
Summary of the Doctoral Thesis

In vitro and in vivo interactions between potential endocrine disruptors

PhD Student **Anca POP**

Scientific supervisors **Felicia Loghin/Luminita Silaghi-Dumitrescu**



TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
REVIEW OF THE LITERATURE	15
1. Endocrine disruptors	17
2. BHA, BHT, PG and BP: exposure and ED effects	19
2.1. Butylated hydroxyanisole (BHA)	19
2.2. Butylated hydroxytoluene (BHT)	25
2.3. Propyl gallate (PG)	28
2.4. Parabens	30
PERSONAL CONTRIBUTIONS	34
1. Aims	36
2. Methodology	36
3. In vitro evaluation of BHA, BHT, PG and BP	38
3.1. Introduction	38
3.2. Aims	39
3.3. Materials and methods	39
3.4. Results	43
3.5. Discussion	46
3.6. Conclusions	48
4. The effect of BHA, BHT, PG and BP on intracellular calcium signals in pancreatic beta-cells	50
4.1. Introduction	50
4.2. Aims	52
4.3. Materials and methods	52
4.4. Results	57
4.5. Discussion	64

4.6.Conclusions	65
5. In vivo evaluation of BHA, BHT, PG and BP	67
5.1.Introduction	67
5.2.Aim	67
5.3.Materials and methods	67
5.4.Results	69
5.5.Discussion	80
5.6.Conclusions	82
6. In vitro evaluation of binary mixtures	83
6.1.Introduction	83
6.2.Aim	83
6.3.Materials and methods	84
6.4.Results	91
6.5.Discussion	100
6.6.Conclusions	101
7. In vivo evaluation of binary mixtures	102
7.1.Introduction	102
7.2.Aim	102
7.3.Materials and methods	102
7.4.Results	104
7.5.Discussion	118
7.6.Conclusions	119
8. General conclusions	121
10. Originality of the thesis	123
REFERENCES	125

Introduction

The family of EDCs includes a wide array of substances, such as pharmaceutical compounds, pesticides, plastic manufacturing chemicals, detergents, heavy metals, preservatives from cosmetics, antioxidants, phytoestrogens. EDCs are being incriminated of diminishing the quality/quantity of sperm, increasing the incidence of testicular, prostate and breast cancer, cryptorchidism, hypospadias and endometriosis but also of inducing some neurological, immune or metabolic diseases.

EDCs are distributed globally, most of them being persistent. Some of them, although not persistent, should be treated as so because of their chronic use.

These hormone-like compounds should be considered as second players that can regulate or alter the body functions through multiple pathways.

The global objectives of the project are as follows: 1) Evaluation of the estrogenic/antiestrogenic (E/AE) activity of the individual compounds (BHA, BHT, PG, BP) by *in vitro* assays (evaluation of ER mediated effects); 2) Evaluation of the E/AE activity of binary mixtures of the selected compounds *in vitro* as an attempt to identify any possible interactions (additivity, synergism, antagonism); 3) Evaluation of the E activity of the individual compounds on ER beta from the beta pancreatic cells 4) Evaluation of the E/AE activity of the individual compounds using rat uterotrophic assay 5) Evaluation of binary mixtures of the selected compounds as an attempt to identify any possible interactions 6) Evaluation and comparison of findings from the *in vitro* and *in vivo* studies; comparison of the endocrine disruptive potential of different agents, mixtures; the evaluation of the potential negative impact of these compounds alone or as mixtures in humans.

Aims

The project aims to bring new insights regarding the potential negative impact of human exposure to selected potential EDCs alone and, more important, as mixtures, having in mind that humans are exposed inevitably on a daily basis to multiple xenobiotics from this large group of chemicals, all of them contributing to the whole estrogenic body burden. The results can be of great value in the field of toxicology as they allow a better understanding and a correct estimation of the hazardous effects which could result from simultaneous exposure to relatively small concentrations of different xenobiotics. Given the great number of foods, cosmetics or pharmaceuticals in which they are included, and the fact that they are used on a daily basis, we can consider simultaneous exposure to different mixtures of BHA, BHT, PG and/or parabens (BP) almost inevitable.

***In vitro* evaluation of BHA, BHT, PG and BP**

Aim

The aim of this study was to characterize the potential estrogenic and/or antiestrogenic effect of BHA, BHT, PG and BP.

Since the global aim of the thesis is to investigate the interaction between these possible endocrine disruptors, it is impossible designing mixtures without a clear image of what these compounds are capable of in T47DKB-luc cell line.

Results and discussion

A first observation regarding the viability, is that when the toxicity of compound-estradiol (100 pM) mixture was tested, the E₂ turned out to prevent the cells from the toxic effect of high concentrations of compounds. This protective effect was suggested in other research papers.

The range of concentrations the compounds were tested for endocrine disrupting effects are comparable to the ones reported in other *in vitro* assays.

BHA was reported to have an estrogenic effect, but the present study using the same range of concentrations like ter Veld et al. found no estrogenic activity for BHA. Lowest effect concentration for BHA in ER α in ter Veld was 6 μ M and 8 μ M in ER β , but the maximal effect obtained was not higher than 19%, (18.3% in case of ER α , 15.6% in case of ER β). Also, the mixture BHA + E₂ was not found to have an additive effect even though E₂ was also used at the same level of concentration as ter Veld et al. IC₅₀ calculated in this present study was higher than the concentrations tested by the above research group; this could explain the fact that the antiestrogenic effect was not observed. To our knowledge, this is the first time when the *in vitro* antiestrogenic effect is reported for BHA.

BHT is the only compound tested in the present study that did not have any effect.

