

# Effekter av det antidepressiva läkemedlet fluoxetin på metamorfos och könsdifferentiering hos *Xenopus tropicalis*

---

Anneli Söderqvist

## Referat

### Effekter av det antidepressiva läkemedlet fluoxetin på metamorfos och könsdifferentiering hos *Xenopus tropicalis*

Anneli Söderqvist

Populationer av amfibier minskar i antal över hela världen och man vet ännu inte säkert vad det beror på. Människors överexploatering av mark och minskande habitat för amfibierna tros vara en orsak som driver amfibier till utrotning. Man tror att endokrinstörande miljöföroreningar kan vara ytterliggare en av orsakerna till minskande populationer för att de kan påverka tillväxt och utveckling av amfibier. Hormonellt aktiva substanser som läkemedel har återfunnits i det utgående vattnet efter reningsverk och då oftast i låga koncentrationer. Fluoxetin är en selektiv serotoninåterupptagshämmare (SSRI) som används för att behandla depression hos människor. Läkemedlet har påträffats i ytvatten i Nordamerika och Europa. Störningar på tyreoidsystemet som påverkar utvecklingen av tyreoidea och onormala halter av tyreoidhormon har påvisats hos vilt levande djurarter. Tyreoidhormoner reglerar metamorfosen hos amfibier, vilket medför att amfibier är en bra modell för att testa om kemikalier har negativ påverkan på tyreoidsystemet. Syftet med det här projektet är att undersöka effekter av antidepressiva läkemedel, s.k. selektivaserotoninåterupptagshämmare, på metamorfos (tyreoidsystemet) och gonaddifferentiering (könshormonsystemet) hos grodor av arten *Xenopus tropicalis*. Hypoteser för den här studien är att exponering för fluoxetin orsakar längre tid till metamorfos och lägre vikt vid metamorfos samt att exponering för fluoxetin eller etinylöstradiol orsakar ökad epitelcellhöjd i tyreoidea. En annan hypotes är att testikelutvecklingen påverkas efter exponering för fluoxetin. Exponeringen förlöpte från NF-stadium 47 fram till att grodorna metamorfoserat. Därefter utfördes histologiska, morfometriska och statistiska analyser. Resultaten från den här studien visar inte några histologiska förändringar på tyreoidea hos *Xenopus tropicalis* vilket tyder på att tyreoidfunktionen inte påverkades av 3 nM och 30 nM fluoxetin eller 100 nM etinylöstradiol. Den här studien visar att fluoxetinkoncentrationer upp till 30 nM inte påverkade vikt, längd, överlevnad, könskvot eller tid till metamorfos hos *Xenopus tropicalis*. Det tyder på att fluoxetin i miljön inte är akut toxiskt för vilda grodor.

Nyckelord: Amfibie, *Xenopus tropicalis*, Könsdifferentiering, Tyreoidea, Metamorfos

## Abstract

### Effects of the antidepressive drug fluoxetine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus tropicalis*

Anneli Söderqvist

Populations of amphibians are declining all over the world and it is still unknown what is causing this. Human exploitation of land and decreasing habitat for the amphibians is believed to be one reason that forces amphibians to extinction. One believed that endocrine disruptors are another reason to the decreasing number in populations because of their effect on growth and development of amphibians. Hormonal active substances like drugs are measured in low concentrations down streams treatment plants. Fluoxetine is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) that is used to treat depression in humans. The drug has been found in surface water in North America and Europe. In wild animals, disruption of the thyroid system that affects the development and the thyroid gland has been proven. The metamorphosis is regulated by the thyroid hormones in amphibians, which makes amphibian as a good model for study the negative effect of drugs on the thyroid system. In this Master's thesis work the effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on metamorphosis and sexual differentiation in *Xenopus tropicalis* will be studied. Hypothesis for this study is that exposure to fluoxetine will cause increased time to metamorphosis and reduced weight in the anurans at the time of metamorphosis. One more hypothesis is that exposure to fluoxetine or ethynylestradiol will cause increased epithelial cell height in thyroid gland and increased cross section area in thyroid gland. A further hypothesis is that development of testis will be prohibited by fluoxetine exposure. The exposures run from NF-stage 47 until the metamorphosis. After that, histological, morphometric and statistic analyses were performed. The result of this study indicates no histological changes in thyroid gland in *Xenopus tropicalis* when exposed to 3 and 30 nM fluoxetine and 100 nM ethynylestradiol. The study shows no effect on weight, length, survival and sex ratio or time to metamorphosis to *Xenopus tropicalis* when exposed to the test substances. The present research suggests that the potential for fluoxetine to cause acute toxicity in wild frogs to be negligible.

Keyword : Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Sexual differentiation, Thyroid axis, Metamorphosis

Department of ecotoxicology, Uppsala University, SE- 752 36 Uppsala, Sweden

## Förord

Det här arbetet är ett examensarbete utfört inom civilingenjörsutbildningen Miljö- och vattenteknik vid Uppsala universitet.Handledare för arbetet har varit Cecilia Berg och ämnesgranskare Jan Örberg vid ekotoxikologiska institutionen på Uppsala universitet. Studien har utförts på ekotoxikologiska institutionen på Uppsala universitet.

Jag vill börja med att tacka alla som hjälpt till med den praktiska delen av studien: Hanna Eriksson min ”försökskompis” som har fått mig att skratta när det varit som intensivast och kämpigast under exponeringen. Gunnar Steinholtz som hjälpt till med skötsel av grodorna under försökets gång. Margaret Mattson som har jobbat stenhårt för oss på labbet för att få histologin klar i tid och alltid med ett glatt humör. Ett stort tack till Irina Gyllenhammar som har funnits för frågor om allt och lite till under hela terminen.

Jag vill tacka Cecilia Berg för all handledning under examensarbetet, speciellt för handledning av skrivandet. Tack alla på avdelningen för att ni hjälper till och stöttar era examensarbetare.



## Effekter av antidepressiva läkemedel i naturen på grodor

### (Populärvetenskaplig sammanfattning)

**Förhindrar antidepressiva läkemedel, som kommer ut i miljön, grodor från att förvandlas från yngel till groda? Påverkar människans användning av medicin fortplantningen hos vilda vattenlevande djur? Tyvärr finns det flera studier som tyder på det.**

Amfibier minskar i antal över hela vår jord. Människan använder allt mer mark och förändrar de naturliga strukturerna, vilket riskerar amfibiers och många andra djurarters fortlevnad. Det kommer ut många okända ämnen i naturen som inte hör hemma där. Kasserade läkemedel kan hamna på soptippar och föras med lakvatten till ytvatten och grundvatten. Spill från jordbruk och fiskodlingar kan leda till att rester från läkemedel kommer ut i naturen via foder och gödsel. Tyvärr spolas också en del läkemedelsrester som till exempel antibiotika ner i avloppen, vilket kan leda till att nyttiga bakterier i reningsverken slås ut eller att giftiga bakterier blir resistenta. Många läkemedel är biologiskt aktiva och kan påverka tillväxt och utveckling av vattenlevande djur.

Fluoxetin är en medicin som används för att behandla depression hos människor. Man har hittat låga koncentrationer av läkemedlet i ytvatten i Nordamerika och Europa. I en studie på moskitfisk har man sett effekter på de yttre könskaraktärerna efter exponering för just fluoxetin.

I en pilotstudie har afrikansk klogroda (*Xenopus laevis*) exponerats för olika koncentrationer av fluoxetin. Den högsta koncentrationen som testades resulterade i signifikant förlängd tid till metamorfos och redan vid den lägsta koncentrationen på 0,056 µg/l som testades visades att grodorna hade lägre vikt än kontrollgrodorna vid metamorfos. Studien antyder också att det var ökad dödlighet och missbildningar som förvridna bakben. Resultaten tyder på att exponering av fluoxetin kan leda till negativa effekter på tyreoidsystemet hos grodor.

Sköldkörteln (Tyreoidea) producerar tyroxin (T4) och 3,5,3'-trijodtyronin (T3) vilka är tyreoidhormoner. I tyreoidea syntetiseras och lagras tyreoidhormoner som regleras av tyreoidstimulerande hormon (TSH) från hypofysen. Tillväxt och utveckling är mycket beroende av normala nivåer av tyreoidhormoner, speciellt för utvecklingen av centrala nervsystemet. Brist på tyreoidhormon kan leda till symptom som inte visas förrän senare i livet. Metamorfosen kontrolleras av T4, som konverteras till den mer aktiva formen T3 i målvävnaden av enzymet monodejodinas. Grodor är väldigt känsliga under tiden de metamorfoserar. Metamorfosen är klar när svansen är helt tillbakabildad.

