



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Fluoxetinaren eragina *Mytilus galloprovincialis* muskuiluen gene-adierazpenean eta itugeneen balizko erabilpena biomarkatzaile gisa

*Gorka Arribas, Mikel Aguirre,
Etienne Lemaire, Elena Gómez,
Miren P. Cajaraville,
Frédérique Courant eta Eider Bilbao*

251-258 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.05.31>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



LAGUNTZAILEAK



Fluoxetinaren eragina *Mytilus galloprovincialis* muskuiluen gene-adierazpenean eta itu-geneen balizko erabilpena biomarkatzaile gisa

¹Gorka Arribas, ²Mikel Aguirre, ³Etienne Lemaire, ³Elena Gómez, ¹Miren P. Cajaraville
³Frédérique Courant, ¹Eider Bilbao

¹ZBIT+ Ikerketa taldea, Zoologia eta Animalia Zelulen Biologia Saila, Zientzia eta Teknologia Fakultatea eta Plentziako Itsas Estazioa, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Euskal Herria.

²The Art of Discovery. Astondo Bidea, 612, 48160 Derio, Euskal Herria.

³Hydrosciences Montpellier, University of Montpellier, CNRS, IRD, Montpellier, Frantzia.

garribas004@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Fluoxetina (FLX) gehien erabiltzen den antidepresiboetako bat izateaz gain, ingurune urtarren gorabidean dagoen kutsatzailea da. FLX organismoen portaeran, ugalketan eta garapenean eragiteko gai da. FLXren molekula mailako eraginak sakonago ikertzeko *Mytilus galloprovincialis* muskuiluak FLXren eraginpean jarri ziren eta hauen digestio-guruineko transkriptoma 2, 7, 14 eta 28 egunen buruan aztertu zen. Esangarriki eraendutako sekuentzien kopuru handiena 28 egunetara antzeman zen, tartean, aldaketak antzeman ziren zenbait entzima mota (hidrolasak, transferasak eta oxidorreduktasak) eta mintzarekin eta mintzean zeharreko garraioarekin, zein metabolismo energetikoarekin erlazionatutako proteinak kodetzen dituzten geneetan.

Hitz gakoak: Fluoxetina, antidepresiboak, transkriptomika, gene-transkripzioa, muskuiluak, biomarkatzaileak.

Abstract

Fluoxetine (FLX), besides being one of the most widely used antidepressants, is an emerging pollutant in aquatic environments. FLX can affect the behaviour, reproduction and development of aquatic organisms. To further investigate the molecular effects of FLX, Mytilus galloprovincialis mussels were exposed to FLX and their digestive gland transcriptome was studied after 2, 7, 14 and 28 days. The highest number of significantly regulated sequences were found after 28 days, including changes in genes that encode proteins related to several types of enzymes (hydrolases, transferases and oxidoreductases), membrane and transport across the membrane, as well as energy metabolism.

Keywords: Fluoxetine, antidepressants, transcriptomics, mussel, gene transcription, biomarkers.

1. Sarrera eta motibazioa

Azken hamarkadetan, ekosistema urtarren kutsadurak kezka handia sortu du organismoetan zein ingurumenaren osasunean izan ditzakeen ondorioengatik. Gorabidean dauden kutsatzaileen artean, farmakoak daude, beraien kontsumo handiagatik, hondakin-uren araztegien (HUA) eraginkortasun mugatuagatik eta, kasu batzuetan, ingurumenean erakusten duten degradazio-tasa baxuagatik (Luis et al., 2016). Farmakoen artean fluoxetina (FLX) dago, Prozac® antidepresiboaren konposatu aktiboa dena. FLX serotoninaren birxurgapenaren inhibitzaile selektiboen (SSRI, *selective serotonin reuptake inhibitor*) klaseko antidepresiboa da eta 1987an merkaturatutako lehen SSRIa izan zen. Denborarekin, mota honetako antidepresiboak nagusitu egin dira munduan zehar. Orokorrean, FLX eta SSRIak gizakion depresio moderatu-larriak, antsietatea eta nahasmendu obsesibo-kompulsiboak tratatzeko erabili ohi dira (Lochmann eta Richardson, 2019).