As mentioned before, *in vitro* studies published by Adamasi et al. showed that PG is one of the strongest ligands among the xenochemicals that are known as ER α binders (at 54 nM), but without inducing any transactivation activity at the concentrations tested, suggesting that PG is a pure antagonist. The present study supports the antiestrogenic effect of PG, but the concentration needed to inhibit the E₂ effect (at 100 pM) is in micromolar range, which means that for a concentration of 10⁻¹⁰ M E₂ it was needed a concentration of PG around 10⁻⁵M. Even if this research supports the mentioned effect, the results from Adamasi et al. present PG as a more potent antagonist than it was found using T47DKB-luc cell line, for 10⁻⁶M of E₂ a concentration of 10⁻⁷M PG being needed to decrease the E₂ signal.

In the present study PG exhibited an estrogenic effect around 30-100 μ M, but the maximum effect was found to represent only 40% from E₂ max at 60 μ M, 28% from E₂ max at 30 μ M and at 100 μ M the signal decreased at 12.5% from E₂ max. The discrepancy with our results could be due to the over expression of the estrogen receptors in the U2-OS transfected cell line.

The mixture PG and E₂ was found to be additive, contrary to our results.

BP gave maximal effect around 10 μ M in the present research; this concentration also gave the maximal effect on cell proliferation assay. Above this concentration, there is still an estrogenic effect, but it decreases in intensity. The maximum BP response was at 10 μ M (144% from E₂ max). The response decreased after 10 μ M at 115%, 51% and 17% from E₂ for 30, 60 and 100 μ M respectively. As this cell line is not free of other endogenous steroid receptors, interactions between

the estrogen receptors, androgen receptors and maybe, even the progesterone receptors should be considered when trying to explain the fact that the maximum response from BP is higher compared to E₂ max. Besides this, the superagonism could be explained by the BP potential modulation of the activity of several kinases involved in ERE activation, but for this mechanism molecular studies are needed, and this is beyond the scope of the thesis.

Conclusions

BP was found out, as expected, to have an estrogenic effect, but also an antiestrogenic effect at a concentration 3 times higher than the one that gave the maximal effect.

BHA and PG were found to have only antiestrogenic effects. None of the compound-E₂ mixtures had additive effects.

The effect of BHA, BHT, PG and BP on intracellular calcium signals in pancreatic beta-cells

Aim

The aim of this study was to investigate whether BHT, BHA, BP and PG, which may have estrogenic or anti-estrogenic activity, have any effect on beta-cells function.

Results and discussion

After incubating the islets for 30 mins with a solution of 10 nM concentration of each compound, changes in the frequency of oscillations, area under curve of oscillations, and area under the curve and amplitude of first peak were monitored.

BHA, BHT and BP increased the frequency of the oscillations when compared to control. However, our results indicate that calcium influx was decreased for all three compounds. This result could be linked to a reduction on the glucose-induced insulin secretion.

BP was the only compound that had a reduced area under the first peak, which can be translated as a smaller influx of calcium and a possible reduction of the first phase insulin secretion.

PG had no effect on any of the studied parameters when testing 10 nM concentrations.

When testing concentrations of 1 nM of BHA, BHT effects were observed for area under the curve and the amplitude of the first peak. None of the chemicals interfered with the frequency of the oscillations.

Although the frequency was not affected, the calcium influx was decreased for BHA and BHT. Even though calcium is a general indicator of insulin release, when the area under the curve presents changes when compared to control, this could indicate that the insulin secretion is affected. To confirm this hypothesis, an insulin release assay should be performed.

1 nm BHT concentration had an effect on the amplitude of the first peak, this meaning that the first phase of glucose-induced insulin might be affected.

BP and PG had no effect on any of the studied parameters at 1 nM concentration.

From all the 4 compounds studied, BHT turned out to be the most potent with calcium imaging. The interesting fact about BHT is that it had no effect when tested *in vitro* for estrogenic/antiestrogenic effects using as a mechanism the interaction with the estrogen receptors.

BHA, an antiestrogenic compound with T47DKBluc was found to be less potent than BHT, but affecting the same parameters in the same way. Even if BP is a confirmed as an estrogenic compound, its effects on beta-cells appear to be exactly the opposite of estradiol's (at a concentration of 10 nM) and the same as BHT and BHA.

Since pancreas is an organ expressing ER α and ER β , a speculation that there might be an interaction between the mentioned compounds and the receptors could be made. GPR30 could also be involved. Even if, classically, the compounds might have a low binding affinity to the receptors, they could act through a non-classical pathway.

Conclusions

Except for PG, all the other chemicals affected the calcium influx inside the beta-cells (BHA, BHT and BP at 10 nM concentration and BHA and BHT at 1 nM concentration) and this might lead to a decreased of glucose-induced insulin secretion.

BHA, BHT and BP at 10 nM, respectively BHA and BHT at 1 nM affected both stages of glucose-induced insulin secretion, they interfered with the amplitude and area of the first peak (linked to the first phase of secretion), but also with the area under the oscillations (linked to the second phase of secretion).

A possible interaction with the estrogen receptors expressed in the beta-cells can occur; the compounds could act through a non-classical pathway.

As mentioned above, an insulin secretion assay should be performed to confirm the results obtained by calcium measurements.

***In vivo* evaluation of BHA, BHT, PG and BP**

Aim

The aim of this study was to assess the effects of BHA, BHT, PG and BHT at two different concentrations, one representing 3xNOAEL and the other one representing the NOEAL (NOEL for BP) for each compound on genital female tract using the immature rat uterotrophic assay.

The observed effects will be useful when designing and interpreting the results from binary mixtures.

Results and discussion

When using the uterotrophic assay for the screening of the estrogenic properties of different compounds, changes in uterine weight are generally considered to be one of the best indicators. Based on our results (lowered uterine weight) -BHA, BHT and PG treated groups can be considered to behave differently regarding the uterine weight as compared the 17- β estradiol treated group.

BHA was proven to be a compound that induced underdevelopment of the reproductive system of male and female rats with the change of T4 and testosterone levels, sex organ weights and sexual maturation. The thyroid hormonal system regulates the metabolism in most tissues, growth and maturity of reproductive system. Thus, altered thyroid hormone levels can lead to

underdevelopment of the reproductive system. Past studies report other experimental protocols in which different compounds altered the thyroid function, and by that, reduced the ovarian and uterine weight.