Sköldkörtelhormoner påverkar och reglerar metamorfosen hos amfibier, vilket medför att amfibier är en bra modell för att studera kemikalier som har negativ påverkan på sköldkörtelsystemet. Störningar på tyreoidsystemet som påverkar utvecklingen av sköldkörteln och halterna av tyreoidhormon har påvisats hos vilt levande djurarter som amfibier, fiskar och fåglar.

Hos grodor kan störningar av normal sköldkörtelfunktion leda till permanenta effekter på reproduktionsystemet. Brist på sköldkörtelhormon under larvstadiet kan förhindra maskulinisering av viktiga könsstrukturer som laryngalmuskler hos afrikansk klogroda. I tidigare studier har man visat att grodor som exponerats för t.ex. etinylöstradiol, ett syntetiskt hormon som används i p-piller, har utvecklats till fler honor än normalt. Andra studier då man använt etinylöstradiol har resulterat i inhibering av metamorfos hos amfibier vilket tyder på

att sköldkörtelsystemet är påverkat. Det är därför intressant att undersöka eventuella histologiska förändringar på sköldkörteln efter exponering för etinylöstradiol. I flera studier har man sett beteendeförändringar hos fisk och råttor då de blivit exponerade för fluoxetin. Det har också visats en påverkan på reproduktionsförmåga. Då tiden till metamorfos ökade kraftigt hos afrikansk klogroda vid exponering för 29,5 µg/l fluoxetin och den högsta koncentrationen som användes i den här studien var 30nM (10,4 µg/l) är det troligt att högre koncentration fluoxetin skulle leda till förlängd tid till metamorfos även för västafrikansk klogroda.

I det här projektet undersöktes effekter av fluoxetin, som är den verksamma substansen i antidepressiva läkemedlet Prozac, och etinylöstradiol på metamorfos (sköldkörtelsystemet) och gonaddifferentiering (könshormonsystemet) och hos västafrikansk klogroda.

Resultaten från den här studien visar inte några förändringar på vävnader av sköldkörteln hos västafrikansk klogroda vilket tyder på att tyreoidfunktionen inte påverkades av testsubstanserna. Den högsta fluoxetinkoncentrationen som testades, vilken är högre än de nivåer som finns uppmätta i miljön, påverkade inte vikt, längd, överlevnad, könkvot eller tid till metamorfos hos västafrikansk klogroda. Det tyder på att fluoxetin i miljön inte är akut toxiskt för vilda grodor. Det går inte utesluta att fluoxetin har påverkat västafrikansk klogroda i den här studien då varken reproduktionsförmåga eller beteendeförändringar har studerats. Ytterligare studier krävs för att undersöka beteendeförändringar och ökade halter serotonin i hjärnan då yngel av västafrikansk klogroda exponeras för fluoxetin.

<b>1. INTRODUKTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 INLEDNING .....	1
1.2 XENOPUS TROPICALIS .....	2
1.3 TESTSUBSTANSER .....	2
1.3.1 Utsläppskällor.....	3
1.4 SYFTE OCH HYPOTES .....	4
1.4.1 Syfte.....	4
1.4.2 Hypoteser.....	4
<b>2. MATERIAL OCH METOD .....</b>	<b>5</b>
2.1 DJURHÅLLNING .....	5
2.2 HCG-INDUCERING OCH PARNING .....	5
2.3 EXPONERING AV FLUOXETIN OCH EE <sub>2</sub> .....	5
2.4 VATTENKVALITÉ .....	6
2.5 AVLIVNING OCH DISSEKTION .....	6
2.6 HISTOLOGI OCH MORFOMETRI AV TYREOIDEA.....	7
2.7 HISTOLOGISK KÖNSBESTÄMNING .....	8
2.8 STATISTISKA METODER.....	9
<b>3. RESULTAT.....</b>	<b>10</b>
3.1 TYREOIDHISTOLOGI.....	10
3.2 TID, VIKT, LÄNGD OCH ÖVERLEVNAD VID METAMORFOS .....	11
3.3 GONADHISTOLOGI .....	12
3.4 GONADLÄNGD.....	13
3.5 VATTENKVALITÉ .....	14
3.5.1 VATTENKONCENTRATIONER .....	14
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>15</b>
4.1 TYREOIDHISTOLOGI.....	15
4.2 TILLVÄXT OCH TID TILL METAMORFOS .....	15
4.3 GONADUTVECKLING.....	16
4.4 VATTENKVALITÉ OCH UPPMÄTTA HALTER .....	16
4.5 METODUTVECKLING.....	17
4.6 SLUTSATSER .....	17





# 1. Introduktion

## 1.1 Inledning

Populationer av amfibier minskar i antal över hela världen och man vet ännu inte säkert vad det beror på. Människors överexploatering av mark och minskande habitat för amfibierna tros vara en orsak som driver amfibier till utrotning (Stuart *et al.*, 2004). Man tror att endokrinstörande miljöföroreningar kan vara ytterliggare en av orsakerna till minskande populationer för att de kan påverka tillväxt och utveckling av amfibier (Carey and Bryant, 1995; Stuart *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2002). Vissa endokrinstörande läkemedel har påvisats i låga koncentrationer nedströms utloppet från reningsverk (Henry and Black, 2008).

Läkemedel är biologiskt aktiva föreningar som om de uppträder i tillräckligt stora koncentrationer skulle kunna påverka akvatiska organismer. De mest uppmärksammade läkemedlen är de som stör neuroendokrina system för att de kan påverka organismers utveckling vid väldigt låga koncentrationer (Henry and Black, 2008). Fluoxetin är en selektiv serotoninåterupptagshämmare (SSRI) som används för att behandla depression hos människor. Läkemedlet har påträffats i ytvatten i Nordamerika och Europa (Henry and Black, 2008).

I en pilotstudie (EPAs hemsida: Henry, 2005) har *Xenopus laevis* (afrikansk klogroda) exponerats för olika koncentrationer av fluoxetin. Den högsta koncentrationen på 29,5 µg/l fluoxetin resulterade i signifikant förlängd tid till metamorfos och redan vid den lägsta koncentrationen på 0,059 µg/l visades reducerad massa vid metamorfos. Studien antyder också att det var ökad dödlighet och missbildningar som förvridna bakben. Resultaten tyder på att exponering av fluoxetin kan leda till negativa effekter på tyreoidsystemet hos grodor.

Tyreoidea producerar tyroxin (T4) och 3,5,3'-trijodtyronin (T3) vilka är tyreoidhormoner. I tyreoidea syntetiseras och lagras tyreoidhormoner som regleras av tyreoidstimulerande hormon (TSH) från hypofysen. Tillväxt och utveckling är mycket beroende av normala nivåer av tyreoidhormoner, speciellt utvecklingen av centrala nervsystemet. Brist på tyreoidhormon kan leda till symptom som inte visas förrän senare i livet (Escobar, 2004). Metamorfosen kontrolleras av T4, som konverteras till den mer aktiva formen T3 i målvävnaden av enzymet monodejodinas (Denver *et al.*, 1997). Att metamorfosen kontrolleras av tyreoidhormoner medför att amfibier är en bra modell för att testa om kemikalier har negativ påverkan på tyreoidsystemet (Opitz *et al.*, 2006). Störningar på tyreoidsystemet som påverkar utvecklingen av tyreoidea och onormala halter av tyreoidhormon har påvisats hos vilt levande djurarter som amfibier, fiskar och fåglar (Colborn, 2002).

Hos grodor kan störningar av normal tyreoidfunktion leda till permanenta effekter på reproduktionsystemet. Brist på tyreoidhormon under larvstadiet kan förhindra maskulinisering av viktiga könsstrukturer som laryngalmuskler hos *Xenopus laevis* (Robertson and Kelley, 1996). Det finns studier som visar att exponering för en antityreoid substans förhindrar testikelutveckling hos *Xenopus laevis*, vilket antyder tyreoidhormoner behövs för testikeldifferentiering hos vissa grodor (Hayes, 1997b). Vid försök där man exponerat yngel för 0,06 nM och 0,6 nM etinylöstradiol visades inga tydliga histologiska förändringar i tyreoidea (Berg et al, opublicerat resultat). Andra studier har visat att koncentrationer på 0,37µM östradiol inhiberar tillbakabildandet av svansen hos *Xenopus laevis* vilket tyder på att tyreoidsystemet är påverkat (Hayes, 1997b). Det är därför intressant att undersöka om exponering för högre halter av etinylöstradiol orsakar histologiska förändringar på tyreoidea.

