. «Concentration-response relationships and temporal patterns in hepatic gene expression of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to sewage» *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics.* 8: 32-44.
- [110] GAGNÉ, F., FORTIER, M.Y., OSACHOFF, H.L., SKIRROW, R.C., VAN AGGELEN, G., GAGNON, C. eta FOURNIER, M. 2010. «Immuno-competence and alterations in hepatic gene expression in rainbow trout exposed to CdS/CdTe quantum dots». *J Environ Monit.*12(8):1556-65.
- [111] ROBERTSON, L.S. eta MCCORMICK, S.D.. 2012. «The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts». *Aquat Toxicol.* 2012 Oct 15;122-123:36-43.
- [112] MORTENSEN, A.S. eta ARUKWE, A. 2007. «Targeted Salmon Gene Array (SalArray): A toxicogenomic tool for gene expression profiling of interactions between estrogen- and aryl hydrocarbon-receptor signalling pathways». *Chem Res Toxicol.* 20: 474-488.
- [113] BARD, S.M., ZUCCHI, S., GORALSKI, K., GUBBIN, S., WILLIAMS, J.M., RICHARDS, R., EDDY, F.B. STAGG, R.M., GALLACHER, S., SINHAL, C.J., DOUGLAS, S. eta EWART. K.V. 2006. «Identification of differential gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to saxitoxin exposure using cDNA micorarray technology and qPCR analysis». *Mar. Environ. Res.* 62: S156-186 (S162).
- [114] GUNNARSSON, L., KRISTIANSSON, E., FÖRLIN, L., NERMAN, O. eta LARSSO, D.G.J. 2007. «Sensitive and robust gene expression changes in fish exposed to estrogen – a microarray approach». *BMC Genomics.* 8:149.
- [115] KRASNOV, A., AFANASYEV, S. eta OIKARI, A. 2007. «Hepatic responses of gene expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta lacustris*) exposed to three model contaminants applied singly and in combination». *Environ Toxicol Chem.* 26: 100-109.
- [116] MERILÄINEN, P., KRASNOV, A. eta OIKARI, A. 2007. «Time- and concentration-dependent metabolic and genomic responses to exposure to resin acids in brown trout (*Salmo trutta lacustris*) ». *Environ Toxicol Chem.* 26:1827-1835.
- [117] YUM, S., WOO, S. eta LEE, T.K. 2006. «Screening of ecotoxicant responsive genes and expression analysis of benzo(a)pyrene-exposed Rockfish (*Sebastes schlgeli*) ». *Mol. Cell. Toxicol.* 2(2):114-119.
- [118] CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C, SARASQUETE, C. eta VIARENGO, A. 2000. «The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach». *Science of The Total Environment.* 247, : 295-311.

- [119] KAMMENGA, J.E., HERMAN, M.A., OUBORG, N.J., JOHNSON, L. eta BREITLING, R. 2007. «Microarray challenges in ecology». *Trends in ecology and evolution*. 22: 273-279.
- [120] BOZINOVIC, G. eta OLEKSIK, M.F. 2011. «Omics and environmental science genomic approaches with natural fish populations from polluted environments». *Environ Toxicol Chem*. 30(2): 283-289.
- [121] OLSVIK, P.A., BERG, V. eta LYCHE, J. L. 2013. «Transcriptional profiling in burbot (*Lota lota*) from Lake Mjøsa--a Norwegian Lake contaminated by several organic pollutants». *Ecotoxicology and Environmental safety*. 92:94-103.
- [122] ZHAO, S., FUNG-LEUNG, W.P., BITTNER, A., NGO, K. eta LIU, X. 2014. «Comparison of RNA-seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells». *Plos one*. 9 e78644: 1-13.