Furthermore, low levels of thyroid hormones are reported to decrease the late uterine response which occurs 24 hours after the last estradiol dose. Given the fact that all experimental animals groups were euthanized 24 hours after the last treatment, this could explain the minimal increase of the stromal and uterine thickness that was revealed following the morphometric analysis.

Estrogenic and androgenic functions may not be altered if hypothyroidism is induced during fetal or adult life, but if hypothyroidism appears during the early neonatal phase till weanling, a delay in sexual maturation, impaired accessory reproduction tract development, reduced gonadotrophins and inhibition of steroidogenesis could be observed.

Conclusions

From the data gathered during the experiment, it is assumed that most probably the thyroid function is affected by all compounds, this leading to the decrease of the uterine weight. The histopathological and the morphometric analysis would suggest a minimal estrogenic effect for BHA, BHT and BP that might be explained by the time of exposure, developing period, and also by the low levels of thyroid hormones, that would decrease the effects of this estrogenic stimulation.

For the first time, we present evidences of the “antiestrogenic” effects of BHA, BHT and PG at two levels of concentrations, explained by the impaired thyroid function. Also, BHA, BHT, and BP exhibit a small estrogenic effect observed after the histopathological and morphometric analysis.

***In vitro* evaluation of binary mixtures**

Aim

An important part of this thesis is to assess the cumulative risk to public health due to the exposure of the population to endocrine disrupting compounds through the diet. Besides the mixtures compound-compound it is necessary to study the effects of mixtures with estradiol at different concentrations, since the levels of hormones are not the same throughout the time.

The results can prove of great value in the field of toxicology as they will allow a better understanding and a correct estimation of the hazardous effects which could result due to simultaneous exposure to relatively small concentrations of different xenobiotics.

Results and discussion

Our hypothesis was that the effects of binary mixtures (BHA+PG, BHA+BP, BP+PG, E₂+BHA, E₂+PG, E₂+BP) would be simply additive.

BHA+BP is a mixture between an estrogenic and an antiestrogenic compound; none of the two models were able to predict the response. Both mathematical models (concentration addition - CA) underestimate the response of the BP in mixture.

There is no doubt that a weak estrogenic compound, like BP combined with 17β -estradiol is able to contribute to the estrogenic mixture effect; our data demonstrated clearly that the combined effect of BP and 17β -estradiol was additive ($p=0.960$). Our results support the already published data on additive effect of parabens and estradiol.

BHA+PG is a mixture between a compound with both estrogenic and antiestrogenic properties and an antiestrogenic chemical. The experimental graph shows the estrogenic properties of PG (when BHA is not present), this effect decreasing while BHA concentrations are increased. None of the two models are close to the real situation.

BP+PG is also a mixture between an estrogenic and an antiestrogenic compound. The mathematical models do not predict the total behavior of the mixture, but our B model was able to predict the response on a small range of concentrations. Model A it was not found to predict the behavior of the mixture even when a smaller range of concentrations were analyzed.

PG+E₂ mixture was reported in the literature to have an additive response, but none of our CA models were able to predict this kind of behavior; however, both models were able to predict the behavior of mixtures from 90-100 ($p=0.350$, $p=0.140$). There is no significant difference between the two models used ($p=0.404$).

BHA +E₂ was another mixture found to have an additive effect, but in the present study none of the models were able to predict its behavior; however, for some mixtures tested, the mathematical model A was able to predict the response.

The present results support the idea, already accepted in the literature, that the estrogenic chemicals act in an additive manner, while for the other mixtures (antiestrogens + estrogenic chemicals) the CA model was not able to predict the effects or it had a limited use. A possible explanation could be that not all the chemicals present in the mixture may induce the effect chosen for as an endpoint. However, the behavior of some mixtures (AE+E) was correlated with the mathematical models, but only for some concentration range.

These types of mixtures (AE+E) differ from the estrogenic ones, so maybe in terms of design the chosen model should be rethought.

The interpretation and extrapolation of the *in vitro* results for real-life situations have some limitations and some aspects that should be taken into consideration. The composition of the mixture does not cover all possibilities that can occur in human plasma. It can also be questioned to which extent the concentrations in the medium are a realistic reflection of the plasma concentrations, as the bioavailability *in vivo* might be less than *in vitro* due to differences in protein levels and free available concentrations and kinetics characteristics of these compounds. Another aspect to be considered is that *in vitro* system ignores possible non-genomic pathways resulting in endocrine disruptive effects, steroidogenesis, metabolism and kinetics of these compounds

Conclusions

The present study proved that the behavior of a mixture could be partially anticipated.

By observing the behavior of the two models it is recommended to conduct the experiments in a linear concentration range, but it is also worth testing a wider domain of concentrations, if that is relevant for the actual exposure.

***In vivo* evaluation of binary mixtures**

Aim

The aim of this study is to investigate the possible interactions between the compounds of interest using a system that mimics the real situation.

Results and discussion

The changes in the weight of thyroid gland were minor; also, four out of six mixtures presented a smaller reduction in the uterine weight (not statistically significant) compared with the situation in which the components in the mixture were tested alone at the dose used in the mixture. The uterine weight was affected in only one case, animals treated with PG+BP presenting a decrease of this parameter.

Regarding the histopathological analysis, only one group from treated rats had a normal uterine morphology, BHT+BP.

All the animals that received BHA in mixture presented histopathological changes in all reproductive segments. Even if these changes were milder than the ones observed at 3xNOAEL, they were evident. Two mixtures of PG (PG+BHT, PG+BP) presented changes in the morphology: in case of PG+BHT a minimal glandular hyperplasia, while for PG+BP a minimal stromal edema was revealed.

In terms of morphometric analysis, significant increase were observed in case of stromal thickness and wall uterine thickness (as a result of the stromal edema) and in one case, a significant decrease of BP+PG of the endometrial epithelial thickness.