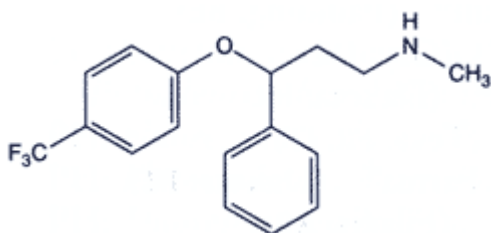
Det finns flera tidigare studier som visat samband mellan exponering för endokrinstörande föroreningar och missbildning av reproduktionsorgan samt onormala nivåer av könshormonkoncentrationer i vilda djur (Jobling *et al.*, 2002; Jobling *et al.*, 2006; Guillette *et al.*, 1994). Studier i vilka *Xenopus tropicalis* (västafrikansk klogroda) och *Rana temporaria* (vanlig groda) har exponerats för etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>) under yngelstadiet har resulterat i en skev könskvot redan vid koncentrationer som finns uppmätta i miljön (Pettersson and Berg, 2007). Inhibering av serotonin syntes under könsdifferentieringen hos tilapia (*Oreochromis mossambicus*) leder till minskad andel hanar, vilket tyder på att serotonin är viktigt för testikeldifferentiering (Tsai *et al.*, 2000).

## 1.2 *Xenopus tropicalis*

Amfibier har egenskaper som gör dem känsliga för störningar i miljön, till exempel så har de unik permeabel hud för gasutbyte och osmoregulering (Duellman William E, 1994). Den modellorganism som studeras i detta projekt är *Xenopus tropicalis* på grund av dess förhållandevis korta generationstid. *Xenopus tropicalis* har 66 utvecklingsstadier, som kallas NF-stadier (Nieuwkoop, 1956), precis som dess släkting *Xenopus laevis*. NF- stadierna, som sträcker sig från befruktat ägg till metamorfos, baseras på yttre morfologiska karaktärer (Nieuwkoop, 1956). Under senare tid har *Xenopus tropicalis* börjat användas mer inom toxikologisk forskning då den är diploid och inte tetraploid som *Xenopus laevis* (Fort *et al.*, 2004). *Xenopus tropicalis* tolererar ett temperaturintervall på 22- 28°C till skillnad från *Xenopus laevis* som utvecklas bra i ett temperaturintervall på 16- 25°C men kan tolerera så låg temperatur som 12°C och så hög som 28°C (Khokha *et al.*, 2002). Histologisk gonaddifferentiering hos *Xenopus tropicalis* sker under NF stadium 54 till 59 (Takase and Iguchi, 2007).

## 1.3 Testsubstanser

Fluoxetin (figur 1) används som läkemedel för att behandla depression hos människor (Fass hemsida,a). Fluoxetin är den aktiva ingrediensen i den första ordinerade SSRI medicinen i USA med läkemedelsnamnet Prozac. Direkt efter det att serotonin (5-HT) precis syntetiserats lagras den i lagringsvesiklar som tömmer innehållet i synapsiska klyftan på signal av nervimpuls. När 5-HT har frisatts aktiverar neurotransmittorn en specifik receptor och 5-HT transporteras tillbaka till den presynapsiska terminalen av ett speciellt transportprotein. Blockering av serotoninåterupptag ökar den synapsiska tillgängligheten av neurotransmittor vilket förstärker aktiveringen av de postsynapsiska receptorerna.



**Figur 1.** Molekylstruktur av fluoxetin

**Tabell 1.** Fysikaliska, kemiska och ekotoxikologiska egenskaper för fluoxetin (CAS 54910-89-3)

Egenskap	Enhet
Kemisk renhet <sup>1</sup>	99 %
Empirisk formel <sup>3</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>3</sub> NO
Molekylvikt <sup>3</sup>	345,79 g/mol
K <sub>w</sub> <sup>1</sup> ( Vattenlöslighet)	38,4 mg/l vid 25°C
K <sub>ow</sub> <sup>1</sup> (fördelningskoefficient oktanol/vatten)	4,05
Ångtryck <sup>1</sup>	8,9·10 <sup>-7</sup> mm Hg vid 25°C
PEC-värde <sup>2</sup> (antar ingen degradering)	0.044 µg/l
PNEC-värde <sup>2</sup>	0.11 µg/l

<sup>1</sup> (Nentwig, 2007)

<sup>2</sup> (Fass´s hemsida, b)

<sup>3</sup> (Brooks *et al.*, 2003)

### Etinylöstradiol

Östradiol har i studier visat sig hämma metamorfosen vilket tyder på störningar av normal tyreoidfunktion (Hayes, 1997a). Det syntetiskt framställda östrogetenet etinylöstradiol används i preventivmedel och för behandling av östrogenbrist. Etinylöstradiol är den mest verksamma östrogenföreningen som påträffats i vattendrag (Kolpin *et al.*, 2002). Nedströms reningsverk i USA och i Europa har man mätt upp koncentrationer av etinylöstradiol på 273 ng/l respektive 125 ng/l (Kolpin *et al.*, 2002). Etinylöstradiol kan därför anses vara en miljöförorening och på så vis en modellförening lämplig för att studera östrogeninducerad utvecklingstoxicitet (Pettersson *et al.*, 2006).

#### 1.3.1 Utsläppskällor

Läkemedel kan komma ut i miljön på flera olika vis. Läkemedelsproduktion, kliniska och kemiska laboratorier och sjukhus är några exempel på utsläppskällor. Kasserade läkemedel kan hamna på soptippar och föras med lakvatten till ytvatten och grundvatten. Spill från jordbruk och fiskodlingar kan leda till att rester från läkemedel kommer ut i naturen via foder och gödsel. Tyvärr spolas också en del överblivna läkemedel ner i avloppen (FASS hemsida, c). Avloppsreningsverken kan dock inte bryta ner vissa läkemedelsrester så alla substanser avlägsnas inte (Svenskt vattens hemsida; Naturvårdsverkets hemsida).

## **1.4 Syfte och hypotes**

### **1.4.1 Syfte**

Syftet med det här projektet är att undersöka effekter av fluoxetin och etinylöstradiol på metamorfos (tyreoidsystemet) och gonaddifferentiering (könshormonsystemet) hos *Xenopus tropicalis*. Effekter av etinylöstradiol på tyreoidhistologi ska undersökas eftersom att man tidigare visat att metamorfosen inhiberas av höga etinylöstradiolkoncentrationer.

### **1.4.2 Hypoteser**

Hypoteser för den här studien är att exponering för fluoxetin orsakar längre tid till metamorfos och lägre vikt vid metamorfos samt att exponering för fluoxetin eller etinylöstradiol orsakar ökad epitelcellhöjd i tyreoidea och ökad tvärsnittsarea av tyreoidea. En annan hypotes är att testikelutvecklingen påverkas efter exponering för fluoxetin.

## 2. Material och metod

I studien användes vattenexponering för att efterlikna exponering som sker i naturen. Arten *Xenopus tropicalis* är lätt att stimulera till äggläggning med hjälp av gonadotropin. Det tar olika lång tid för grodorna att nå metamorfos men då studien endast sträcker sig till tiden till metamorfos så avlivades grodorna det dygn de metamorfoserat. Försöket avslutas när den sista grodan metamorfoserat.

### 2.1 Djurhållning

Grodorna hölls i 40 L- akvarier med 4-10 stycken i varje som har vatten med en temperatur på 26 °C med 12 timmars ljus/mörkeracykler. Vattnet bestod av 9 delar avjoniserat och 1 del kopparfritt vatten från Uppsala kommunala vatten. Ynglen matades med Sera- micron (SERA, Germany).

### 2.2 hCG-inducering och parning

Sex honor och sex hanar injicerades i dorsala lymfkörteln med humant gonadotropin (hCG 0,1 ml, 200 enheter/ml) löst i 0,9 % NaCl-lösning, dagen innan parningen. En högre dos hCG (0,1 ml, 1000 enheter/ml) injicerades samma dag som parningen skulle ske. Grodorna placerades parvis i mindre akvarier, kontrollerades med en timmes intervall och efter äggläggningen separerades de igen.

### 2.3 Exponering för fluoxetin och EE<sub>2</sub>

Ca 70 yngel i NF-stadium 47 placerades i åtta olika akvarier med 8 liter vatten i varje. Ynglen var slumpvis plockade från de olika avelsparen för att få blandad genetisk bakgrund. Det var två replikat, A och B, för varje koncentration och för kontrollgruppen (Figur 2). Ynglen exponerades för olika koncentrationer av fluoxetin, 3 nM och 30 nM eller 100 nM etinylöstradiol. De exponerades från NF- stadium 47 till 66. Stadium 66 är då de har genomgått metamorfos, dvs. då svansen är fullständigt tillbakabildad. Exponeringen skedde under semistatiska förhållanden. Fem liter vatten byttes ut varje dag och stamlösningar av testsubstanserna tillsattes vid varje byte för att upprätthålla rätt koncentration. Substanserna hade lösts i etanol och därför tillsattes endast etanol till kontrollerna. Etanolkoncentrationen var 0,0005 % i alla akvarier. Tre gånger under studien togs vattenprover för analys av fluoxetinkoncentrationerna på kemiska institutionen på Umeå Universitet. Provtagningarna utfördes dag 3, 22 och 50 under exponeringstiden.



