
PhD THESIS SUMMARY

In vitro evaluation of hormonal activity of some selective serotonin reuptake inhibitors

PhD candidate: **Diana Lupu**

Scientific supervisor: Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
LITERATURE REVIEW	15
1. Depression	17
1.1. Prevalence of depression	18
1.2. Neurobiology of depression	19
1.3. Treatment of depression	19
2. Selective serotonin reuptake inhibitors	23
2.1. Pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of SSRIs	23
2.2. Safety of SSRI use during pregnancy	26
2.2.1. Clinical and epidemiological studies	26
2.2.1.1. Effects on fertility	27
2.2.1.2. Pregnancy outcomes	27
2.2.1.3. Teratogenicity	27
2.2.1.4. Neonatal and developmental problems	27
2.2.2. Preclinical studies on reproductive and behavioural outcomes	28
2.3. (Neuro)endocrine disruptive effects of SSRIs	30
3. Endocrine disruptors	33
3.1. Definition, mode of action and test methods	33
3.2. Signalling pathways affected by EDCs	34
3.2.1. Estrogen signalling through nuclear ER α and ER β	35
3.2.2. Androgen signalling through nuclear AR	37
PERSONAL CONTRIBUTION	38
1. Thesis aims	41
2. Study 1. <i>In silico</i> predictions for SSRIs binding to nuclear estrogen and androgen receptors	43
2.1. Introduction	43
2.2. Materials and methods	44
2.2.1. The proteins and chemical structures	44
2.2.2. Study design/overview	46
2.3. Results	47
2.4. Discussion	51
2.5. Conclusion	53
3. Study 2. <i>In vitro</i> evaluation of hormonal effects of selected SSRIs	55
3.1. Introduction	55
3.2. Materials and methods	57

3.2.1.Cell cultures	57
3.2.2.Cell viability assays	58
3.2.3.Reporter gene assays	58
3.2.4.MCF-7 proliferation assay	59
3.2.5.H295R steroidogenesis assay	59
3.2.6.LC-MS/MS measurements of steroid hormones	59
3.2.7.Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	60
3.2.8.Statistical analysis	61
3.3.Results	61
3.3.1.Cell viability assays	61
3.3.2.Reporter gene assays	65
3.3.2.1.Estrogen responsive cell lines	65
3.3.2.1.1.T47D-Kbluc	65
3.3.2.1.2.HELN-ER α and HELN-ER β	68
3.3.2.2.Androgen responsive cell lines	70
3.3.2.2.1.MDA-kb2	70
3.3.2.2.2.AIZ-AR	72
3.3.3.MCF-7 proliferation assays	73
3.3.4.H295R steroidogenesis assay	75
3.4.Discussion	77
3.5.Conclusions	84
3.Study 3. <i>In vitro</i> evaluation of fluoxetine effects on the differentiation of dopaminergic neurons	85
4.1.Introduction	85
4.2.Materials and methods	87
4.2.1.Culture and maintenance of neural progenitor cells	87
4.2.2.Differentiation of NPCs to midbrain precursor neurons	87
4.2.3.Quantitative Real-Time PCR (qPCR) analysis	87
4.2.4.Statistical analysis	88
4.3.Results	89
4.3.1.The differentiation process from NPCs to mDPCs	89
4.3.2.ER expression levels in WT mDPCs and BERKO differentiation	92
4.4.Discussion	97
4.5.Conclusion	98
5.General discussion	99
6.General conclusions	101
7.Originality and innovative contributions of the thesis	103
REFERENCES	105

KEYWORDS: Selective serotonin reuptake inhibitors, Fluoxetine, Norfluoxetine, Sertraline, Paroxetine, Endocrine disruptors, Molecular docking, Estrogen receptors, Androgen receptors, Luciferase, Cell proliferation, Steroidogenesis, Dopaminergic neurons, Gene expression

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO), depressive disorders affect over 300 million people worldwide and are currently the leading cause of disability. The prevalence estimates for depressive disorders vary significantly and consistently with gender, depression being approximately twice more prevalent in women than in men. Women are mostly affected during the childbearing years and at menopause, specifically during time periods that are marked by large and rapid fluctuations in hormonal status. Antenatal and postnatal depression is especially problematic because of the increased risks for adverse outcomes in children and, therefore, is increasingly treated with antidepressant medications.