Stromal thickness, in case of exposure to BHA+BHT presented a significant response compared to control and each individual response, the data indicating a synergic action. As a consequence of this increase, the uterine wall thickness was significantly different when compared to control and individual responses.

The same situation as above occurred in case of the exposure to BHA+PG; however, the endometrial stromal increase could be considered as an additive response, rather than a synergic one.

BHA+PG treated animals presented an increase of stromal thickness, but it was not statistically significant when compared to control.

In case of BHT+PG, the mixture was approximately as “estrogenic” as the most potent compound in the mixture for stromal thickness, but together with an increase in myometrial height, the overall thickness of the uterine wall was significantly increased when compared to control.

BP+PG presented a decrease in the endometrial epithelium thickness that was not significantly different from control, but from BP individual exposure. The stromal edema and the uterine thickness were statistically significant when compared to control.

As concluded from the present results, the mixtures effect on the thyroid were milder than the effect of individual exposure, most probably this being the reason for the decrease, but not in a statistically significant manner, of the uterine weight. As a consequence of this, the estrogenic properties of the tested compounds were more visible in terms of morphometric analysis and histopathological examination. If while testing NOAEL, glandular hyperplasia in the uterus (a result

from the exposure to estrogenic compounds) appeared only in BHA treated animals, in case of mixture exposure, it was observed also in BHT+PG treated group.

Conclusions

The milder effect on thyroid gland allowed the estrogenic properties of the studied compounds to be more visible in terms of morphometric and histopathological analysis.

The simple addition of the observed activities for the chemicals from some mixtures was confirmed here to overestimate the actual effect induced by mixture while in other cases it underestimated the effect.

General conclusions

The studied compounds were discovered to interfere with the endocrine system through more than just one mechanism.

Except for PG, all the other compounds were discovered to affect the first and the second phase of glucose stimulated insulin, the question raised on this issue being whether it may fall into the diabetic risk factors category during chronic exposure.

Even though *in vitro* studies presented the BHA and PG as antiestrogenic chemicals, when studies were performed using developing organisms the compounds acted as estrogenic compounds.

The *in vivo* studies revealed a potential thyroid disruptive effect, all the compounds presenting an increase in the thyroid gland weight and a lowered uterine weight.

When trying to predict the behavior of the compounds in mixtures, the additive model was useful only in case of designing a mixture with estrogenic chemicals. For mixtures estradiol-antiestrogenic compounds, the response was predicted only for a part of the designed mixtures. Concentration addition model was not able to predict the binary mixtures effect of the combined studied compounds in the absence of estradiol.

The *in vivo* studies using binary mixtures revealed a milder effect on the thyroid gland. Some of the morphometric parameters appeared to have increased in a synergic way, while for others the opposite reaction happened. With the results from *in vivo* studies it can be supported the idea that indeed, in some situations, a mixture effect appears (two compounds that tested individually do not reveal any significant effect, when tested in mixture they are able to act in a way that induce a statistically significant response).

Teză de Doctorat

Interactiuni *in vitro* si *in vivo*
intre compusi cu potential
perturbator endocrinian

Doctorand **Anca POP**

Conducatori stiintifici **Felicia Loghin/Luminita Silaghi-Dumitrescu**



CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII	15
1. Perturbatorii endocrinieni	17
2. BHA, BHT, PG si BP: expunere si efecte perturbatoare endocriniene	19
2.1. Butilhidroxianisol (BHA)	19
2.2. Butilhidroxitoluen (BHT)	25
2.3. Galat de propil (PG)	28
2.4. Parabenii	30
CONTRIBUTII PERSONALE	34
1. Obiective	36
2. Metodologie	36
3. Evaluarea in vitro a BHA, BHT, PG si BP	38
3.1. Introducere	38
3.2. Obiective	39
3.3. Materiale si metoda	39
3.4. Rezultate	43
3.5. Discutii	46
3.6. Concluzii	48
4. Efectele BHA, BHT, PG si BP asupra oscilatiilor de calciu din celulele beta pancreatice	50
4.1. Introducere	50
4.2. Obiective	52
4.3. Materiale si metoda	52
4.4. Rezultate	57
4.5. Discutii	64

4.6.Concluzii	65
5. Evaluarea in vivo a BHA, BHT, PG si BP	67
5.1.Introducere	67
5.2.Obiective	67
5.3.Materiale si metoda	67
5.4.Rezultate	69
5.5.Discutii	80
5.6.Concluzii	82
6. Evaluarea in vitro a amestecurilor binare intre compusii studiat	83
6.1.Introducere	83
6.2.Obiective	83
6.3.Materiale si metoda	84
6.4.Rezultate	91
6.5.Discutii	100
6.6.Concluzii	101
7. Evaluarea in vivo a amestecurile binare intre compusii studiat	102
7.1.Introducere	102
7.2.Obiective	102
7.3.Materiale si metoda	102
7.4.Rezultate	104
7.5.Discutii	118
7.6.Concluzii	119
8. Concluzii generale	121
10. Originalitatea tezei	123
REFERINTE	125

Introducere

Grupul perturbatorilor endocrinieni include o gama largă de compuși precum substanțe farmaceutice, pesticide, agenți plastifianți, detergenți, metale grele, agenți conservanți din produse cosmetice, antioxidanți, fitoestrogeni. Perturbatorii endocrinieni sunt incriminați în diminuarea cantității și calității spermei, creșterea incidenței cancerelor de testicular, de prostată și de sân, criptorhidism, hipospadias și endometrioza, având de asemenea capacitatea de a induce unele tulburări neurologice, boli imune și metabolice.

Perturbatorii endocrinieni sunt răspândiți pe întreg globul, majoritatea fiind persistenți. Datorită expunerii/utilizării cronice, compușii care nu sunt persistenți trebuie însă tratați ca și cei cu remanența mare.

Aceste substanțe cu activitate hormonală au capacitatea de a modifica funcționarea organismelor prin diverse mecanisme.