Ekonomia Lankidetzeta eta Garapenerako Antolakundearen (ELGA, ingelesez OECD) parte diren estatuetan, antidepresiboen kontsumoa bikoiztu egin zen 2000tik 2019ra eta egun, Europako herrialdeak dira mundu osoan antidepresibo gehien kontsumitzen dutenak (OECD, 2023). Gainera, COVID-19aren izurritearen ondorioz antsietate eta depresio sintomak areagotu egin ziren (Zhu et al., 2023) eta, honekin batera, ingurune urtarretako SSRI motako antidepresiboen kontzentrazioak handitu direla deskribatu da (Diaz-Camal et

al., 2022). Antidepressiboak kontsumitu ondoren, jatorrizko molekula bera edo eraldatutako metabolitoak gernu zein gorozkien bidez kanporatzen dira eta, HUAetatik igaro ondoren, ingurune urtarrera heltzen dira. HUA gehienak ez daude prestatuta medikamentuak ezabatzeko, beraz, konposatuak guztiz degradatu barik isurtzen dira ingurumenara eta ondorioz, zenbaitetan, HUAetako irteeretan sarreretan baino antidepressibo kontzentrazio altuagoak detektatu izan dira (Moreira et al., 2022). FLX eta bere metabolito nagusia, norfluoxetina, kontzentrazio esangarrietan detektatu dira itsas ingurunean (Madikizela et al., 2020), gainera, orokorrean degradazio-tasa oso baxuak erakusten dituztela deskribatu da (Redshaw et al., 2008). Testuinguru honetan, antidepressiboen kontsumoarekin batera, konposatu mota hauek ingurumenean eragiten ari diren kaltearen inguruko kezka larritu da azkenaldian.

Ohiko kutsatzaileak ez bezala, medikamentuak itu-organismoen bide fisiologiko zehatzetan eragiteko diseinatutako konposatu biologikoki aktiboak dira. Hala ere, eboluzioan zeharreko molekula mailako itu-sekuentzien kontserbazioak, konposatu hauek itu ez diren organismoetan ere farmakologikoki aktiboak izateko aukera areagotzen du, ondorio ekotoxikologikoen arriskua ere handituz (Gunnarsson et al., 2008). Horrela, FLX gizakion serotoninaren seinalizazio bidezidorrean eragiteko erabili ohi bada ere, bidezidor hau zenbait organismo urtarren kontrolatzaile fisiologiko garrantzitsua da (Fabbri eta Franzellitti, 2016). Hori dela eta, FLX itsas organismoetan izan dezaken eragina ezagutzeko eta kontrolatzeko, garrantzitsua da tresna eta biomarkatzaile berriak ikertzea eta garatzea.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

FLX bezalako antidepressiboek ornodun zein ornogabeen portaeran, ugalketan, garapenean eta biziraupenean eragiten dute (Sehonova et al., 2018). FLXren jarduera psikoaktiboa dela eta, ikerketa gehienak arrainen portaeran dituen eraginak aztertzea bideratu dira (Correia et al., 2023; Sehonova et al., 2018); azken urteotan ordea, ornogabeen molekula mailako analisiak biltzen dituzten lanak agertuz joan dira eta FLXk, zein beste antidepressiboek edo/eta hauen nahasketek, gene-adierazpenean eragiten dituzten aldaketak ikertzen hasiak dira. Kutsatzaileen menpeko lehenengo erantzun orokorra gene mailan eman ohi da, geneen transkripzioan eta adierazpenean aldaketak eraginda. Ondoren, erantzunak antolaketa maila biologiko desberdinetan (proteoman eta metaboloman esaterako) heda daitezke (Denslow et al., 2007). Hortaz, gene-mailako azterketek berebiziko garrantzia dute, besteak beste, biomarkatzaile goiztiarren garapenerako (Piña et al., 2007). Muskuiluak organismo “behale” edo zentinelak kontsideratzen dira, izan ere, xenobiotikoen metaketaren eta berauen efektuen jarraipenerako espezie aproposak dira. Orokorrean, orain arteko ikerketetan, FLXk muskuiluetan eragindako aldaketak hainbat biomarkatzaileraren bidez ikertu dira; hala nola, entzima antioxidatzaileen adierazpena eta jardura, xenobiotikoen garraiatzaileen eta seinalizazio bidezidorren adierazpena, lipidoen peroxidazioa edota parametro lisosomikoak neurtuta (Cortez et al., 2019; Franzellitti et al., 2014, 2015). Hala ere, digestio-guruinean ez da transkriptoma mailako edo/eta errendimendu altuko tekniken bidezko ikerketarik burutu oraingoz, errendimendu altuko analisiak xenobiotikoei eragiten dituzten aldaketen ikuspegi orokorra lortzeko ezinbestekoak izan arren.

RNAren sekuentziazio masiboak (RNA-seq) ehun edo organo baten transkriptomaren analisi orokorra egiteko aukera ematen du, RT-qPCRren kasuan ez bezala, azken hau itu-gene zehatzetara mugatuta baitago. Gainera, RNA-seq-a bereziki erabilgarria izan daiteke oraindik erabat sekuentziatu edo/eta anotatu gabeko organismoetan, tartean muskuilua, horrek ondorengo emaitzen analisi bioinformatikoa mugatzen duen arren. Hala ere, transkriptoma moduko analisi *omikoak*, kutsatzaileen eraginpean esangarriki aldatutako edozein bidezidor esanguratsu antzeman dezakeen arren, estrategia *multiomikoak* beharrezkoak dira ebaluazio toxikologiko integratuak osatzeko (Portugal et al., 2022). Hori dela eta, OMICS4TOOL (Anses, INT-NOCORE 22/02) proiektuan hiru maila *omiko* nagusiak, transkriptoma, proteoma eta metaboloma, aztertu nahi izan dira FLXren ebaluazio toxikologikoa egiteko eta hiru *omiken* arteko loturak ezartzeko. Lan honetan zehazki, analisi transkriptomikoari dagokion atala garatu da, FLX antidepressiboak muskuiluen digestio-guruineko gene-adierazpenean duen eragina ezagutzeko zein proteoma eta