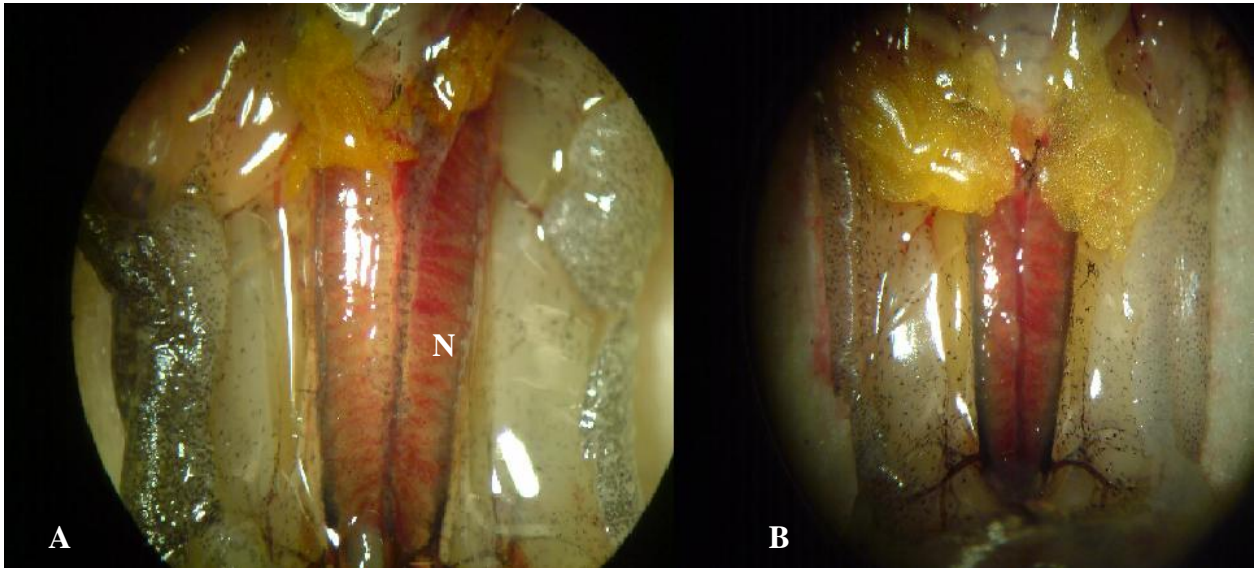
**Figur 2** . Försöksuppställning med åtta akvarier för exponering av fluoxetin eller etinylöstradiol på *Xenopus tropicalis*. Det var två akvarier till varje exponeringsgrupp samt till kontroll.

## 2.4 Vattenkvalité

Varje vecka mättes halten ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) och nitrit ( $\text{NO}_2$ ) fotometriskt genom att använda standardtester från Merck (Damstedt, Germany). pH- värdet kontrollerades regelbundet en gång i veckan.

## 2.5 Avlivning och dissektion

Grodorna avlivades genom att de sänktes ned i en lösning av 1 % bensokain, löst i 70 % etanol. Varje groda vägdes och längden från nos till kloak mättes. Kön bestämdes makroskopiskt utifrån storlek och form på gonaderna. Gonadernas längd mättes med hjälp av millimeterpapper. Testikelns längd är cirka en tredjedel av njurens och saknar melaninpigment till skillnad från ovarier som är nästan lika långa som njuren, har pigment och är vågiga i strukturen, se figur 3 (Pettersson *et al.*, 2006). För att kunna undersöka effekter av fluoxetin på gonaderna histologiskt skars mellangärdet ur och lades i en 4 % buffertlösning av formalin i minst ett dygn och därefter i etanol. Effekter på sköldkörtelhormonsystemet undersöktes genom att mäta ynglens utvecklingshastighet och eventuella histologiska förändringar av tyreoidea. Vävnaden med tyreoidea lades i formalin i minst ett dygn och därefter i etanol.

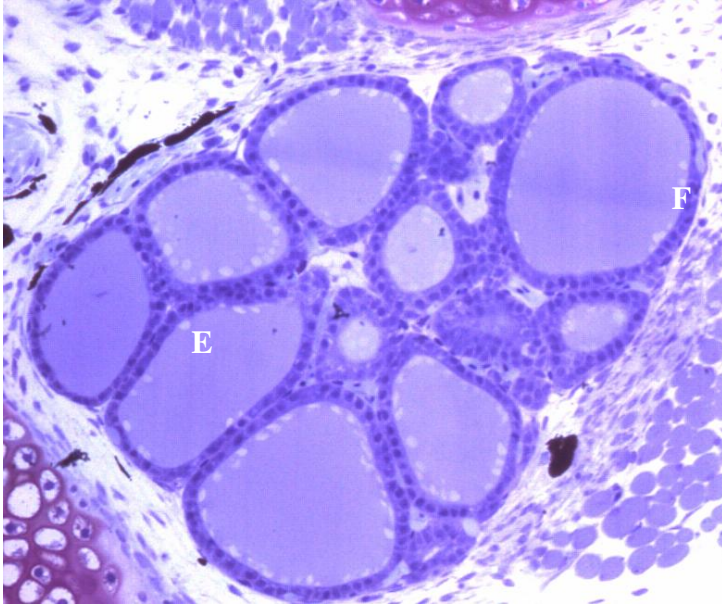


**Figur 3 . (A)** Gonader från en typisk honlig *Xenopus tropicalis* vid metamorfos. Gonaderna ligger ovanpå njurarna (N) och är nästan lika långa som njurarna. De honliga gonaderna har mer vågig struktur och melaninpigment. **(B)** Gonader från hanlig *X.tropicalis* vid metamorfos. De är kortare och slätare i strukturen samt saknar pigment.

## 2.6 Histologi och morfometri av tyreoida

Vävnad med tyreoida dehydrerades i 70 %, 95 % och absolut etanol och bäddades sedan in i hydroxyetyl metakrylat (Leica Histo-resin, Heidelberg, Germany). Snitt ( $2\mu\text{m}$ ) färgades med toluidinblått. För 5 individer per grupp togs snitt från ca 6 olika nivåer med  $50\mu\text{m}$  mellanrum från tyreoida. Tyreoidasnittet med störst och tydligast tvärsnittsarea valdes ut för mätning och analys. Snitten fotograferades med en Hamamatsukamera C4742-95 kopplat till ett mikroskop av märket Leica DMRX. För att mäta i fotografierna användes bildanalysprogrammet ImageJ (NIH Image/ImageJ). Tvärsnittsarean av tyreoida och arean av de tre största folliklarna mättes (figur 4). Alla folliklar som blivit genomskurna där lumen var synbar räknades per tyreoida. Epitelcellhöjden mättes på fyra punkter ( $0$ ,  $90$ ,  $180$  och  $270^\circ$ ) i de tre största folliklarna och ett medelvärde per individ beräknades.

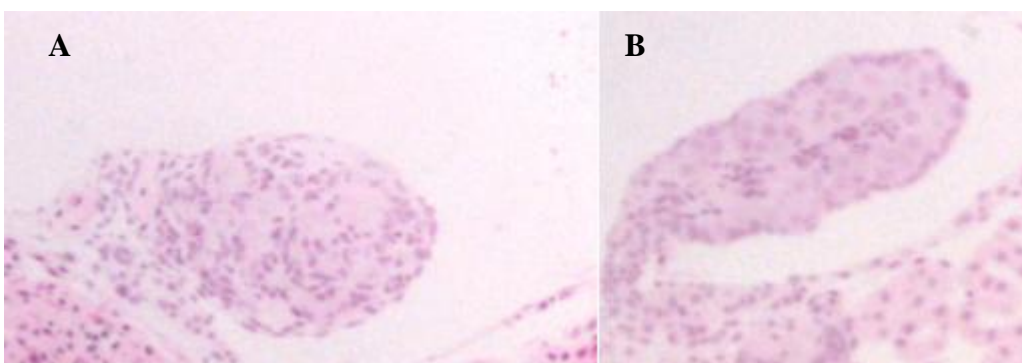




**Figur 4.** Tvärsnitt av en tyreoida med 11 folliklar (F) i genomskärning. (E) Epitelceller som mättes runt de tre största folliklarna på fyra punkter (0, 90, 180 och 270°).

## 2.7 Histologisk könsbestämning

Mellangärdet med gonader och njurar dehydrerades i 70 %, 95 % och absolut etanol och bäddades sedan in i hydroxyetyl metakrylat (Leica Histo-resin, Heidelberg, Germany). Snitt (2µm) från gonaderna färgades med hematoxylin och eosin. Gonaderna studerades under mikroskop och könet fastställdes. De gonader som innehöll ett hålrum omgivet av bark klassificerades som äggstockar och gonader med en medulla utan hålrum klassificerades som testiklar som visas i figur 5 (Pettersson and Berg, 2007). Det noterades om hålrummet i ovarierna var tydligt, om det fanns utvecklade äggceller och om gonaderna var onormalt små eller stora.



