

DISS. ETH NO. 15544

**DEVELOPMENTAL TOXICITY OF 4-METHYLBENZYLIDENE CAMPHOR AND  
DIFFERENT ENDOCRINE ACTIVE CHEMICALS: STEROID HORMONE-REGULATED  
GENE EXPRESSION IN REPRODUCTIVE ORGANS OF RATS**

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
For the degree of  
Doctor of Natural Sciences

presented by  
**STEFAN DURRER**  
Dipl. Natw. ETH  
born September 8, 1969  
citizen Kerns (OW)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. W. Langhans, examiner  
Prof. Dr. W. Lichtensteiger, co-examiner  
Prof. Dr. W. Wuttke, co-examiner

2004

## Summary

---

Chemicals like xenoestrogens, which can mimic endogenous hormones or interfere with endocrine processes, are collectively called endocrine disruptors. Adverse effects by endocrine disrupting chemicals (particularly xenoestrogens) include a number of developmental anomalies in wildlife and humans. Critical periods of urogenital tract and nervous system development in-utero and during early postnatal life are especially sensitive to hormonal disruption. Furthermore, damage during this time is generally permanent. This study analyzed the developmental toxicity of three chemicals exhibiting estrogenic activity, 4-methylbenzylidene camphor (UV-filter), genistein (Phytoestrogen) and diethylstilbestrol (pharmaceutical estrogen) on several classical parameters of developmental toxicity of F1 rat offspring. These data were compared with the expression of estrogen-regulated genes, estrogen receptor alpha (ER alpha), estrogen receptor beta (ER beta), progesterone receptor (PR), androgen receptor (AR), steroid receptor coactivator SRC-1 and insulin-like growth factor I (IGF-I). mRNA levels were quantified by Real-Time PCR in uterus, ventral and dorsal prostate of F1 rat offspring, using cyclophilin as reference gene.

A) The UV filter **4-MBC** is widely used in cosmetics and exhibits estrogenic activity. They are toxicologically relevant because of their presence in the biosphere, and represent new classes of endocrine active chemicals differing in structure from known endocrine disruptors. Since it is important to obtain information on molecular actions of non-classical estrogen receptor (ER) agonists during sensitive life cycle phases, we studied the effect of developmental exposure to 4-methylbenzylidene camphor (4-MBC). 4-MBC (0.7, 7, 24, 47 mg/kg/day) was administered to Long Evans rats of the parent generation from 10 weeks before mating, during pregnancy and lactation and to their offspring until adulthood (12 weeks). 4-MBC exposure resulted in changes of reproductive parameters such sex ratio and survival rate. The body weight was dose-dependently reduced in the first two weeks of life but normalized in adult F1 offspring. The organ weight of the ovary in adult female F1 offspring and of testes and ventral prostate in adult male F1 offspring were also affected. Tissue-specific changes in insulin-like growth factor-I, progesterone receptor, estrogen receptor alpha and beta and androgen receptor were noted in uterus and dorsal and ventral prostate of adult F1 offspring. Dose-response relationships differed between genes and tissues. IGF-I mRNA showed a significant bell-shaped dose response in uterus but a

monotonic dose-response in prostate. The lowest dose yielding significant changes on mRNA levels was 7 mg/kg/day. In order to assess possible changes in the sensitivity of genes to estrogen, adult offspring were gonadectomized and injected two weeks later with a single dose of 17 $\beta$ -estradiol (10 or 50  $\mu$ g/kg s.c.). 4-MBC exposure affected estrogen sensitivity. The response to estradiol was generally reduced, in uterus for PR, IGF-I, ER alpha and AR, in (ventral) prostate for IGF-I, ER beta and AR. The minimally effective dose of 4-MBC was again 7 mg/kg/day. In uterus, these effects were accompanied by reduced expression of the steroid receptor coactivator SRC-1 in the same dose-range.