metabolomarekin integraziorako datuak prestatzeko. Era honetan, erregulatutako bidezidorrak deskribatzea eta, esangarriki erregulatutako geneetan oinarrituz, FLXren eraginaren gene-mailako biomarkatzaile berriak proposatzea bilatu da ere.

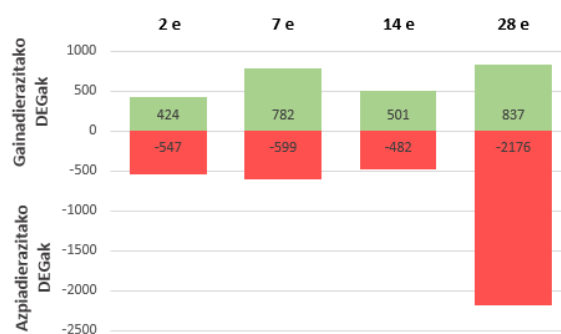
3. Ikerketaren muina

Lan hau Hydrosiences Montpellier ikerketa taldeak zuzendutako OMICS4TOOL proiektuan kokatu da. Thau urmaeletik (Frantzia) jasotako *Mytilus galloprovincialis* muskuiluak 7 egunez laborategiko baldintzetara egokitu ondoren, FLX (3,1 µg/L) tratamendupean jarri ziren eta hauen digestio-guruinak 2., 7., 14. eta 28. egunetan aztertu ziren, Lemaire et al. (2024) deskribatutako moduan. Guztira, 104 organismo ar aztertu ziren, sexua frotis bidez zehaztu ondoren. Talde esperimental gehienetan, 14na muskuilu aztertu ziren, hiru taldetan izan ezik: 2. eguneko kontrolean eta FLXren eraginpeko taldean 13na eta 28. eguneko FLXren eraginpeko taldean 8. Aztertutako laginen (104) RNAREN erauzketa TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) erreaktiboaren metodoa jarraituz egin zen eta, ondoren, erauzitako RNA, RNeasy Mini Kita (Qiagen) erabiliz purifikatu zen. Ondoren, RNA purifikatuaren kontzentrazioa neurtu zen eta RNAREN kalitatea ebaluatu zen 2100 Bioanalyzer-a (Agilent Technologies) erabiliz. RNAREN sekuentziazioa egiteko, lagin bakoitzaren 5 µL bidali ziren Azenta Genewiz (Alemania) enpresara. Azenta Genewiz enpresan, RNAREN irakurketa laburreko (2*150 bp) sekuentziazioa burutu zen, Illumina Novaseq 6000 plataforman. Illumina sekuentziazioak guztira 3.300 milioi irakurketa inguru eman zituen, 104 laginen artean, hau da, 32 milioi irakurketa inguru lagin bakoitzeko. Eskuratutako sekuentzien kalitatea aztertu ondoren, sekuentziak *Mytilus edulis* (GCA_019925275.1) erreferentziazko genomaren aurka mapeatu ziren Bowtie2 erabiliz eta NCBI datu-base ez erredundantearen kontra anotatu ziren BlastX programa erabiliz. Anotatutako sekuentzien garbiketa bikoitza egin zen; 300 bp baino luzeagoak ziren sekuentziak hautatuz eta filtrazio taxonomikoa eginez. Garbitutako sekuentziekin gene-adierazpen diferentzialaren analisia burutu zen DESeq2 erabiliz, non Wald testa erabili zen p-balioak eta $\log_2 \text{fold change}$ balioak kalkulatzeko. Doitutako p-balioa < 0,05 eta $|\log_2 \text{fold change}| > 0$ zituzten geneak ezberdinki adierazitako gene (DEG, *differentially expressed gene*) kontsideratu ziren. Guztira 6349 DEG aurkitu ziren, laginketa-aldi guztiak kontuan hartuz. Hauetatik, BlastX programaren bitartez %39,8a anokatzea lortu zen, eta anokatuen gehiengoa, bibalbioen klaseko espezieei zegokien (1. taula). Garbitutako sekuentziekin *Gene Ontology* (GO) analisia bideratu zen egun bakoitzerako. Gainera, gene-adierazpenaren erregulazio handiena 28. egunean eman zenez, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) analisia burutu zen, 28. eguneko laginekin GhostKOALA erabiliz.