Obiectivele principale ale acestui proiect sunt următoarele: 1) Evaluarea activității estrogenice/antiestrogenice (E/AE) a compușilor individuali (BHA, BHT, PG, BP) prin testare in vitro (evaluarea efectelor mediate de receptorii estrogenici nucleari) 2) Evaluarea activității E/AE a unor amestecuri binare ale compușilor selectați in vitro, în încercarea de a identifica posibile interacțiuni (aditivitate, sinergism, antagonism) 3) Evaluarea activității estrogenice a compușilor individuali asupra ER beta din celulele pancreatice beta 4) Evaluarea activității E/AE a compușilor individuali prin testul uterotrofic la șobolan 5) Evaluarea unor amestecuri binare ale compușilor in vivo, în încercarea de a identifica posibile interacțiuni 6) Evaluarea și compararea datelor experimentale rezultate în urma studiilor in vitro și in vivo; compararea potențialului perturbator endocrinian al compușilor siguri și în amestecuri; evaluarea potențialului impact negativ pe care acești compuși (siguri sau în amestecuri) ar putea să-l aibă asupra oamenilor.

Obiective

Proiectul ofera noi perspective asupra potențialului impact negativ al expunerii umane la anumiți perturbatori endocrinieni individual, și mai important, în amestecuri, luând în considerare faptul că oamenii sunt inevitabil expuși zilnic la diverse xenobiotice din acest grup de substanțe, toate având o contribuție la încărcătura estrogenică a organismului. Rezultatele pot să aibă o mare însemnătate pentru domeniul toxicologiei, întrucât facilitează o mai bună înțelegere și o estimare corectă a efectelor detrimentale care pot să apară în urma expunerii simultane la diferite xenobiotice, în concentrații relativ mici. Dat fiind numărul mare de alimente, produse cosmetice și farmaceutice în care acești compuși sunt prezenți, precum și faptul că aceste produse sunt utilizate zilnic, putem considera că expunerea simultană la diverse amestecuri de BHA, BHT, PG și/sau parabeni este aproape inevitabilă.

Evaluarea in vitro a BHA, BHT, PG și BP

Obiectiv

Obiectivul acestui studiu a fost reprezentat de caracterizarea potențialului efect estrogenic și/sau antiestrogenic al BHA, BHT, PG și BP.

Deoarece scopul principal al tezei este de a investiga interacțiunile dintre acești potențiali perturbatori endocrinieni, design-ul amestecurilor este imposibil de realizat fără a avea o imagine clară asupra comportamentului acestor compuși pe linia celulară T47DKB-luc.

Rezultate si discutii

O primă observație legată de viabilitatea celulară este aceea că, în momentul testării toxicității amestecurilor de compus-estradiol (100 pM), E2 s-a dovedit a avea un efect protector față de efectul toxic indus de compuși la concentrații mari. Acest efect protector a fost sugerat și în alte publicații.

Domeniile de concentrații ale compușilor testați pentru efecte de tip perturbator endocrinian sunt comparabile cu cele utilizate în alte teste in vitro.

BHA a fost descris anterior ca având capacitatea de a induce efecte estrogenice, însă utilizând același domeniu de concentrații ca și ter Veld et al., în acest studiu nu a fost observată o activitate estrogenică a BHA. În studiul realizat de ter Veld et al., concentrația de BHA care a indus cel mai mic efect semnificativ a fost 6 uM pe ER α și 8 uM pe ER β , însă efectul maximal obținut nu a fost mai mare de 19% (18.3% pentru ER α , 15,6% pentru ER β). De asemenea, amestecul de BHA+E2 nu a sugerat un efect aditiv între cei doi compuși, cu toate că E2 a fost utilizat la același nivel de concentrație ca și în studiul realizat de ter Veld et al. IC₅₀ calculat în studiul de față a avut o valoare mai mare comparativ cu cea raportată de ter Veld et al., ceea ce ar putea explica faptul că în acel studiu nu a fost observat un efect antiestrogenic pentru BHA. Studiul nostru raportează pentru întâia oară efectul antiestrogenic in vitro al BHA.

BHT este singurul compus testat care nu a evidențiat nici un efect in vitro.

Alte studii in vitro publicate de Adamsi et al au arătat că PG este unul dintre cei mai potenți liganzi xenobiotici cunoscuți ca liganzi ER α (la 54 nM), dar lipsiți de capacitatea de a activa receptorii ER la concentrațiile testate, sugerând faptul că PG este un antagonist pur. Studiul de față confirmă efectul antiestrogenic al PG, însă concentrația necesară pentru a inhiba efectul estradiolului (100 pM) se află în domeniul micromolar, ceea ce înseamnă că pentru o concentrație de 10⁻¹⁰ M E₂ a fost necesară o concentrație de PG de aproximativ 10⁻⁵ M. Cu toate că aceste cercetări confirmă antagonismul menționat, rezultatele publicate de Adamsi et al. prezintă propel-galatul ca fiind un antagonist mai potent decât ceea ce s-a observat pe linia celulară T47DKB-luc (pentru o concentrație de 10⁻⁶ M de E₂ a fost necesară o concentrație de 10⁻⁷ M PG pentru a diminua semnalul estradiolului).

În studiul de față, PG a indus un efect estrogenic la concentrații între 30 și 100 uM, însă efectul maxim a reprezentat doar 40% din efectul maxim al E2 la 60 uM, 28% din efectul maxim al E2 la 30 uM și 12.8% din efectul maxim al E2 la 100 uM. Discrepanța dintre rezultatele noastre și

cele publicate anterior ar putea fi datorate supra-exprsiei receptorilor estrogenici în linia celulară U2-OS.

Contrar rezultatelor noastre, testarea amestecului de PG și E2 a condus la concluzia că efectele celor doi compuși sunt aditive.