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are antidepressant drugs prescribed as the first pharmacotherapeutic option to treat depression during pregnancy and post-partum, although there is insufficient evidence to document their effectiveness and safety in these contexts. Because these drugs are highly lipophilic, they can cross the placental barrier and are also excreted into breast milk, thus reaching the fetus and infant during critical developmental stages. Epidemiological studies regarding perinatal SSRI exposure and adverse outcomes in offspring provide evidence for risks of fetal malformations, short gestational length and low birth weight, persistent pulmonary hypertension and some neurodevelopmental disorders such as autism. Endocrine disruptive effects in children exposed *in utero* have received less attention thus far, although there is emerging evidence of reproductive and/or (neuro)endocrine toxicity of SSRIs.

Encompassing developmental exposures in the evaluation of chemicals with potential endocrine disruptive properties was recently underlined by the WHO as a key concern, due to the fact that the most vulnerable exposure period is during tissue development and that the effects induced by early exposures may be permanent and often not evident until at later life stages. Yet, long-term studies on the safety of developmental exposures to SSRIs are lacking in spite of emerging literature on endocrine disruptive effects of these drugs.

Two of the most studied components of the endocrine system that are affected by endocrine disrupting chemicals (EDCs) are the estrogen and androgen signalling networks, which play crucial roles during fetal growth and development, including the sexual differentiation of the brain and the development and differentiation of reproductive and non-reproductive organs. Preclinical studies on rodents and aquatic organisms suggest that SSRIs can disrupt estrogen and/or androgen signalling pathways, altering the (neuro)endocrine regulation of steroidogenesis and

gametogenesis, the expression levels of steroid hormone receptors and affecting the sexual differentiation of the brain, sexual behaviour and reproductive parameters in animals exposed perinatally.

The current thesis combined *in silico* and *in vitro* assays to screen for hormonal effects of SSRIs. All the compounds of the SSRI class and their main metabolites were initially screened *in silico* to predict binding affinities for nuclear estrogen and androgen receptors, using a combination of molecular docking and machine learning. Based on those results, four compounds were selected for further testing *in vitro*, to assess estrogen and androgen dependent transcriptional activation, cell proliferation of estrogen receptor positive cells and effects on steroidogenesis. In a last step, the thesis included a study on the effect of fluoxetine, the most prescribed and well-studied SSRI, on the neural development of an estrogen sensitive brain structure.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. *In silico* predictions for SSRIs binding to nuclear estrogen and androgen receptors

Introduction

Molecular docking is a useful *in silico* tool for predicting interactions between a chemical entity and a biological molecule (e.g. a protein). Since there is evidence to suggest interactions between SSRIs and nuclear estrogen (ER) and androgen receptors (AR), we aimed to predict the binding affinity of these molecules and their main metabolites to the aforementioned steroid nuclear receptors. In the present study we used a molecular docking approach combined with a machine learning approach to detect potential interactions between SSRIs (and their main metabolites) and the nuclear ER and AR proteins.

Materials and methods

The X-ray structures of ER α , ER β and AR used for docking were downloaded from the “A Database of Useful Decoys – Enhanced” database and the ER and AR ligands dataset were downloaded from The Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB). SSRIs and both active and inactive compounds from the EDKB ER and AR datasets were prepared for docking using the default settings of LigPrep tool and the protein structures were prepared using the Protein Preparation Wizard. Docking was performed using the default settings of the Schrödinger Glide SP (Single Precision) tool. The outputs of the docking runs were imported into the Konstanz Information Miner to train Random Forest models. Using these models trained on the individual scoring terms for both ER isoforms and the AR, predictions were made for the SSRI compounds of interest.

Results

The output of the machine learning process which included the information available from the docking studies gave a good indication of potential binders for ERs and AR, alongside with an objective number on the confidence of these predictions. The identified potential binders for ER α were fluoxetine, paroxetine and one of its main metabolites R-citalopram, and the two demethylated metabolites thereof. Potential ER β ligands were also identified among the evaluated SSRIs: fluoxetine, the paroxetine metabolites, S-citalopram and R-citalopram, and two demethylated metabolites thereof. Finally, the predicted AR ligands were sertraline, paroxetine, N-acetyl fluvoxamine acid (fluvoxamine metabolite) and R-desmethylcitalopram (R-citalopram metabolite).

Conclusions

Based on the results from molecular docking predictions combined with a machine learning algorithm, four compounds were selected for further *in vitro* testing: fluoxetine, predicted as ligand for ER α and ER β , but not AR; norfluoxetine, predicted as non-binder for all three receptors; paroxetine, predicted as binder for ER α and AR, but not ER β ; and sertraline, predicted as AR ligand, but not for ER α and ER β .