1. taula. RNA sekuentziazioaren emaitzak laginketa-aldi bakoitzean. Ezberdinki adierazitako geneen (DEG) kopurua garbiketak egin ostean, hauetatik anokatutakoak eta anokatutako gabeak (NA), bibalbioei dagozkienak eta hauei lotutako GO termino desberdinen kopurua ageri dira.

	2. eguna	7. eguna	14. eguna	28. eguna
DEG	971	1381	984	3013
Anotatutakoak	336	490	429	1271
NA	635	891	555	1742
Bibalbioa	321	459	400	1203
GO terminoak	114	132	127	213

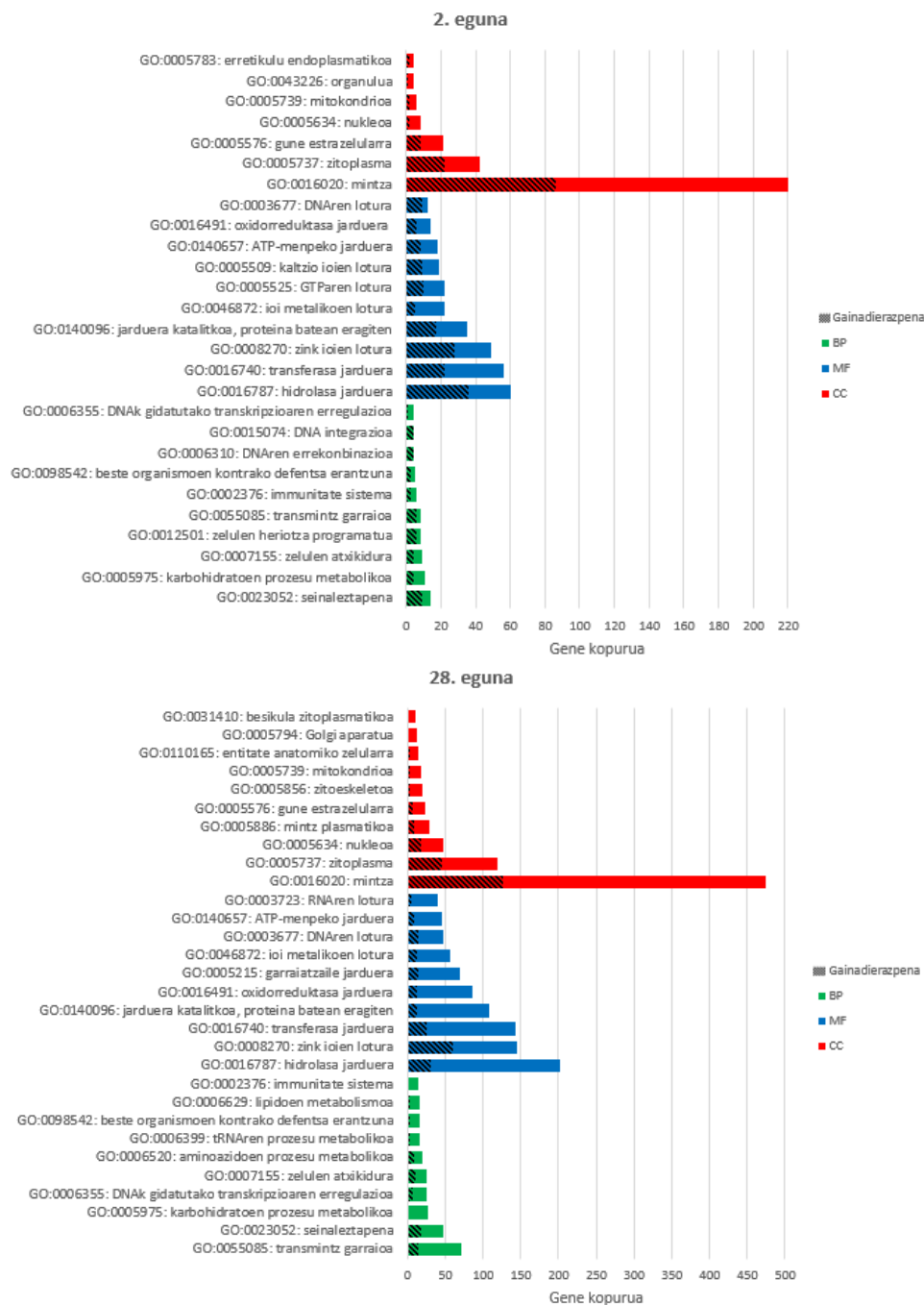
Esangarriki erregulatutako geneen kopurua esposizio-denborarekin hazi egin zen (1. taula eta 1. irudia), hau da, zenbat eta muskuiluak FLXren menpean denbora gehiago egon, orduan eta gene gehiagoren adierazpena erregulatu zen. 28. egunean, bereziki, azpierreulatutako geneak nabarmendu ziren. DEG kopuruaren joera gorakorak bat egiten du Lemaire et al. (2024) aztertutako muskuilu berdinen digestio-guruinaren FLXren biometaketarekin.