BP a avut un efect maximal la aproximativ 10 uM în studiul de față. Această concentrație a Indus un efect maxim și în cazul testului de proliferare celulară. Peste această concentrație se mai observă efect estrogenic, însă scade ca intensitate. Răspunsul maxim al BP s-a observat la 10 uM (144% din E2 maxim). Răspunsul a scăzut în intensitate la 115%, 51% și 17% din E2 maxim, la 30, 60 și respective 100 uM. Deoarece această linie celulară nu este lipsită de alți receptori steroizi endogeni, interacțiunile între receptorii estrogenici, androgenici și poate chiar progesteronici ar trebui luate în considerare pentru a explica faptul că răspunsul maxim pentru BP este mai mare comparativ cu răspunsul maxim al estradiolului. În plus, acest superagonism ar putea fi explicat și prin capacitatea BP de a modula activitatea unor kinaze implicate în activarea ERE, însă pentru a evalua acest mecanism sunt necesare alte studii moleculare, iar aceasta depășește scopul lucrării de față.

Concluzii

BP a demonstrat proprietăți estrogenice, dar și antiestrogenice la o concentrație de 3 ori mai mare decât cea care a produs efectul maximal la testarea individual.

BHA și PG au Indus doar efete estrogenice. Nici unul dintre amestecurile de compuși cu estradiolul nu au rezultat într-un efect aditiv.

Pe baza acestor rezultate, amestecuri binare de compuși și amestecuri binare ale compușilor cu estradiolul pot fi testate pentru a depista efecte additive sau singergice, precum și antagonism între compuși.

Efectul BHA, BHT, PG și BP asupra semnalizării intracelulare a calciului, în celule beta pancreatice

Obiectiv

Scopul acestui studiu a fost de a investiga efectele BHT, BHA, BP și PG asupra funcției celulelor beta pancreatice

Rezultate si discutii

După o incubare timp de 30 minute a insulelor pancreatice cu o soluție de 10 nM a fiecărui compus testat, au fost înregistrate modificări în frecvența oscilațiilor, aria de sub curbă a oscilațiilor și amplitudinea primului pic.

BHA, BHT și BP au crescut frecvența oscilațiilor comparativ cu martorul. Cu toate acestea, rezultatele noastre indică faptul că influxul de calciu a scăzut în prezența celor trei compuși, acest fapt putând fi corelat cu o diminuare a secreției de insulină indusă de glucoză.

BP a fost singurul compus care a avut aria de sub primul pic redusă, ceea ce se poate traduce printr-un influx mai mic de calciu și o potențială reducere a secreției de insulină în faza I.

PG nu a avut nici un efect asupra parametrilor studiați, la concentrația de 10 nM.

La concentrații de 1nM BHA și BHT au dus la modificări ale amplitudinii și arie de sub curba. Nici una dintre substanțe nu a afectat frecvența oscilațiilor.

Cu toate că frecvența nu a fost afectată, influxul de calciu a fost diminuat în cazul BHA și BHT. Deși calciul este un indicator general al eliberării de insulină, atunci când aria de sub curbă prezintă modificări comparativ cu martorul, aceasta indică faptul că secreția de insulină e afectată. Pentru a confirma această ipoteză, trebuie efectuat un test asupra eliberării de insulină.

1 nM BHT a avut un efect asupra amplitudinii primului pic, ceea ce înseamnă că ar putea fi afectată faza I de secreție a insulinei indusă de glucoză.

BP și PG nu au avut vreun efect asupra parametrilor studiați la concentrația de 1 nM.

Dintre cei patru compuși testați, BHT s-a dovedit a fi cel mai potent în modularea influxului de calciu. Ceea ce e interesant legat de acest compus este faptul că nu a evidențiat nici un efect la testarea in vitro pentru activitate estrogenică/antiestrogenică, utilizând ca mecanism interacțiunea cu receptorii estrogenici.

BHA, un compus antiestrogenic pe linia T47DKB-luc, s-a dovedit a fi mai puțin potent decât BHT, dar a afectat aceiași parametri, în aceeași manieră. Cu toate că activitatea estrogenică a BP a fost confirmată, efectele acestui compus (la o concentrație de 10 nM) asupra celulelor beta pancreatice par a fi exact opusul celor induse de estradiol, și asemănătoare cu cele observate pentru BHT și BHA.

Întrucât pancreasul este un organ la nivelul căruia sunt exprimați receptori $ER\alpha$ și $ER\beta$, se poate specula faptul că ar exista o interacțiune între compușii testați și receptori. GPR30 ar putea fi de asemenea implicată. Chiar dacă aceste substanțe au o afinitate scăzută pentru ER, ele ar putea acționa și prin alte căi, diferite de calea genomică clasică.

Concluzii

Cu excepția PG, toate substanțele au afectat influxul de calciu în celulele beta pancreatice (BHA, BHT și BP la o concentrație de 10 nM; BHA și BHT la o concentrație de 1 nM), iar aceasta ar putea cauza o diminuare a secreției de insulină indusă de glucoză.

BHA, BHT și BP la 10 nM, respective BHA și BHT la 1 nM au afectat ambele faze ale secreției de insulină indusă de glucoză, interferând cu amplitudinea și modificând aria de sub primul pic (corelate cu faza I a secreției) și de asemenea, modificând aria de sub oscilații (corelată cu faza a IIa a secreției)

Este posibil ca acești compuși să interacționeze cu receptorii estrogenici exprimați de celulele beta pancreatice, dar ar putea interacționa și prin alte mecanisme decât cel clasic.

După cum s-a menționat anterior, un test al secreției de insulină trebuie efectuat pentru a confirma rezultatele obținute prin măsurarea parametrilor legați de influxul de calciu intracelular.

Evaluarea efectelor BHA, BHT, PG și BP *in vivo*

Obiective

Obiectivul acestui studiu a fost evaluarea efectelor BHA, BHT, PG și BP la două concentrații diferite, una reprezentând 3xNOAEL și o a doua reprezentând NOAEL (NOEL pentru BP) asupra tractului genital feminin, folosind testul uterotrofic la șobolan.

Efectele obținute vor fi de folos în designul și interpretarea rezultatelor în cazul amestecurilor binare.