Study 2. *In vitro* evaluation of hormonal effects of selected SSRIs

Introduction

Endocrine disruptors can interfere with estradiol and testosterone signalling in multiple ways, including at the level of hormone synthesis and receptor activation/inhibition. In the current study we employed *in vitro* ER and AR receptor transactivation assays, MCF-7 proliferation assays and H295R steroidogenesis assays in an attempt to identify potential mechanisms through which selected SSRIs (fluoxetine, norfluoxetine, paroxetine and sertraline) can interfere with the human endocrine system.

Materials and methods

ER and AR transactivation assays were performed using human cell lines expressing nuclear ERs (T47D-Kbluc, HELN-ER α and HELN-ER β) or ARs (MDA-Kb2, AIZ-AR) either naturally or after transfection of the gene encoding the receptor of interest. All cell lines employed for receptor transactivation assays were stably transfected with a luciferase reporter gene, the expression of which is under the control of the ER or AR receptors. The MCF-7 proliferation assay is based on estrogen-dependent proliferation of ER positive breast cancer cells and was performed using a resazurin-based assay after exposure to fluoxetine and norfluoxetine. The H295R steroidogenesis assay was used to evaluate the effect of fluoxetine on estrogen and testosterone levels *in vitro*. The two hormones were quantified in culture medium using LC-MS/MS and the expression of CYP19A1 was quantified in cell lysates using qPCR.

Results

In the T47D-Kbluc system, fluoxetine, norfluoxetine and sertraline induced weak, but significant ER-dependent transcriptional effects and, at the highest concentrations tested, inhibited the signal induced by estradiol. At low submicromolar concentrations norfluoxetine, sertraline and paroxetine caused weak increases in the signal induced by estradiol. Neither fluoxetine, nor its metabolite induced significant changes in ER α -dependent or ER β -dependent transcription in HELN cells, either alone or in binary mixtures with estradiol. In the MDA-Kb2 system none of the selected SSRIs were able to induce significant AR-dependent luciferase activity, but at submicromolar concentrations all compounds increased the signal induced by dihydrotestosterone. Neither fluoxetine, nor its metabolite induced significant changes in AR-dependent transcriptional activity in AIZ-AR cells, either alone or in binary mixtures with testosterone.

Both fluoxetine and norfluoxetine significantly decreased MCF-7 cell proliferation in the low micromolar range, either alone or in the presence of estradiol and fluoxetine increased estradiol levels in H295R culture medium, with no effect on CYP19A1 expression.

Conclusions

The tested SSRIs have the ability to interfere with ER and AR-mediated transcription *in vitro*, depending on concentration and cellular context. Fluoxetine and norfluoxetine decrease the proliferation of ER-positive cancer cells and fluoxetine increases estradiol levels *in vitro*. These results suggest SSRIs are potential endocrine disruptors and should be further examined in the context of developmental exposures.

Study 3. *In vitro* evaluation of fluoxetine effects on the differentiation of dopaminergic neurons

Introduction

As recent studies suggest an association between prenatal fluoxetine exposure and autism in children, this study aimed to investigate if fluoxetine affects processes involved in midbrain dopaminergic neuronal differentiation, as a possible source of abnormal dopaminergic neurotransmission in autism, possibly via interference with the estrogen system.

Materials and methods

We employed a cell model where neuronal precursors (wild-type (WT) and estrogen receptor β knock-out (BERKO)) were differentiated to midbrain dopaminergic precursor cells (mDPCs) and concomitantly exposed to therapeutically relevant fluoxetine concentrations. Using qPCR, the dopaminergic progenitors were then evaluated for differentiation and stemness markers, as well as expression of nuclear ERs.

Results

The first set of analysed genes consisted of transcription factors essential for ventral midbrain patterning and mDPC specification. We observed a significant increase in the expression of the early regional specification markers Orthodenticle homeobox 2 (*Otx2*) and Homeobox engrailed-1 and 2 (*En1* and *En2*) by fluoxetine treatment in WT cells. Consistently, expression of NK2 homeobox 2 (*Nkx2.2*), which is negatively regulated by *Otx2*, was decreased upon fluoxetine treatment. The second set of analysed genes consisted of two transcription factors essential for mDA neurogenesis, LIM Homeobox transcription factor 1 alpha (*Lmx1a*) and Paired-like homeodomain transcription factor 3 (*Pitx3*). The expression of these genes was significantly down-regulated by fluoxetine treatment in WT cells. Finally, we assessed if fluoxetine affects the expression of the stemness marker Nestin (*Nes*) and the neuronal differentiation marker β 3-tubulin (*Tubb3*) in WT mDPCs. We found that *Nes* expression was significantly increased upon fluoxetine exposure and *Tubb3* was significantly decreased. Both ER α and ER β were significantly down-regulated in WT cells after fluoxetine treatment.