1. irudia. Laginketa-adi bakoitzean ezberdinki adierazitako geneen (DEG) kopurua.

Gainera, erregulatutako geneen kopuruaren eta FLXren biometaketaren 28. egunera arteko joera gorakorak iradokitzen du posible dela gene-adierazpenaren erregulazio maximoa eskuratu ez izana oraindik eta ondorengo laginketa-aldi batek argituko zukeena. Era berean, 28. egunean emandako DEG kopuruaren igoera nabarmenak, FLXk eragindako erantzunaren bi fase posible azalarazi zituen. Oro har, transkriptoma mailako erantzunak hiru fasetan banatzen direla deskribatu da: egokitzapena, konpentsazioa eta kalte orokorra (Denslow et al., 2007). Hasierako egokitzapen fasea 14. egunera arte luzatuko litzateke, FLXren toxizitatetik babesteko bidezidor biokimikoen adierazpena erregulatuz, aurrerago azalduko den moduan. Ondoren, 28. egunean DEG kopuru handiagoak eta bidezidor berrien erregulazioak fase aldaketa iradokitzen dute, konpentsazio fase posible bat islatuz. 2. eta 28. egunen GO terminoen erregulazioa alderatuta (2. irudia), ikus daiteke erregulazio eredua aldatu egiten dela, azpierreulazioa asko nabarmenduz eta gehien erregulatzen diren GO terminoen hurrenkera eta konposizioa aldatuz. Konpentsazio fasean organismoaren homeostasia mantentzeko ahaleginetan konpentsazio mekanismoak eragiten dira. FLXren eragina konpentsatzeko mekanismoak bidezidor ugariren azpierreulazioarekin lotuta daudela ematen du, hala nola oxidorreduktasa eta garraiatzaileen jarduerak, transmintz garraioa, eta karbohidratoen, lipidoen eta aminoazidoen metabolismoa (2. irudia).

Erregulatutako bidezidorrei dagokienez, laginketa-aldi guztiak kontuan hartuz, 265 GO termino desberdin anotatu ziren. Orokorrean, GO termino bakoitzeko DEGak gain- zein azipiadierazi ziren. GO termino guztiak hiru talde funtzional nagusietan banatu ziren, prozesu biologikoak (BP) 115 azpitaldetan banatuta, molekula mailako funtzioak (MF) 114 azpitaldetan eta zelulen osagaiak (CC) 36 azpitaldetan banatuta. 28. egunean gene gehien erregulatu zirenez eta emaitza esangarrienak egun honetan eman zirenez, zehatzago aztertu zen: MFei eta bereziki CCEi lotutako GO terminoetan metatu ziren erregulatutako gene gehien, izan ere, oro har, erregulatutako gene kopuru totala emendatu egin baitzen 28. egunean, gehien bat azpierreulazioa nabarmenduz (2. irudia). MFen artean nabarmentzekoa da gainerako egunetan eman ez zen oxidorreduktasa eta garraiatzaile jardueren azpierreulazioa. BPei dagokionez, berriz, transmintz garraioa gailendu zen, seinaleztapenarekin eta karbohidratoen prozesu metabolikoekin batera, hiruen azpierreulazioa nabarmena izanik. Era berean, beste organismoen kontrako defentsak erantzuna, lipidoen metabolismoa eta immunitate sistema azpierreulatu ziren.

2. irudia. Geneen banaketa top 10 GO terminoetan 2. eta 28. egunetan. GO terminoak hiru talde funtzional nagusitan banatuta daude; zelulen osagaiak (CC), molekula mailako funtzioak (MF) eta prozesu biologikoak (BP). GO termino bakoitzean ezberdinki gainadierazitako geneen kopurua marren bidez markatu da, marrarik gabeak berriz, azpiadierazitakoen kopurua islatzen du.

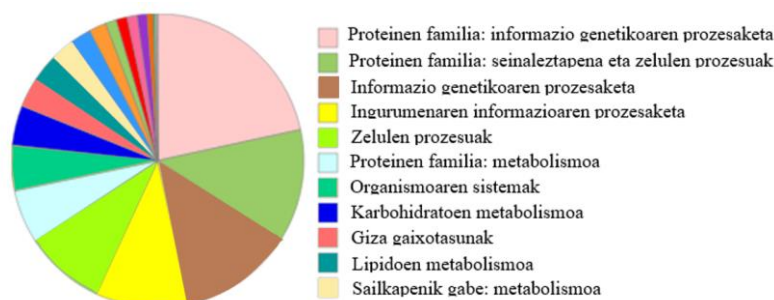


Azkenik, KEGG bidezidorren aberaste analisiaren bitartez 10 bidezidor nagusi identifikatu ziren 28. eguneko DEGak erabiliz (3. irudia), informazio genetikoaren prozesamendurekin, seinalizazioarekin, organismoaren sistemekin eta metabolismoarekin lotutako bidezidorrak, hain zuzen ere. Seinalizazioarekin erlazionatuta: “proteinen familia: seinaleztapena eta zelularen prozesuak” eta “ingurumenaren informazioaren prozesaketa” eta metabolismoarekin erlazionatuta: “proteinen familia: metabolismoa”, “karbohidratoen metabolismoa” eta “lipidoen metabolismoa” bidezidorrak antzeman ziren.