**Figur 5.** (A) Hanlig gonad från en icke exponerad *Xenopus tropicalis* vid metamorfos där medulla är utan hålrum. (B) Honlig gonad från icke exponerad *Xenopus tropicalis* vid metamorfos där det finns ett hålrum med omgivande cortex.

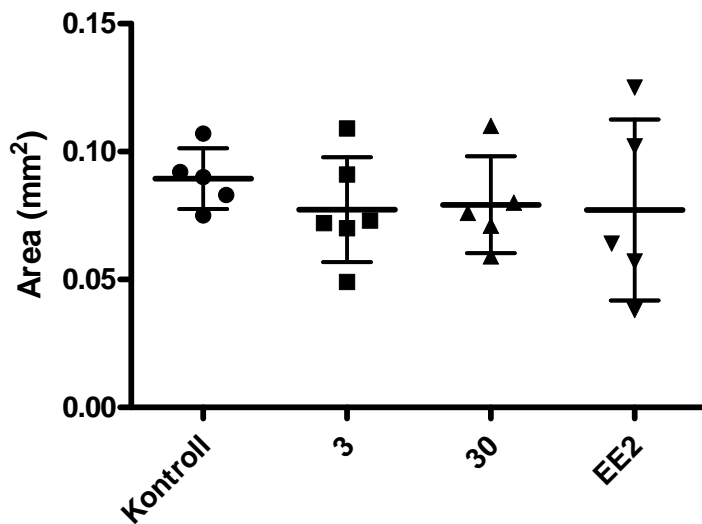
## **2.8 Statistiska metoder**

All data för statistikanalys testades med avseende på normalfördelning för att sedan använda lämpligt test beroende på om de var normalfördelade eller inte. De olika exponeringsgrupperna jämfördes med avseende på vikt, längd och tid till metamorfos med Kruskal-Wallis test och post-test Dunn's Multiple Comparison test (GraphPad Prism 5.0, Graphpad Software, San Diego, CA, USA). Även data från mätningar av tyreoidea jämfördes med Kruskal-Wallis test följt av Dunn's Multiple Comparison test (GraphPad Prism 5.0). Överlevnaden i grupperna testades med Chi-square test och Fishers exakta test (GraphPad Prism 5.0). Längden på gonaderna jämfördes med Kruskal-Wallis test (GraphPad Prism 5.0) och operat t-test eller Mann Whitney test.

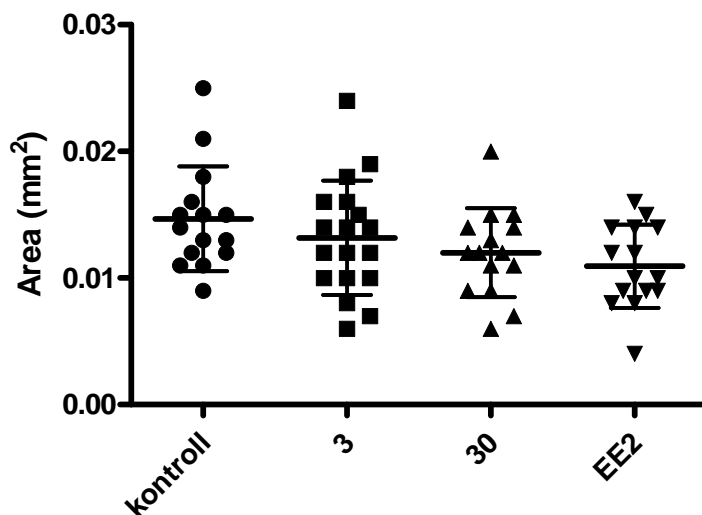
### 3. Resultat

#### 3.1 Tyreoidhistologi

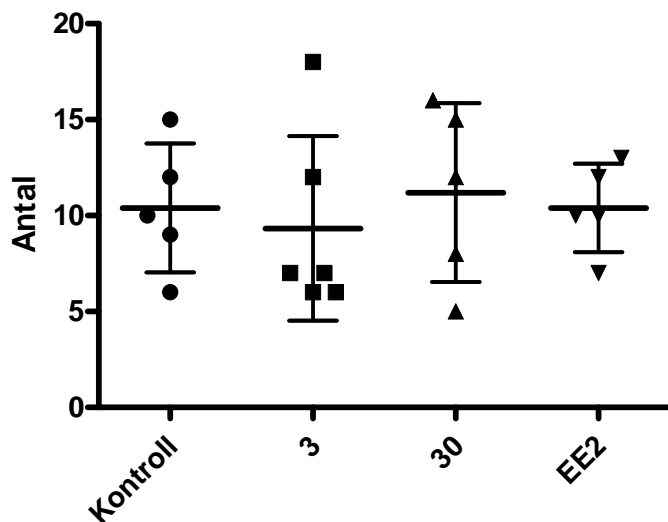
Resultaten visade ingen signifikant skillnad mellan kontrollgruppen och de exponerade grupperna i vare sig tvärsnittsarea av tyreoidea, follikelarea, antal folliklar eller epitelcellhöjd (figur 6,7,8,9).



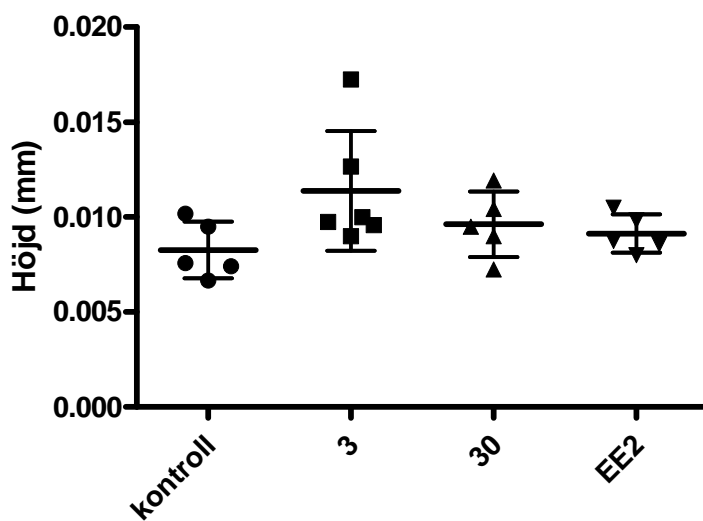
**Figur 6.** Tvärsnittsarea (medelvärde  $\pm$  SD) av tyreoidea (n=5) hos *Xenopus tropicalis* vid tiden för metamorfos efter exponering för 3 och 30 nM fluoxetin och 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>).



**Figur 7.** Follikelarea (medelvärde  $\pm$  SD) av de tre största tyreoideafolliklarna (n=15) hos alla grupper av *Xenopus tropicalis* vid metamorfos efter exponering för 3 och 30 nM fluoxetin och 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>).



**Figur 8.** Antal folliklar (medelvärde  $\pm$  SD) per tyreoida ( $n = 5$ ) hos *Xenopus tropicalis* vid metamorfos efter exponering för 3 och 30 nM fluoxetin och 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>).



**Figur 9.** Epitelcellhöjden (medelvärde  $\pm$  SD) hos de tre största folliklarna per tyreoida ( $n = 5$ ) hos *Xenopus tropicalis* vid metamorfos efter exponering för 3 och 30 nM fluoxetin och 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>).

### 3.2 Tid, vikt, längd och överlevnad vid metamorfos

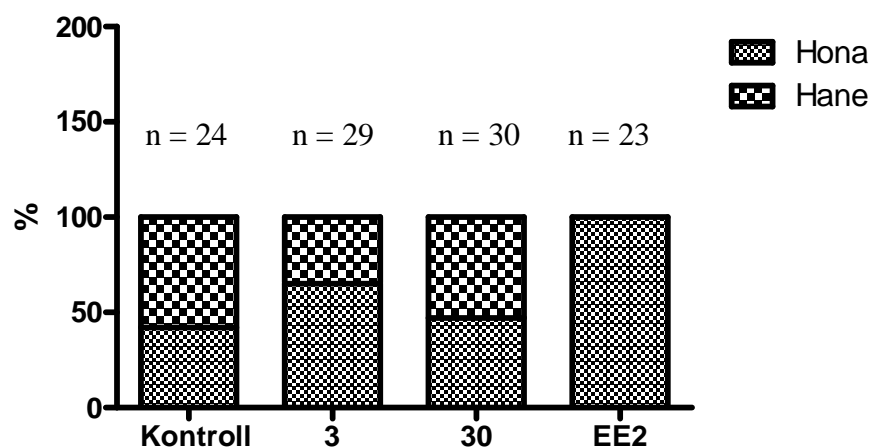
Det var ingen signifikant skillnad mellan de exponerade grupperna och kontrollgruppen i tid till metamorfos (Tabell 2). I kontrollgruppen var det signifikant skillnad mellan replikaten där kontrollrepliket B hade signifikant längre tid till metamorfos än kontrollrepliket A. Grupperna 3 nM och EE<sub>2</sub> hade signifikant längre tid till metamorfos än kontroll A. Kontroll B hade signifikant längre tid till metamorfos än 30 nM. Det fanns ingen signifikant skillnad i vikt eller längd vid metamorfos mellan grupperna (Tabell 2). EE<sub>2</sub>B hade signifikant högre överlevnad än alla andra grupper inklusive EE<sub>2</sub>A.