Similarly, fluoxetine had no or even opposite effects in BERKO cells on the genes involved in mDPC specification (*Otx2*, *Nkx2.2*, *En1*, and *En2*), the stemness markers *Nes* and the neural differentiation marker *Tubb3*. In the absence of ER β , fluoxetine showed similar effects on the neurogenesis factors *Pitx3* and *Lmx1a*, decreasing their expression even further compared to WT treatments.

Conclusions

Fluoxetine affects differentiation of dopaminergic neurons, possibly via interference with the nuclear ERs. The observed effects suggest that fluoxetine increases induction of dopaminergic precursors at the expenses of differentiation to serotonergic neurons, yet decreases the maturation of dopaminergic neurons. Further studies are needed to link these molecular events to development of the dopaminergic system and address if these findings could partly underlie the association between prenatal fluoxetine exposure and increased autism risk in children.

General conclusions

The studies included in the present thesis lead to the following conclusions:

1. Certain SSRIs and metabolites are predicted to bind ERs and ARs and influence the gene transcription mediated by these receptors *in vitro*, depending on concentration and cellular context.
2. Fluoxetine and norfluoxetine can reduce the proliferation of ER positive cancer cells *in vitro*, suggesting that SSRI treatment may be safe for depressed patients with hormone dependent cancers.
3. Fluoxetine can increase estradiol levels *in vitro* at nanomolar concentrations, suggesting that a careful monitoring of steroid levels is needed in patients treated

with SSRIs and calls for *in vivo* and clinical data on hormone levels in newborns from SSRI treated mothers.

4. Fluoxetine affects the differentiation of dopaminergic neurons *in vitro*, possibly via interference with the nuclear ERs. The observed effects suggest that fluoxetine increases induction of dopaminergic precursors at the expenses of differentiation to serotonergic neurons, yet decreases the maturation of dopaminergic neurons.
5. An integrated testing approach is needed to reveal potential endocrine disruptors prior to animal testing and *in vitro* systems relevant for developmental exposures should be included in initial testing strategies.

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Evaluarea in vitro a activității hormonale a unor inhibitori selectivi de recaptare a serotoninei

Student doctorand: **Diana Lupu**

Conducător doctorat: Prof.dr. **Felicia Loghin**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Depresia	17
1.1. Prevalența depresiei	18
1.2. Neurobiologia depresiei	19
1.3. Tratatamentul depresiei	19
2. Inhibitorii selectivi de recaptare a serotoninei	23
2.1. Profilele farmacodinamice și farmacocinetice ale ISRS	23
2.2. Siguranța utilizării ISRS în sarcină	26
2.2.1. Studii clinice și epidemiologice	26
2.2.1.1. Efecte asupra fertilității	27
2.2.1.2. Consecințe asupra sarcinii	27
2.2.1.3. Teratogenitate	27
2.2.1.4. Probleme neonatale și de dezvoltare	27
2.2.2. Studii preclinice asupra efectelor reproductive și comportamentale	28
2.3. Efecte de perturbare (neuro)endocrină ale ISRS	30
3. Perturbatori endocrinieni	33
3.1. Definiție, mod de acțiune și metode de testare	33
3.2. Căi de semnalizare afectate de PE	34
3.2.1. Semnalizarea estrogenică prin receptorii nucleari ER α și ER β	35
3.2.2. Semnalizarea androgenică prin receptorii nucleari AR	37
CONTRIBUȚII PERSONALE	38
1. Obiectivele tezei	41
2. Studiul 1. Predicții <i>in silico</i> pentru legarea ISRS de receptorii nucleari estrogenici și androgenici	43
2.1. Introducere	43
2.2. Materiale și metode	44
2.2.1. Structurile proteinelor și ale substanțelor chimice	44
2.2.2. Design-ul studiului	46
2.3. Rezultate	47
2.4. Discuții	51
2.5. Concluzii	53
3. Studiul 2. Evaluarea <i>in vitro</i> a efectelor hormonale ale ISRS	55
3.1. Introducere	55
3.2. Materiale și metode	57