Gauzak horrela, nagusiki 28. egunean emandako karbohidratoen eta lipidoen metabolismoaren erregulazioa, GO zein KEGG terminoen analisisetan (2. eta 3. irudiak), FLXren ekintza-modu desberdinen ondorioa izan daitezke. FLXk muskuiluen digestio-guruinean cAMP/PKA seinaleztapen bidezidorraren azpierregrulazioa eragin dezakeela deskribatu da (Franzellitti et al., 2014anti) eta, orain arte bakarrik ornodunetan deskribatu

den arren, FLX glukosaren eta lipidoen metabolismoa azpierregrulatzeko gai da PI3K-AKT seinaleztapen bidezidorraren bitartez, cAMPak inhibitzen duena (Wang et al., 2001; Yang et al., 2020). Era berean, FLX gai da zuzenean mintz lipidikoen gantz-azidoekin elkarreagiteko eta mintzen lipidoen osaera eraldatzeko, mitokondrioen barne-mintzarekin elkarreagitera ailegatuz eta elektroien garraioa eta ATPasa jarduera oztopatuz (Curti et al., 1999; Pham et al., 2018). Laginketa-aldi guztietan mintza GO terminoak metatutako gene kopuru handiena izateak, FLXren izaera lipofilikoaren eta honek mintzen osagaiekin dituen elkarrekitzen garrantzia iradokitzen du.

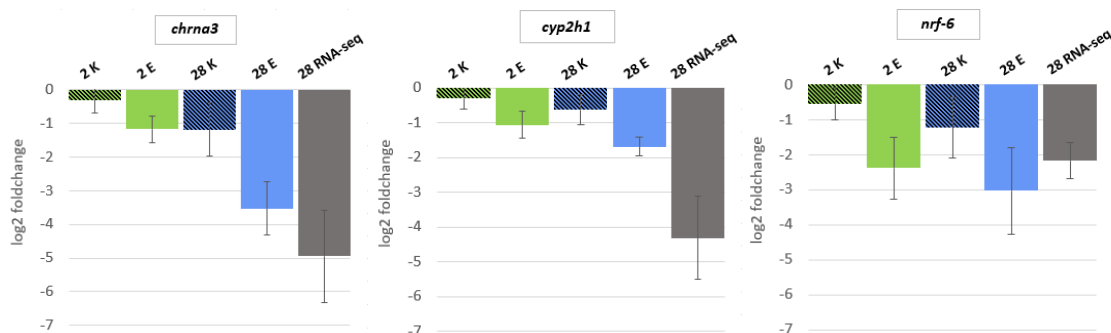
3. irudia. KEGG bidezidorraren aberastea 28. eguneko ezberdinki adierazitako geneak erabiliz.



Amaitzeko, molekula mailako balizko biomarkatzaile berriak aztertzeko, 28. eguneko DEGetatik 3 gene aukeratu ziren. Geneen aukeraketa egiteko hainbat parametro hartu ziren kontuan; $|\log_2 \text{fold change}| > 2$ izatea eta genearen funtzioaren eta GO/KEGG analisietan antzemandako bidezidorraren arteko erlazioa. RT-qPCR bidez P450 2H1 zitokromoa (*cyp2h1*, XP_021367081.1), azetilkolinaren alfa 3 hartzaile neuronal (chrna3, OWF40598.1) eta fluoxetinarekiko 6 sudur proteina erresistentea (*nrf-6*, XP_021368955.1) kodetzen duen genearen azterketa egin zen 2. eta 28. egunetako laginak erabiliz. Horretarako, itu-geneen hasleen diseinua RNAREN sekuentziaziotik lortutako FASTA sekuentziak erabiliz egin zen.

Gauzak horrela, RNAREN sekuentziazioaren emaitzak RT-qPCR bidezko analisien emaitzekin alderatu ziren *cyp2h1*, *chrna3* eta *nrf-6* geneak erabiliz. FLXrekin tratatutako muskuiluetan, hiru geneen azpierregrulaziorako joera behatu zen kontrolarekin alderatuta, 2. zein 28. egunean (4. irudia). Era berean, geneen azpierregrulazioa denborarekin areagotu zen. Alderaketa anitzetarako Dunn-en *post hoc* testa erabili zen Kruskal-Wallis analisi ez-parametrikoren ondoren, baina talde esperimentalen barneko aldakortasun altua zela eta, ez zen ezberdintasun esangarririk aurkitu kontrolen eta FLXren eraginpekoen artean, ezta egunen artean ere. Hala ere, bi tekniken gene-adierazpenaren emaitzek joera berdina adierazi zuten, hortaz RNAREN sekuentziazioaren emaitzak balioztatutzat hartu ziren (4. irudia).