**Tabell 2.** Tid, vikt, längd (medelvärde  $\pm$  SD) och överlevnad vid metamorfos för *Xenopus tropicalis* efter exponering för 3 eller 30 nM fluoxetin eller 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>). I tabellen används förkortningarna KA och KB för kontrollreplikat A och B samt EE<sub>2</sub>A och EE<sub>2</sub>B för etinylöstradiolreplikaten.

Koncentration Grupp	Tid till metamorfos (dagar)	Kroppsvikt (g)	Kroppslängd (cm)	Överlevnad (%) (avlivade/antal exponerade)
<b>Kontroll</b>	KA 46,78 $\pm$ 10,78 n = 37	0,3865 $\pm$ 0,1283 n = 62	1,290 $\pm$ 0,3493 n = 61	81 (114/140)
	KB 57,67 $\pm$ 12,11 n = 45			
<b>Fluoxetin 3 nM</b>	54,07 $\pm$ 11,26 n = 88	0,3855 $\pm$ 0,1119 n = 67	1,400 $\pm$ 0,1231 n = 66	88 (119/136)
<b>Fluoxetin 30 nM</b>	50,70 $\pm$ 9,47 n = 89	0,3759 $\pm$ 0,1318 n = 70	1,392 $\pm$ 0,1399 n = 68	87 (122/141)
<b>EE<sub>2</sub> 100 nM</b>	52,38 $\pm$ 10,09 n = 95	0,3628 $\pm$ 0,09928 n = 94	1,390 $\pm$ 0,1947 n = 93	EE <sub>2</sub> A 87 (54/62)
				EE <sub>2</sub> B 100

### 3.3 Gonadhistologi

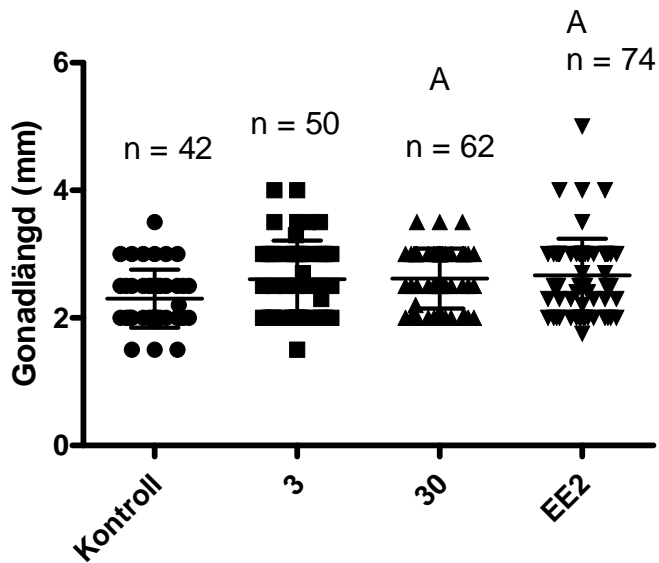
Resultatet visar som förväntat att alla exponerade individer i etinylöstradiolgruppen utvecklades till fenotypiska honor (figur 10). Det fanns ingen signifikant skillnad i könsfördelningen mellan kontrollgruppen och individer exponerade för fluoxetin (figur 10).



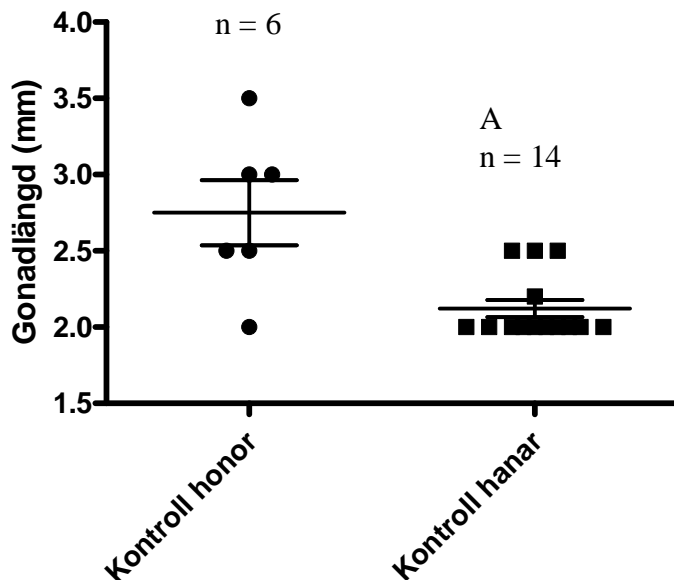
**Figur 10.** Könsfördelning baserad på gonadhistologi hos *Xenopus tropicalis* vid metamorfos efter exponering för 3 eller 30 nM fluoxetin eller 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>).

### 3.4 Gonadlängd

Det var signifikant skillnad på längden av gonaderna för båda könen mellan kontrollen och de exponerade grupperna fluoxetin 30 nM och EE<sub>2</sub> 100 nM (figur 11). I kontrollgruppen var honornas ovarier signifikant längre än hanarnas testiklar (figur 12).

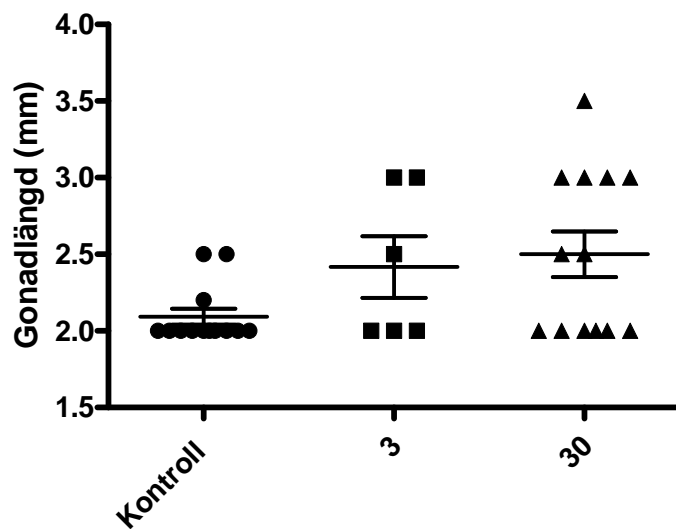


**Figur 11.** Längden på gonader (medelvärde  $\pm$  SD) för båda könen vid metamorfos hos *Xenopus tropicalis* efter exponering för 3 eller 30 nM fluoxetin eller 100 nM etinylöstradiol (EE<sub>2</sub>). A = Signifikant skillnad från kontroll (P < 0,05) med Kruskal Wallis test och Dunn's Multiple Comparison test.



**Figur 12.** Längden på ovarier (medelvärde  $\pm$  SD) för honor (n = 6) jämfört med testiklar på hanar (n = 14) i kontrollgruppen vid metamorfos hos *Xenopus tropicalis*. A = Signifikant skillnad (P < 0,05) med Mann Whitney test.

Det var ingen signifikant skillnad på längden av testiklarna mellan hanarna i de exponerade grupperna ( Figur 13).



**Figur 13.** Längden på testiklar (medelvärde  $\pm$  SD) för hanar vid metamorfos hos *Xenopus tropicalis* efter exponering för 3 eller 30 nM fluoxetin.

### 3.5 Vattenkvalité

Värdet på pH varierade mellan 7,5 och 7,9 under exponeringen. Halten ammoniak var relativt konstant (ca 50-75  $\mu\text{g/l}$ ) under de första fem veckorna av exponeringstiden hos alla grupper men minskade för kontrollerna och etinylöstradiolgruppen de sista tre veckorna. Då ammoniakhalterna sjönk ökade nitrithalterna kraftigt i de aktuella akvarierna. Halterna nitrit ökade till över 3500  $\mu\text{g/l}$  för kontroll A och EE<sub>2</sub>-replikaten. Hos de fluoxetinexponerade grupperna steg nitrithalterna till max 190-240  $\mu\text{g/l}$ .

#### 3.5.1 Vattenkoncentrationer

**Tabell 3.** Nominella och uppmätta koncentrationer av fluoxetin i akvarierna under exponeringstiden. De uppmätta halterna är ett medelvärde från tre olika mätningar och replikat tillhörande samma exponeringsgrupp.