12 Evaluarea in vitro a activității hormonale a unor inhibitori selectivi de recaptare a serotoninei

3.2.1.Culturi celulare	57
3.2.2.Teste de viabilitate celulară	58
3.2.3.Teste cu gene raportoare	58
3.2.4.Testul de proliferare celulară MCF-7	59
3.2.5.Testul de steroidogeneză H295R	59
3.2.6.Cuantificarea LC-MS/MS a hormonilor steroizi	59
3.2.7.Reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real	60
3.2.8.Analiza statistică	61
3.3.Rezultate	61
3.3.1.Teste de viabilitate celulară	61
3.3.2.Teste cu gene raportoare	65
3.3.2.1.Linii celulare sensibile la estrogeni	65
3.3.2.1.1.T47D-Kbluc	65
3.3.2.1.2.HELN-ER α și HELN-ER β	68
3.3.2.2.Linii celulare sensibile la androgeni	70
3.3.2.2.1.MDA-kb2	70
3.3.2.2.2.AIZ-AR	72
3.3.3.Testul de proliferare celulară MCF-7	73
3.3.4.Testul de steroidogeneză H295R	75
3.4.Discuții	77
3.5.Concluzii	84

3.Study 3.Evaluarea *in vitro* a efectelor fluoxetinei asupra diferențierii neuronilor dopaminergici

4.1.Introducere	85
4.2.Materiale și metode	87
4.2.1.Cultura progenitorilor neurali	87
4.2.2.Diferențierea PN la precursori neuronali mezencefalici	87
4.2.3.Reacția de polimerizare în lanț cu detecție în timp real	87
4.2.4.Analiza statistică	88
4.3.Rezultate	89
4.3.1.Procesul de diferențiere de la PN la PNM	89
4.3.2. Expresia ER în WT PNM și diferențierea celulelor BERKO	92
4.4.Discuții	97
4.5.Concluzii	98

5.Discuții generale

6.Concluzii generale

7.Originalitatea și aspectele inovatoare ale tezei

BIBLIOGRAFIE

CUVINTE CHEIE: Inhibitori selectivi de recaptare a serotoninei, Fluoxetina, Norfluoxetina, Sertralina, Paroxetina, Perturbatori endocrinieni, Andocare moleculară, Receptori estrogenici, Receptori androgenici, Luciferaza, Proliferare celulară, Steroidogeneza, Neuroni dopaminergici, Expresie genică

INTRODUCERE

Potrivit Organizației Mondiale a Sănătății (OMS), tulburările depresive afectează peste 300 de milioane de oameni din întreaga lume și sunt în prezent principala cauză de dizabilitate. Estimările prevalenței pentru tulburările depresive variază semnificativ în funcție de sex, depresia fiind de aproximativ două ori mai prevalentă la femei decât la bărbați. Femeile sunt afectate mai ales în timpul perioadei fertile și la menopauză, adică în special în perioadele care sunt marcate de fluctuații mari și rapide ale stării hormonale. Depresia antenatală și postnatală este deosebit de problematică din cauza riscului crescut de apariție a reacțiilor adverse la copii și, prin urmare, este tratată din ce în ce mai mult cu medicamente antidepressive.

Inhibitorii selectivi ai recaptării serotoninei (ISRS) sunt medicamente antidepressive prescrise ca prima opțiune farmacoterapeutică pentru tratarea depresiei în timpul sarcinii și post-partum, deși nu există dovezi suficiente pentru a evidenția eficiența și siguranța acestora în aceste contexte. Deoarece aceste medicamente sunt foarte lipofile, ele pot traversa bariera placentară și sunt, de asemenea, excretate în laptele matern, ajungând astfel la făt și copil în timpul stadiilor critice de dezvoltare. Studiile epidemiologice privind expunerea perinatală la ISRS și efectele adverse asupra descendenților oferă dovezi cu privire la un risc crescut al unor malformații, perioada gestațională scurtă și greutatea scăzută la naștere, hipertensiunea pulmonară persistentă și unele tulburări de neurodezvoltare cum ar fi autismul. Până în prezent, efectele de perturbare endocrină la copiii expuși in utero au fost mai puțin studiate, deși există dovezi emergente privind toxicitatea asupra reproducerii și/sau (neuro)endocrină a ISRS.

Examinarea efectelor asupra dezvoltării în cadrul evaluării substanțelor chimice cu potențiale proprietăți perturbatoare endocrine a fost recent subliniată de OMS ca o preocupare majoră, datorită faptului că perioada de expunere cea mai vulnerabilă este în timpul dezvoltării țesuturilor și că efectele induse de expunerile precoce pot fi permanente și adesea evidente doar în etapele ulterioare de viață. Cu toate acestea, studiile pe termen lung privind siguranța expunerii la ISRS în timpul dezvoltării lipsesc, în ciuda literaturii emergente privind efectele perturbatoare endocrinene ale acestor medicamente.