Rezultate și discuții

Pentru a evalua proprietățile estrogenice ale unor compuși, testul uterotrofic urmărește schimbări ale greutateii uterine la rozătoare. Bazându-ne pe rezultatele obținute (scăderea greutateii uterine), loturile tratate cu BHA, BHT PG, și BP au avut un răspuns diferit de cel tratat cu estradiol.

BHA a fost identificat ca un compus ce are capacitatea de a induce o dezvoltare defectuoasă a sistemului reproducător, atât masculin, cât și feminin, prin modificarea nivelului de T4 și testosteron, scăderea greutateii organelor sexuale și întârzierea pubertății.

Rețeaua hormonală tiroidiană reglează metabolismul în majoritatea țesuturilor, și deci, creșterea și dezvoltarea sistemului reproductiv. Prin urmare, modificarea nivelului de hormoni tiroidieni poate conduce la o subdezvoltare a sistemului reproductiv. Există studii *in vivo* ce au utilizat alte protocoale experimentale, în care diferiți compuși au modificat funcția tiroidiană, și prin asta, au redus greutatea ovariană și uterină.

De asemenea, nivelele scăzute de hormoni tiroidieni pot diminua răspunsul uterin întârziat, care are loc la 24 de ore după ultima doză de estradiol. Faptul că toate loturile experimentale au fost eutanasiate la 24 de ore după ultima administrare poate explica creșterea minimă a grosimii stromei și uterului, evidențiată în urma analizei morfometrice.

Funcțiile mediate estrogenic sau androgenic pot să nu fie afectate dacă hipotiroidismul e indus în timpul dezvoltării fetale sau la vârsta adultă. În cazul în care hipotiroidismul apare în cursul perioadei neonatale și până la înțarcare, s-a observat că poate cauza întârzierea pubertății, subdezvoltarea aparatului reproducător, scăderea nivelului de gonadotrofine și inhibiția steroidogenezei.

Concluzii

Din datele colectate în cursul experimentului putem asuma că, cel mai probabil, funcția tiroidiană e afectată de toți compușii testați, ceea ce cauzează scăderea greutateii uterine. Analiza histopatologică și cea morfometrică sugerează faptul că apare un efect estrogenic minimal în cazul BHA, BHT și BP, ce ar putea fi explicat prin durata expunerii animalelor la substanțele test, perioada de dezvoltare și, de asemenea, prin nivelul scăzut de hormoni tiroidieni, care poate diminua efectele stimulării estrogenice.

Acest studiu prezintă pentru prima oară dovada efectului antiestrogenic al BHA, BHT și PG la două nivele de concentrație, explicat prin afectarea funcției tiroidiene. De asemenea, BHA, BHT și BP produc un efect estrogenic slab, observat în urma analizei histopatologice și morfometrice.

Evaluarea amestecurilor binare in vitro

Obiective

O parte importantă a acestei teze constă în evaluarea riscului cumulativ pentru sănătatea publică; risc ce apare datorită expunerii populației la perturbatori endocrinieni, prin dietă. Pe lângă amestecurile compus-compus, e necesar să studiem efectele amestecurilor de substanțe cu estradiol la diverse concentrații, întrucât nivelele hormonale diferă de-a lungul timpului.

Rezultatele se pot dovedi folositoare în domeniul toxicologiei, deoarece vor facilita o mai bună înțelegere și o estimare corectă a efectelor negative ce pot rezulta în urma expunerii simultane la diferite xenobiotice, în concentrații relativ scăzute.

Rezultate si discutii

Ipoteza testată a fost aceea că efectele amestecurilor binare (BHA+PG, BHA+BP, BP+PG, E2+BHA, E2+PG, E2+BP) vor fi aditive.

Pentru BHA+BP, un amestec între un compus estrogenic și unul antiestrogenic, răspunsul nu a putut fi anticipat prin nici unul dintre cele două modele. Ambele modele matematice (aditivitatea concentrațiilor – AC) subestimează efectul BP în amestec.

Nu există nici o îndoială asupra faptului că un compus estrogenic slab, precum BP, în amestec cu 17β -estradiol, este capabil să contribuie la efectul estrogenic al amestecului. Datele obținute au demonstrat că efectul amestecului de BP cu 17β -estradiol a fost aditiv ($p=0.960$). Acest rezultat confirmă datele din literatură referitoare la efectul aditiv al parabenilor cu estradiolul.

BHA+PG este un amestec între un compus ce posedă atât proprietăți estrogenice, cât și antiestrogenice, și un compus antiestrogenic. Graficul experimental arată efectul estrogenic al PG (în lipsa BHA), efect ce scade pe măsură ce cresc concentrațiile de BHA. Nici unul dintre cele două modele nu se apropie de situația reală.

BP+PG este, de asemenea, un amestec între un compus cu proprietăți estrogenice și un antiestrogen. Modelele matematice nu pot anticipa răspunsul amestecului, dar modelul B a anticipat corect rezultatele obținute pentru un domeniu de concentrații restrâns. Model A nu a putut anticipa comportamentul amestecului, chiar dacă s-a analizat o un domeniu de concentrații mai restrâns.

Amestecul de PG+E2 a fost demonstrat anterior ca având un efect aditiv, dar nici unul dintre modelele AC utilizate în acest studiu nu a putut anticipa un astfel de răspuns. Cu toate acestea, ambele modele au apreciat corect comportamentul amestecurilor de la 90 la 100 ($p=0.350$, $p=0.140$). Nu există diferențe semnificative între cele două modele utilizate ($p=0.404$).

Amestecul BHA+E2 a avut, de asemenea, un efect aditiv anterior demonstrat, dar în studiul de față, nici unul dintre modele nu a putut anticipa comportamentul amestecului. Pentru unele amestecuri răspunsul a putut fi anticipat pe baza modelului A.