4. irudia. RT-qPCRren emaitzak 2. eta 28. egunetarako RNA sekuentziazioarekin alderatuta. Laburdurak: kontrola (K), FLXren eraginpekoak (E).



RT-qPCR bidez aztertutako geneen artean, *cyp2h1* eta *chrna3* balizko biomarkatzaile berri gisa ikertu litezke. Izan ere, bi gene hauek besteak baino aldakortasun txikiagoa erakutsi zuten, eta erregulazio handiagoa, *chrna3* genearen kasuan. Kontuan hartuz *cyp2h1* beste xenobiotikoen eraginez ere erregulatu daiteke, sakonago ikertu beharreko *chrna3* genea markatzaile espezifikoagoa izan liteke FLXren eragina ikertzeko.

4. Ondorioak

FLXren eraginpeko *Mytilus galloprovincialis* muskuiluen digestio-guruinaren transkriptoma analizatu ostean ondorioztatu daiteke gene-adierazpena denborarekin eta biometatutako FLX kontzentrazioarekin ezberdinki erregulatzen dela. FLXk eragindako erantzunari lotutako bi fase, egokitza-pena eta konpentsazioa, desberdin daitezke. Gainera, honen azterketak esangarriki erregulatutako itu-bidezidorrak (metabolismo energetikoa, hidrolasa eta transferasa jardura katalitikoak eta mintzean zeharreko garraioa) zein etorkizunean erabili litezkeen gene markatzaileak (*cyp2h1* eta *chrna3*) azalarazi dituela bereziki 28. egunean. Era berean, FLXren izaera lipofilikoa dela eta, zelularen mintzarekin lotutako geneen erregulazioan ere eragin nabarmena izan du. Hala ere, DEGen erdia baino gutxiago anatatuta, FLXk eragindako erregulazioaren zati bat baino ez da aztertu eta FLXren eraginak anitzagoak edota esangarriagoak izan litezke. Emaiza hauek bat datoz OMICS4TOOL proiektuaren barruan proteoma eta metaboloma mailan behatutako erantzun arinekin.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

FLXren ekintza-mekanismoa hobeto ulertze aldera, etorkizunean esposizio-denbora luzeagoak erabili beharko lirateke muskuiluetan FLXren biometaketan egoera egonkorra lortzeko eta, horrek, gene-adierazpenean izan dezakeen eragina zehatzago aztertu ahal izateko. Era berean, etorkizunari begira, muskuiluen genomaren kalitatezko anotazioak garatzea lagungarria izango litzateke honelako analisi transkriptomikoak egiterakoan, erregulatutako gene gehiagoren funtzioa aztertu ahal izateko. Horrez gain, biomarkatzaile berriak erabili ahal izateko, itu-geneen RT-qPCR bidezko azterketetan sakondu beharko litzateke. Gauzak horrela, itsaspeko uren kalitatea bermatu aldera, instituzio publikoek HUAen efluenteen antidepresiboen zein beste medikamentuen ezabaketarako neurriak ezarri beharko litzateke.

6. Erreferentziak

- Correia, D., Domingues, I., Faria, M., & Oliveira, M. (2023). Effects of fluoxetine on fish: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *The Science of the Total Environment*, 857(Pt 2), 159486. <https://10.1016/j.scitotenv.2022.159486>
- Cortez, F. S., Souza, L. d. S., Guimarães, L. L., Pusceddu, F. H., Maranhão, L. A., Fontes, M. K., Moreno, B. B., Nobre, C. R., Abessa, D. M. d. S., Cesar, A., & Pereira, C. D. S. (2019). Marine contamination and cytogenotoxic effects of fluoxetine in the tropical brown mussel *Perna perna*. *Marine Pollution Bulletin*, 141, 366–372. <https://10.1016/j.marpolbul.2019.02.065>
- Curti, C., Mingatto, F. E., Polizello, A. C., Galastri, L. O., Uyemura, S. A., & Santos, A. C. (1999). Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199(1-2), 103–109. <https://10.1023/a:1006912010550>
- Denslow, N. D., Garcia-Reyero, N., & Barber, D. S. (2007). Fish 'n' chips: the use of microarrays for aquatic toxicology. *Molecular BioSystems*, 3(3), 172–177. <https://10.1039/b612802p>
- Díaz-Camal, N., Cardoso-Vera, J. D., Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., & Mejía-García, A. (2022). Consumption and occurrence of antidepressants (SSRIs) in pre- and post-COVID-19 pandemic, their environmental impact and innovative removal methods: A review. *The Science of the Total Environment*, 829, 154656. <https://10.1016/j.scitotenv.2022.154656>
- Fabbri, E., & Franzellitti, S. (2016). Human pharmaceuticals in the marine environment: Focus on exposure and biological effects in animal species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 799–812. <https://10.1002/etc.3131>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S. P., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., & Fabbri, E. (2014). An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquatic Toxicology*, 151, 14–26. <https://10.1016/j.aquatox.2013.11.016>
- Franzellitti, S., Buratti, S., Du, B., Haddad, S. P., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., & Fabbri, E. (2015). A multibiomarker approach to explore interactive effects of propranolol and