Două dintre cele mai studiate componente ale sistemului endocrin care sunt afectate de perturbatorii endocrinieni (PE) sunt rețelele de semnalizare estrogenică și androgenică, acestea având roluri esențiale în timpul creșterii și dezvoltării fetale, incluzând diferențierea sexuală a creierului și dezvoltarea și diferențierea organelor de reproducere. Studiile preclinice pe rozătoare și organisme acvatice sugerează că ISRS

pot perturba căile de semnalizare estrogenice și/sau androgenice, modificând reglarea (neuro)endocrină a steroidogenezei și gametogenezei, nivelurile de expresie a receptorilor hormonilor steroizi și afectând diferențierea sexuală a creierului, comportamentul sexual și parametrii reproductivi la animalele expuse perinatal.

Teza actuală combină teste *in silico* și *in vitro* pentru a examina efectele hormonale ale ISRS. Toți compușii din clasa ISRS și principalii lor metaboliți au fost inițial examinați *in silico* pentru a prezice afinitățile de legare de receptorii estrogenici (RE) și receptorii androgenici (RA) nucleari, utilizând o combinație de andocare moleculară și învățare automatizată. Pe baza acestor rezultate, patru compuși au fost selectați pentru testare suplimentară *in vitro*, în scopul evaluării activării transcripției genice dependentă de estrogeni și androgeni, a proliferării celulelor ce exprimă RE și a efectelor asupra steroidogenezei. Într-o ultimă etapă, teza a inclus un studiu privind efectul fluoxetinei, cel mai prescris și bine studiat ISRS, asupra dezvoltării neuronale a unei structuri cerebrale sensibile la estradiol.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Studiul 1. Predicții *in silico* pentru legarea ISRS de receptorii nucleari estrogenici și androgenici

Introducere

Andocarea moleculară este un instrument *in silico* util pentru prezicerea interacțiunilor dintre o entitate chimică și o moleculă biologică (de exemplu o proteină). Deoarece există dovezi care sugerează interacțiuni între ISRS și RE sau RA, acest studiu a avut ca scop predicția afinității de legare a acestor compuși și a principalilor lor metaboliți de receptorii steroizi nucleari menționați anterior. În studiul de față am folosit o abordare ce combină andocarea moleculară cu învățarea automatizată, pentru a detecta potențiale interacțiuni între ISRS (și principalii lor metaboliți) și receptorii estrogenici și androgenici nucleari.

Materiale și metode

Structurile RE α , RE β și RA (determinate prin difracție cu raze X) utilizate pentru andocare au fost descărcate din baza de date "A Database of Useful Decoys-Enhanced",

iar setul de date privind liganzii RE și RA a fost descărcat din baza de date The Endocrine Disruptor Knowledge Base (EDKB). Atât ISRS cât și compușii activi și inactivi din seturile de date EDKB RE și RA au fost pregătiți pentru andocare folosind setările implicite ale instrumentului LigPrep, iar structurile proteice au fost pregătite folosind Instrumental Protein Preparation Wizard. Andocarea a fost efectuată utilizând setările implicite ale instrumentului Schrödinger Glide SP (Single Precision). Rezultatele testelor de andocare au fost importate în Constanz Information Miner pentru a instrui modele Random Forest. Folosind aceste modele antrenate pe termenii

individuali de andocare pentru izoformele RE și pentru RA, s-au făcut predicții pentru compușii ISRS de interes.

Rezultate

Rezultatul procesului învățare automatizată, care a inclus informațiile disponibile din studiile de andocare, a oferit o bună indicație a potențialilor liganzi pentru RE și RA, alături de un scor obiectiv privind încrederea acestor predicții. Potențialii liganzi identificați pentru RE α au fost fluoxetina, paroxetina și unul dintre principalii săi metaboliți, R-citalopram și cei doi metaboliți demetilați ai acestora. Potențiali liganzi ai RE β au fost, de asemenea, identificați: fluoxetină, metaboliții paroxetinei, S-citalopram și R-citalopram și doi metaboliți demetilați ai acestora. În final, potențialii liganzii ai RA au fost sertralina, paroxetina, acidul N-acetil fluvoxaminic (metabolit al fluvoxaminei) și R-desmetilcitalopramul (metabolit al R-citalopramului).