Aceste rezultate confirmă o idee deja acceptată în literatură, și anume aceea că substanțele estrogenice acționează aditiv, în timp ce pentru celelalte amestecuri (estrogeni + antiestrogeni) modelul AC nu a putut anticipa efectele sau a avut o utilitate limitată. O posibilă explicație ar fi faptul că nu toate substanțele prezente în amestec pot induce efectul urmărit experimental. Totuși, răspunsul unor amestecuri (AE+E) a putut fi corelat cu modelele matematice, însă doar pentru unele domenii de concentrație.

Aceste amestecuri (AE+E) diferă de cele care au doar componenți estrogenici, deci poate că din perspectiva design-ului experimentului, modelul ales ar putea fi regândit.

Interpretarea și extrapolarea rezultatelor in vitro la situații din viața reală au unele limitări și în acest sens ar trebui luate în considerare anumite aspecte. Compoziția amestecurilor nu poate să reproducă toate situațiile din plasma umană. De asemenea, se poate pune întrebarea în ce măsură concentrațiile din mediul celulelor reflectă în mod realist concentrațiile plasmatiche. Biodisponibilitatea in vivo poate fi mai redusă decât in vitro, datorită unor diferențe ale nivelelor de proteine, a fracțiilor libere și a caracteristicilor cinetice ale compușilor. Un alt aspect de luat în considerare este faptul că acest sistem in vitro ignoră posibilele căi non-genomice care pot conduce la tulburări endocrine, afectarea steroidogenezei și a metabolismului, cinetica compușilor.

Concluzii

Acest studiu a dovedit faptul că răspunsul amestecului a putut fi anticipat parțial.

Rezultatele studiului arată necesitatea de a face experimente pe un domeniu de concentrații mai restrâns, dar merită încercat și un domeniu mai larg, dacă este relevant pentru expunerea reală.

Evaluarea amestecurilor binare in vitro

Obiective

Acest studiu are ca obiectiv investigarea posibilelor interacțiuni între compușii studiați utilizând "un sistem" care mimează situația reală.

Rezultate și discuții

Modificările greutateii glandei tiroide au fost minime; patru din cele șase amestecuri testate au prezentat scăderi ale greutateii uterine (dar nu statistic semnificative) în comparație cu situația în care compușii din amestec au fost testați individual. Greutatea uterine a scăzut semnificativ în cazul amestecului PG+PB.

BHT+BP este amestecul care administrat animalelor nu a dus la nici o modificare histopatologică.

Toate animalele care au primit amestecuri cu BHA au prezentat modificări histopatologice în toate segmentele aparatului reproducător. Chiar dacă aceste schimbări au fost mai puțin exprimate în comparație cu lotul care a primit 3xNOAEL, a fost totuși evidente. Două dintre amestecurile PG-ului au prezentat schimbări de morfologie: hiperplazie glandular în cazul PG+BHT, în timp ce în cazul administrării PG+BP submucoasa a prezentat un ușor edem.

Datele morfometrice au evidențiat creșteri semnificative (în cazul submucoasei și al peretelui uterin (ca rezultat al edemului submucoasei) și o scădere semnificativă a epiteliului endometrial în cazul administrării de BP+PG.

În cazul administrării BHT+BHA, după măsurarea submucoasei, se poate vorbi de un efect sinergic. Ca și consecință a edemului stromei, peretele uterin a crescut semnificativ în comparație cu controlul.

Și în cazul amestecului BHA+PG avem același tip de comportament (edem al stromei), însă în acest caz, efectul este aditiv.

Edem al submucoasei, de data aceasta statistic nesemnificativ a prezentat și BHA+PG.

Amestecul BHT+PG a avut un comportament estrogenic identic cu cel mai potent compus din amestec, iar împreună cu creșterea miometrului, peretele uterin a fost semnificativ mai mare în comparație cu controlul negativ.

Animalele care au primit BP+PG au prezentat o scădere a epiteliului endometrial, fără semnificație statistică în comparație cu controlul, dar semnificativ statistică în comparație cu administrarea de BP. Submucoasa și peretele uterin au fost statistic semnificative.

Ca o concluzie a rezultatelor prezentate, efectele amestecurilor asupra tiroidei au fost mai blande (în comparație cu administrarea individuală a compușilor, de aceea greutatea uterină a scăzut, dar nu într-un mod semnificativ. Ca și consecință, efectele estrogenice ale compușilor testați au fost mai vizibile la analiza morfometrică și cea histopatologică. Dacă hiperplazie glandulară a apărut la testarea individuală doar la administrarea de BHA, în cazul amestecurilor a fost observată și în cazul administrării de BHT+PG.

Concluzii

Efectele mai blande ale amestecurilor testate asupra tiroidei au permis proprietăților estrogenice ale substanțelor să fie mai vizibile la analiza morfometrică și histopatologică.

Simpla însumare a efectelor observate la administrarea individuală s-a dovedit atât ca o supraestimare a efectului amestecurilor, cât și ca o subestimare a lor.

Concluzii generale

Compușii studiați interferă cu sistemul endocrin prin mai multe mecanisme.

Cu excepția PG-ului, toți ceilalți compuși scad cantitățile de insulină din ambele faze ale secreției, întrebarea care se naște în aceste condiții este dacă acești compuși sunt factori de risc în apariția diabetului la expunere cronică.

Cu toate că studiile *in vitro* i-au prezentat ca antiestrogeni, BHA și PG administrați la organisme în dezvoltare s-au comportat ca estrogeni.

Studiile *in vivo* au evidențiat potențialul perturbator al funcției tiroide, compușii având ca efect creșterea în greutate a glandei tiroide și scăderea greutății uterine.

Modelul aditiv a fost folositor pentru design-ul amestecurilor cu compuși estrogenici. Raspunsul amestecului compus antiestrogenic-estradiol poate fi doar parțial anticipat. Modelul aditiv nu s-a potrivit pentru estimarea raspunsului compusilor in absenta estradiolului.

Studiile in vivo ale amestecurilor au evidențiat un effect asupra tiroidei.

Studiile in vivo sustin ideea efectului amestecurilor (compuși care individual nu prezintă niciun effect, in amestec se comport astfel incat răspunsul să fie semnificativ statistic).