Grupp	Koncentration
Kontroll	0,0 $\mu\text{g/l}$
Fluoxetin 3 nM (1,04 $\mu\text{g/l}$ )	0,67 $\mu\text{g/l}$
Fluoxetin 30 nM (10,4 $\mu\text{g/l}$ )	9,6 $\mu\text{g/l}$

## 4. Diskussion

Det huvudsakliga syftet med den här studien var att analysera effekter av substanserna fluoxetin och etinylöstradiol på tyreoidkörtelns struktur och funktion hos *Xenopus tropicalis*.

### 4.1 Tyreoidhistologi

En av hypoteserna för den här studien var att exponering för fluoxetin eller etinylöstradiol orsakar ökad epitelcellhöjd i tyreoidea men resultaten visade ingen signifikant skillnad mellan kontrollen och de exponerade grupperna. Goleman (2002) har visat att *Xenopus laevis* som exponerats för ammoniumperklorat under yngelstadium fick signifikant högre epitelceller i tyreoidea och feminiserad könskvot. Perklorat inhiberar jodupptaget till tyreoidea vilket leder till minskat tillgängligt jod för tyreoidhormonsyntes. En konsekvens av minskad tyreoidhormonsyntes är att utsöndring av tyreoidstimulerande hormon frisätts på grund av minskad återkoppling. Det i sin tur leder till förstoring av follikelceller. Effekter av serotonin på frisättningen av tyrotropinfrisättande hormon (TRH) på råttor har studerats in vitro och har visat att serotonin inhiberar frisättning av TRH (Mitsuma *et al.*, 1996). I en annan studie på råttor har det visats att fluoxetin leder till minskade halter T3 och T4 och därmed ökade halter tyreoidstimulerande hormon (Golstein *et al.*, 1983). Då SSRI blockerar återupptag av serotonin leder det till ökade halter av neurotransmittorn i hjärnan. Ökade halter serotonin i hjärnan leder till minskade halter T3 och T4. I den här studien var ytterligare en hypotes att exponering för fluoxetin eller etinylöstradiol orsakar ökad tvärsnittsarea av tyreoidea. Det påvisades ingen signifikant skillnad mellan kontrollen och de exponerade grupperna med avseende på tvärsnittsarean av tyreoidea. En studie på *Xenopus tropicalis* (Carlsson and Norrgren, 2007) visades ett dos- respons förhållande mellan tvärsnittsarea av tyreoidea och exponering för 6-propylthiouracil. Individerna i alla exponerade grupper hade signifikant större tvärsnittsarea på tyreoidea än kontrollen. Resultatet är troligen också en konsekvens av ökad frisättning av tyreoidstimulerande hormon. Resultaten från histologiska undersökningar av tyreoidea i den här studien visade inte abnormiteter som konsekvens av ökade halter tyreoidstimulerande hormon då *Xenopus tropicalis* exponerats för 3 nM och 30 nM fluoxetin eller 100 nM Etinylöstradiol.

### 4.2 Tillväxt och tid till metamorfos

En hypotes var att tiden till metamorfos skulle vara förlängd hos de grodor som exponerats för fluoxetin, men eftersom det var skillnad mellan replikaten i kontrollgruppen kan inte den slutsatsen dras. Det var signifikant längre tid till metamorfos för grupperna exponerade för 3 nM fluoxetin eller EE<sub>2</sub> jämfört med kontroll A. Henry och Blacks pilotstudie visade att tiden till metamorfos ökade kraftigt hos *Xenopus laevis* vid exponering för 29,5 µg/l fluoxetin men visade ingen signifikant skillnad vid exponering för 2,95 µg/l fluoxetin vilket kan jämföras med den högsta koncentrationen som användes i den här studien på 30 nM (10,4 µg/l).

Det visades ingen skillnad i längd och vikt mellan kontrollgruppen och grupperna som exponerats för fluoxetin eller EE<sub>2</sub>. I pilotstudien av Henry och Black framkom en tydlig massreducering hos *Xenopus laevis* redan vid exponering för så låga koncentrationer som 0,059 µg/l fluoxetin. I en studie på japansk mekadafisk (*Oryzias latipes*) visades ingen påverkan av tillväxten vid exponering för fluoxetin (Foran *et al.*, 2004). Inte heller på moskitfisk visades påverkan på tillväxten vid exponering för fluoxetin (Henry and Black, 2008).



I den här studien hade etinylöstradiolreplik B signifikant högre överlevnad (100 %) än de andra grupperna, även etinylöstradiolreplik A. Resultatet på överlevnaden vid exponering för etinylöstradiol i den här studien kan jämföras med resultat från Pettersson (2007). Då *Xenopus tropicalis* exponerats för tre olika koncentrationer av etinylöstradiol (0.006 nM, 0.06 nM, 0.6 nM) var det endast 0.06 nM som skiljde sig signifikant men då med sämre överlevnad. Det är inte troligt att EE<sub>2</sub> skulle gynna överlevnad.

Den lägsta exponeringskoncentrationen i den här studien var 3nM (1,04 µg/l) vilket kan jämföras med de koncentrationer av fluoxetin som finns uppmätta i ytvatten i Kanada på 0,099 µg/l (Metcalf *et al.*, 2003). Kronisk exponering av moskifisk för fluoxetin påverkade utvecklingen av yttre könskaraktärer men då vid 3-4 gånger högre koncentration än de som finns uppmätta i miljön (Henry and Black, 2008).

Den här studien visar ingen signifikant skillnad i vikt, längd, överlevnad, könskvot eller tid till metamorfos mellan kontrollgruppen och grupperna exponerade för 3 och 30 nM fluoxetin hos *Xenopus tropicalis*. I pilotstudien (EPAs hemsida: Henry, 2005) visades försämrad balans och sämre simbeteende hos *Xenopus laevis* vid exponering för 50 µg/l fluoxetin. Hos moskitfisk exponerats för fluoxetin visades inga signifikanta skillnader i tillväxt eller morfologi men ökad passivitet observerades vilket tyder på att exponering för fluoxetin leder till beteendeförändringar (Henry and Black, 2008). Ökade halter av serotonin i hjärnan på *Oncorhynchus mykiss* (regnbågsforell) resulterade i ett undergivet beteende (Overli *et al.*, 2004). En studie på blåhuvad snultra (*Thalassoma bifasciatum*) har resulterat i att reproduktionsbeteendet påverkats då fluoxetin injicerats och resulterat i att hanar konkurrerar mindre (Perreault *et al.*, 2003). Då hanliga råttor administrerats fluoxetin minskade deras motivation till reproduktion (Gouvea *et al.*, 2008). Det går alltså inte utesluta påverkan av fluoxetin hos *Xenopus tropicalis* i den här studien då varken reproduktionsförmåga eller beteendeförändringar har studerats.

### 4.3 Gonadutveckling

Då honornas ovarier jämfördes med hanarnas testiklar inom kontrollgruppen sågs att honornas ovarier var signifikant längre. Då längden på gonader för båda könen i alla grupper jämfördes visades att grupperna exponerade för fluoxetin 30 nM eller EE<sub>2</sub> hade längre gonader än kontrollgruppen. Gruppen EE<sub>2</sub> hade längre gonader då de endast bestod av honor. Då könsfördelningen inte skiljde sig mellan kontrollgruppen och de fluoxetinexponerade grupperna kan man inte dra slutsatsen att också gruppen fluoxetin 30 nM hade längre gonader på grund av ökad andel honor. Inhibering av serotonin syntes under könsdifferentieringen hos *Tilapia (Oreochromis mossambicus)* leder till minskad andel hanar, vilket tyder på att serotonin är viktigt för testikeldifferentiering (Tsai *et al.*, 2000). Eftersom exponering för fluoxetin leder till ökad halt serotonin så är det möjligt att testikelutvecklingen blir påverkad. Det var dock ingen signifikant skillnad i testikellängd mellan kontrollgruppen och de fluoxetinexponerade grupperna i den här studien.

### 4.4 Vattenkvalité och uppmätta halter

De höga nitritvärdena verkar inte ha haft negativ effekt på överlevnaden då EE<sub>2</sub>B som hade högst nitrithalt också hade lägst dödlighet. Halterna av fluoxetin som uppmätts stämmer bra överens med de nominella värdena.