Concluzii

Pe baza rezultatelor din asocierea predicțiilor de andocare cu un algoritm de învățare automatizată, patru compuși au fost selectați pentru teste *in vitro*: fluoxetina, prezisă ca ligand pentru RE α și RE β , dar nu RA; norfluoxetina, prezisă ca non-ligand pentru toți cei trei receptori; paroxetina, prezisă ca ligand pentru RE α și RA, dar nu RE β ; și sertralina, prezisă ca ligand RA, dar nu pentru RE α și RE β .

Studiul 2. Evaluarea *in vitro* a efectelor hormonale ale ISRS

Introducere

Perturbatorii endocrinieni pot interfera cu semnalizarea estradiolului și a testosteronului în mai multe moduri, inclusiv la nivelul sintezei hormonilor și al activării/inhibării receptorilor. În studiul actual am utilizat teste de transactivare a receptorilor RE și RA *in vitro*, teste de proliferare MCF-7 și teste de steroidogeneză H295R, în scopul identificării unor mecanisme potențiale prin care ISRS selecționate (fluoxetină, norfluoxetină, paroxetină și sertralina) pot interfera cu sistemul endocrin uman.

Materiale si metode

Au fost efectuate teste de transactivare RE și RA utilizând linii celulare umane care exprimă RE nucleari (T47D-Kbluc, HELN-ER α și HELN-ER β) sau RA (MDA-Kb2, AIZ-AR) fie natural, fie după transfecția genei care codifică receptorul de interes. Toate liniile celulare utilizate pentru testele de transactivare a receptorilor au fost transfectate stabil cu gena raportoare a luciferazei, a cărei exprimare este sub controlul receptorilor RE sau RA. Testul de proliferare a celulelor MCF-7 se bazează pe proliferarea dependentă de estrogen a celulelor canceroase de sân pozitive pentru RE și s-a efectuat utilizând un test bazat pe resazurină după expunerea la fluoxetină și norfluoxetină. Testul de steroidogeneză H295R a fost utilizat pentru a evalua efectul fluoxetinei asupra nivelurilor de estrogen și testosteron *in vitro*. Cei doi hormoni au

fost cuantificați în mediul de cultură utilizând LC-MS/MS,, iar expresia CYP19A1 a fost cuantificată în lizatele celulare utilizând qPCR.

Rezultate

În sistemul T47D-Kbluc, fluoxetina, norfluoxetina și sertralina au indus efecte transcripționale slabe, dar semnificative ale RE și, la cele mai ridicate concentrații testate, au inhibat semnalul indus de estradiol. La concentrații submicromolare mici, norfluoxetina, sertralina și paroxetina au provocat o creștere ușoară a semnalului indus de estradiol. Nici fluoxetina, nici metabolitul său nu au indus modificări semnificative în transcripția dependentă de RE α sau RE β în celulele HELN, fie singure, fie în amestecuri binare cu estradiol. În sistemul MDA-Kb2, nici unul dintre ISRS selectați nu a putut să inducă o activitate semnificativă a luciferazei dependentă de RA, dar la concentrații submicromolare toți compușii au crescut semnalul indus de dihidrotestosteron. Nici fluoxetina, nici metabolitul său nu au indus modificări semnificative în activitatea transcripțională dependentă de RA în celulele AIZ-AR, fie singure, fie în amestecuri binare cu testosteron.

Atât fluoxetina, cât și norfluoxetina au redus semnificativ proliferarea celulelor MCF-7 la concentrații micromolare, fie singure, fie în prezența estradiolului, iar fluoxetina a indus creșteri ale nivelurilor de estradiol în mediul de cultură H295R, fără niciun efect asupra expresiei CYP19A1.

Concluzii

Compușii ISRS testați au capacitatea de a interfera cu transcripția genică mediată de RE și RA *in vitro*, în funcție de concentrație și de contextul celular. Fluoxetina și norfluoxetina scad proliferarea celulelor canceroase pozitive pentru RE, iar fluoxetina crește nivelul de estradiol *in vitro*. Aceste rezultate sugerează că ISRS sunt potențiali perturbatori endocrinieni și ar trebui examinați în continuare în contextul expunerilor din perioada de dezvoltare.

Studiul 3. Evaluarea *in vitro* a efectelor fluoxetinei asupra diferențierii neuronilor dopaminergici

Introducere

Deoarece studiile recente sugerează o asociere între expunerea prenatală la fluoxetină și riscul crescut de autism la copii, acest studiu a urmărit să investigheze dacă fluoxetina afectează procesul de diferențiere a neuronilor dopaminergici mezencefalici, ca o posibilă sursă a neurotransmisiei dopaminergice anormale în autism, posibil prin interferență cu sistemul estrogenic.