- fluoxetine in marine mussels. *Environmental Pollution*, 205, 60–69. <https://10.1016/j.envpol.2015.05.020>
- Gunnarsson, L., Jauhiainen, A., Kristiansson, E., Nerman, O., & Larsson, D. G. J. (2008). Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environmental Science & Technology*, 42(15), 5807–5813. <https://10.1021/es8005173>
- Lemaire, E., Gomez, E., Le Yondre, N., Malherbe, A., & Courant, F. (2024). Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposure to fluoxetine: Bioaccumulation and biotransformation products. *Chemosphere*, 365, 143314. <https://10.1016/j.chemosphere.2024.143314>
- Lochmann, D., & Richardson, T. (2018). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. In: Macaluso, M., Preskorn, S. (eds) *Antidepressants. Handbook of Experimental Pharmacology*, 250, 135–144, Springer, Cham. https://10.1007/164_2018_172
- Luis, L. G., Barreto, Â, Trindade, T., Soares, A. M. V. M., & Oliveira, M. (2016). Effects of emerging contaminants on neurotransmission and biotransformation in marine organisms - An *in vitro* approach. *Marine Pollution Bulletin*, 106(1-2), 236–244. <https://10.1016/j.marpolbul.2016.02.064>
- Madikizela, L. M., Ncube, S., Tutu, H., Richards, H., Newman, B., Ndungu, K., & Chimuka, L. (2020). Pharmaceuticals and their metabolites in the marine environment: Sources, analytical methods and occurrence. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 28, e00104. <https://10.1016/j.teac.2020.e00104>
- Moreira, D. G., Aires, A., de Lourdes Pereira, M., & Oliveira, M. (2022). Levels and effects of antidepressant drugs to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology: Toxicology & Pharmacology*, 256, 109322. <https://10.1016/j.cbpc.2022.109322>
- OECD. (2023). *Pharmaceutical Market. OECD Stat.* 2023ko azaroaren 20an berreskuratua. https://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_PHMC
- Pham, V. T., Nguyen, T. Q., Dao, U. P. N., & Nguyen, T. T. (2018). On the interaction between fluoxetine and lipid membranes: Effect of the lipid composition. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 191, 50–61. <https://10.1016/j.saa.2017.09.050>
- Piña, B., Casado, M., & Quirós, L. (2007). Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1145–1154. <https://10.1016/j.trac.2007.09.009>
- Portugal, J., Mansilla, S., & Piña, B. (2022). Perspectives on the Use of Toxicogenomics to Assess Environmental Risk. *Frontiers in Bioscience*, 27(10), 294. <https://10.31083/j.fbi2710294>
- Redshaw, C. H., Cooke, M. P., Talbot, H. M., McGrath, S., & Rowland, S. J. (2008). Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *Journal of Soils and Sediments*, 4(8), 217–230. <https://10.1007/s11368-008-0024-2>
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., & Faggio, C. (2018). Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *The Science of the Total Environment*, 631-632, 789–794. <https://10.1016/j.scitotenv.2018.03.076>
- Wang, L., Liu, F., & Adamo, M. L. (2001). Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways by inhibiting Rap1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37242–37249. <https://10.1074/jbc.M105089200>
- Yang, H., Cao, Q., Xiong, X., Zhao, P., Shen, D., Zhang, Y., & Zhang, N. (2020). Fluoxetine regulates glucose and lipid metabolism via the PI3K-AKT signaling pathway in diabetic rats. *Molecular Medicine Reports*, 22(4), 3073–3080. <https://10.3892/mmr.2020.11416>
- Zhu, C., Zhang, T., Li, Q., Chen, X., & Wang, K. (2023). Depression and Anxiety During the COVID-19 Pandemic: Epidemiology, Mechanism, and Treatment. *Neuroscience Bulletin*, 39(4), 675–684. <https://10.1007/s12264-022-00970-2>

7. Eskerrak eta oharrak

Dirulaguntzak: Anses (OMICS4TOOL, INT-NOCORE 22/02) eta Eusko Jaurlaritza (IT1743-22 eta IKASIKER beka). Lan hau, UPV/EHUko “El Saltillo” eskola-ontzian garatutako IKD i3 23-16 diziplinarteko ikasketa proiektuaren barruan garatu da.