#### 4.5 Metodutveckling

I kommande projekt är det önskvärt att använda genomflödessystem för att minska den mänskliga faktorns påverkan vid byte av vatten och tillsättning av substans. Eftersom påverkan på tyreoidsystemet inte alltid ger effekter förrän senare i utvecklingen är det intressant att studera om det finns påverkan vid könsmognad. Då studier på hanliga råttor som administrerats fluoxetin resulterade i minskad motivation till reproduktion (Gouvea *et al.*, 2008) skulle det vara intressant att studera reproduktionseffekter hos *Xenopus tropicalis* efter exponering för fluoxetin. På grund av tidsbrist könsbestämdes endast ca 15 individer histologiskt per replikat men i ett annat försök skulle ett högre antal könsbestämningar ge mer information och möjligen resultera i tydligare skillnader i t.ex. testikellängd jämfört med kontrollen.

Då grodor exponeras för fluoxetin förväntas högre halter av serotonin i hjärnan. Ökade halter av serotonin i hjärnan har resulterat i beteendeförändringar och förändrat reproduktionsbeteende på bland annat amfibier, fisk och råttor. I framtida projekt är det intressant att studera beteende och halten serotonin i hjärnan på grund av tidigare nämnda studier.

#### 4.6 Slutsatser

- Resultaten från den här studien visar inte några histologiska förändringar på tyreoida hos *Xenopus tropicalis* vilket tyder på att tyreoidfunktionen inte påverkades av 3 nM och 30 nM fluoxetin eller 100 nM Etinylöstradiol.
- Den här studien visar att fluoxetinkoncentrationer upp till 30 nM inte påverkar vikt, längd, överlevnad, könskvot eller tid till metamorfos hos *Xenopus tropicalis*. Det tyder på att fluoxetin i miljön inte är akut toxiskt för vilda grodor.
- Det går inte utesluta att fluoxetin har påverkat *Xenopus tropicalis* i den här studien då varken reproduktionsförmåga eller beteendeförändringar har studerats. Ytterligare studier krävs för att undersöka beteendeförändringar och ökade halter serotonin i hjärnan då yngel av *Xenopus tropicalis* exponeras för fluoxetin.

## Referenser

### Artiklar:

- Brooks B W, Foran C M, Richards S M, Weston J, Turner P K, Stanley J K, Solomon K R, Slattery M and La Point T W 2003 Aquatic ecotoxicology of fluoxetine *Toxicol Lett* **142** 169-83
- Carey C and Bryant C J 1995 Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations *Environ Health Perspect* **103 Suppl 4** 13-7
- Carlsson G and Norrgren L 2007 The impact of the goitrogen 6-propylthiouracil (PTU) on West-African clawed frog (*Xenopus tropicalis*) exposed during metamorphosis *Aquat Toxicol* **82** 55-62
- Colborn T 2002 Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption *Environ Health Perspect* **110 Suppl 3** 363-7
- Denver R J, Pavgi S and Shi Y B 1997 Thyroid hormone-dependent gene expression program for *Xenopus* neural development *J Biol Chem* **272** 8179-88
- Duellman William E L T 1994 *Biology of amphibians* (Baltimore: The Johns Hopkins Press Ltd. London)
- Escobar G M d 2004 Role of thyroid hormone during early brain development *European Journal of Endocrinology* **151**
- Foran C M, Weston J, Slattery M, Brooks B W and Huggett D B 2004 Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure *Archives of environmental contamination and toxicology* **46** 511-7
- Fort D J, Thomas J H, Rogers R L, Noll A, Spaulding C D, Guiney P D and Weeks J A 2004 Evaluation of the developmental and reproductive toxicity of methoxychlor using an anuran (*Xenopus tropicalis*) chronic exposure model *Toxicol Sci* **81** 443-53
- Golstein J, Schreiber S, Velkeniers B and Vanhaelst L 1983 Effect of fluoxetine, a serotonin reuptake inhibitor, on the pituitary-thyroid axis in rat *Eur J Pharmacol* **91** 239-43
- Gouvea T S, Morimoto H K, de Faria M J, Moreira E G and Gerardin D C 2008 Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice *Pharmacology, biochemistry, and behavior*
- Guillette L J, Jr., Gross T S, Masson G R, Matter J M, Percival H F and Woodward A R 1994 Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida *Environ Health Perspect* **102** 680-8
- Hayes T B 1997a Hormonal Mechanisms as Potential Constraints on Evolution: Examples from the Anura *American Zoologist* **37** 482-90
- Hayes T B 1997 b Steroids as Potential Modulators of Thyroid Hormone Activity in Anuran Metamorphosis *American Zoologist* **37** 185-94
- Hayes T B, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart A A and Vonk A 2002 Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** 5476-80
- Henry T B and Black M C 2008 Acute and chronic toxicity of fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitor) in Western mosquitofish *Archives of environmental contamination and toxicology* **54** 325-30
- Jobling S, Coey S, Whitmore J G, Kime D E, Van Look K J, McAllister B G, Beresford N, Henshaw A C, Brighty G, Tyler C R and Sumpter J P 2002 Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility *Biol Reprod* **67** 515-24

- Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M, Tyler C R, van Aerle R, Santos E and Brighty G 2006 Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations *Environ Health Perspect* **114 Suppl 1** 32-9
- Khokha M K, Chung C, Bustamante E L, Gaw L W, Trott K A, Yeh J, Lim N, Lin J C, Taverner N, Amaya E, Papalopulu N, Smith J C, Zorn A M, Harland R M and Grammer T C 2002 Techniques and probes for the study of *Xenopus tropicalis* development *Dev Dyn* **225** 499-510
- Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, Thurman E M, Zaugg S D, Barber L B and Buxton H T 2002 Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance *Environ Sci Technol* **36** 1202-11
- Metcalf C D, Miao X S, Koenig B G and Struger J 2003 Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **22** 2881-9
- Mitsuma T, Kayama M, Yokoi Y, Rhue N, Izumi M, Takatsu S, Adachi K, Hirooka Y and Nogimori T 1996 Effects of serotonin on the release of thyrotropin-releasing hormone from the rat retina in vitro *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung* **28** 220-2
- Nentwig G 2007 Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine *Archives of environmental contamination and toxicology* **52** 163-70
- Nieuwkoop P, Faber J 1956 Normal Table of *Xenopus laevis* North Holland Publishing, Amsterdam
- Opitz R, Hartmann S, Blank T, Braunbeck T, Lutz I and Kloas W 2006 Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles *Toxicol Sci* **90** 337-48
- Overli O, Korzan W J, Larson E T, Winberg S, Lepage O, Pottinger T G, Renner K J and Summers C H 2004 Behavioral and neuroendocrine correlates of displaced aggression in trout *Hormones and behavior* **45** 324-9
- Perreault H A, Semsar K and Godwin J 2003 Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish *Physiology & behavior* **79** 719-24
- Pettersson I, Arukwe A, Lundstedt-Enkel K, Mortensen A S and Berg C 2006 Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol *Aquat Toxicol* **79** 356-65
- Pettersson I and Berg C 2007 Environmentally relevant concentrations of ethynylestradiol cause female-biased sex ratios in *Xenopus tropicalis* and *Rana temporaria* *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* **26** 1005-9
- Robertson J C and Kelley D B 1996 Thyroid hormone controls the onset of androgen sensitivity in the developing larynx of *Xenopus laevis* *Dev Biol* **176** 108-23
- Stuart S N, Chanson J S, Cox N A, Young B E, Rodrigues A S, Fischman D L and Waller R W 2004 Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide *Science* **306** 1783-6
- Takase M and Iguchi T 2007 Molecular cloning of two isoforms of *Xenopus (Silurana) tropicalis* estrogen receptor mRNA and their expression during development *Biochim Biophys Acta* **1769** 172-81
- Tsai C L, Wang L H, Chang C F and Kao C C 2000 Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus* *J Neuroendocrinol* **12** 894-8

## Nätsidor:

EPAs hemsida: Henry, T. B. and M. C. Black

[Endocrine effects of selective serotonin reuptake inhibitors \(SSRIs\) on aquatic organisms  
http://es.epa.gov/ncer/publications/workshop/8-23-2005/Black\\_355\\_d1.pdf](http://es.epa.gov/ncer/publications/workshop/8-23-2005/Black_355_d1.pdf)

Fass hemsida, a: <http://www.fass.se>, 2008-02-05, kl 13:27

Sökväg; fluoxetin – fluoxetin BMM Pharma

Fass hemsida, b: <http://www.fass.se>, 2008-02-07, kl 13:22

Sökväg; miljöinformation – alfabetiskt på läkemedel – fluoxetin

Fass hemsida, c : <http://www.fass.se>, 2008-02-05, kl 10:13

Sökväg; läkarbok - läkemedel & hälsa - miljöinformation – miljöinformation på FASS - läkemedel och miljö

Naturvårdsverkets hemsida: <http://www.naturvardsverket.se>, 2008-02-04, kl 15:08

Sökväg; sök- läkemedelsrester i avloppsvatten

Svenskt vatten: <http://www.svensktvatten.se>, 2008-02-04, kl 14:55

Sökväg; avlopp- aktuellt-2008-01-04 effekter av läkemedelsrester i avloppsvatten