Materiale si metode

S-a folosit un model celular în care precursorii neuronali (wild-type (WT) și cu receptorul estrogenic β knocked-out (BERKO)) au fost diferențiați la precursorii neuronali dopaminergici mezencefalici (PNDm) și expuși concomitent la concentrații de fluoxetină relevante din punct de vedere terapeutic. Folosind qPCR, progenitorii

dopaminergici au fost apoi evaluați pentru markeri de caracter sușă și de diferențiere, precum și pentru nivelul de exprimare al RE.

Rezultate

Primul set de gene analizate a constat din factori de transcripție esențiali pentru modelarea ventrală a mezencefalului și specificația PNDm. Am observat o creștere semnificativă a expresiei markerilor de specificare regională Orthodenticle homeobox 2 (Otx2) și Homeobox engrailed-1 și 2 (En1 și En2) după tratamentul cu fluoxetină în celulele WT. În concordanță cu acest rezultat, expresia proteinei homeobox NK2 (Nkx2.2), care este reglată negativ de Otx2, a scăzut după tratamentul cu fluoxetină. Cel de-al doilea set de gene analizate a constat din doi factori de transcripție esențiali pentru neurogeneza dopaminergică, factorul de transcripție LIM homeobox 1 alpha (Lmx1a) și factorul de transcripție homeodomain 3 (Pitx3). Expresia acestor gene a fost semnificativ scăzută în urma tratamentului cu fluoxetină în celulele WT. În cele din urmă, am evaluat dacă fluoxetina afectează exprimarea markerului de sușă Nestina (Nes) și markerul de diferențiere neuronală β 3-tubulină (Tubb3) în celulele PNDm WT. S-a observat că expresia Nes a crescut semnificativ după expunerea la fluoxetină, iar Tubb3 a scăzut semnificativ. Expresia RE α și a RE β a fost diminuată semnificativ în celulele WT după tratamentul cu fluoxetină.

În mod similar, fluoxetina nu a avut efecte sau a avut efecte opuse în celulele BERKO asupra genelor implicate în specificația PNDm (Otx2, Nkx2.2, En1 și En2), a markerului de sușă Nes și a markerului de diferențiere neuronală Tubb3. În absența RE β , fluoxetina a prezentat efecte similare asupra factorilor de neurogeneză Pitx3 și Lmx1a, scăzând și mai mult expresia acestora comparativ cu tratamentele în celulele WT.

Concluzii

Fluoxetina afectează diferențierea neuronilor dopaminergici, posibil prin interferență cu RE nucleari. Efectele observate sugerează că fluoxetina crește inducția precursorilor dopaminergici în detrimentul diferențierii neuronilor serotoninergici, dar scade maturarea neuronilor dopaminergici. Sunt necesare studii suplimentare pentru a lega aceste evenimente moleculare de dezvoltarea sistemului dopaminergic și pentru a evalua dacă aceste efecte ar putea fi implicate în asocierea dintre expunerea prenatală la fluoxetină și riscul crescut de autism la copii.

Concluzii generale

Studiile incluse în prezenta teză conduc la următoarele concluzii:

1. Se estimează că anumite ISRS și metaboliți sunt liganzi pentru RE și RA și influențează transcripția genetică mediată de acești receptori *in vitro*, în funcție de concentrație și de contextul celular.
2. Fluoxetina și norfluoxetina pot reduce proliferarea celulelor canceroase pozitive pentru RE *in vitro*, sugerând că tratamentul cu ISRS poate fi sigur pentru pacienții cu tulburări depresive care au cancer hormon-dependente.

18 Evaluarea in vitro a activității hormonale a unor inhibitori selectivi de recaptare a serotoninei

3. Fluoxetina poate crește concentrațiile de estradiol *in vitro* la concentrații nanomolare, ceea ce sugerează că este necesară o monitorizare atentă a nivelului de steroizi la pacienții tratați cu ISRS și subliniază importanța obținerii unor date *in vivo* și clinice privind nivelurile hormonale la nou-născuții mamelor tratate cu ISRS.
4. Fluoxetina afectează diferențierea neuronilor dopaminergici *in vitro*, posibil prin interferența cu RE nucleari. Efectele observate sugerează că fluoxetina crește inducerea precursorilor dopaminergici în detrimentul diferențierii neuronilor serotoninergici, dar scade maturarea neuronilor dopaminergici.
5. Este necesară o abordare de testare integrată pentru a descoperi potențiali perturbatori endocrinieni înainte de testarea pe animale, iar sistemele *in vitro* relevante pentru expunerea în perioada dezvoltării ar trebui incluse în strategiile inițiale de testare.