**B)** The phytoestrogen **genistein** treatment period extended from GD2 (GD1 = 24 hr after onset of mating period) during gestation and lactation until postnatal day (PN) 28, when the offspring were weaned. Genistein was administered at one dose level, 70mg/kg/day. At 12 weeks of age female and male offspring were sacrificed. Treatment effects were observed on weight gain of pregnant dams, sex ratio, body weight gain and terminal body weight of F1 offspring and reproductive organ weights of male offspring at the age of 12 week. Genistein - administered until PN28- caused a delayed down-regulation of mRNAs encoding for insulin-like growth factor-I, progesterone receptor, estrogen receptor alpha and beta in uterus and IGF-I, ER alpha, ER beta and AR in dorsal and ventral prostate of adult F1 offspring.

**C)** The synthetic estrogen **diethylstilbestrol (DES)**, a full agonist for both ER subtypes was injected subcutaneously to time-pregnant dams at two doses (0.2 and 2.0  $\mu$ g/kg) from gestational day (GD)12 to GD20. The present report deals only with the analyses at the molecular level. Prenatal DES treatment resulted in a reduced ER alpha transcript level in uterus of 12 week old female offspring. Ventral and dorsal prostate of adult prenatally DES-exposed males showed a down-regulation of the steroid hormone receptor mRNA levels (ER alpha, ER beta, AR), whereas the IGF-I exhibited a bell-shaped dose-response curve with significant induction after the lower dose (0.2 $\mu$ g/kg BW).

Our data indicate that developmental exposure to the three xenoestrogens, 4-MBC, genistein and DES results in changes at the organ level and gene expression level, with different effect patterns. The transcript level seems to be a sensitive tool for detecting endocrine effects of different test compounds.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahren häufte sich der Verdacht, dass Chemikalien mit unterschiedlicher Herkunft in der Lage sind die Wirkung körpereigener Hormone (u.a. Östrogene) sowohl beim Menschen, als auch beim Tier zu imitieren, zu verhindern oder zu verändern. Stoffe, die in der Lage sind mit dem Hormonsystem zu interferieren bezeichnet man als Endokrine Disruptoren. Xenoöstrogene, die ähnlich dem natürlichen Hormon Östrogen agieren, werden sowohl von Pflanzen als auch von Pilzen produziert, sind jedoch hauptsächlich anthropogenen Ursprungs (z.B. gewisse Pestizide, industrielle Chemikalien oder pharmazeutische Produkte). Eine Interaktion von Stoffen mit endokriner Wirkung kann je nach Zeitpunkt der Exposition verschiedene Konsequenzen für den Organismus haben. Da Hormone zusätzlich eine determinierende Rolle in der Entstehung der Organe und Organfunktionen spielen, sind Störungen des Hormongleichgewichts in frühen Entwicklungsstadien besonders kritisch für den Organismus. Daher ist die Empfindlichkeit von Organismen während der Entwicklungs- und Wachstumsphase besonders gross.

In der vorliegenden Arbeit wurde in drei separaten Langzeitstudien die Entwicklungstoxizität von 4-Methylbenzylidene Camphor (UV Filter), Genistein (Phytoestrogen) und Diethylstilbestrol (Arzneimittel) an Long Evans-Ratten untersucht. Neben den klassischen toxikologischen Endpunkten wie Körpergewicht, Wurfgrösse, Ueberlebensrate, Geschlechterverhältnis, Anogenital-Distanz und Reproduktionsorgan-Gewichte wurden auch Genexpressionsmuster von östrogen-regulierten mRNA-Transkripten analysiert. Mittels der Real-time PCR erfolgte eine quantitative Messung der mRNA im Uterus, der ventralen und dorsalen Prostata von adulten Tieren der F1 Generation für folgende Gene: Östrogenrezeptor alpha und beta (ER alpha und ER beta), Progesteronrezeptor (PR), Androgenrezeptor (AR), Steroidhormonrezeptor Coaktivator SRC-1 und Insulin-like growth factor I (IGF-I).

A) Die Exposition des Menschen mit UV Filtern wie z. B. 4-MBC, erfolgt hauptsächlich durch Sonnenschutzmittel und verschiedenen Kosmetika (Verwendung als Produkteschutz). Aufgrund der zunehmenden Verbreitung in der Biosphäre muss jedoch eine Belastung über die Nahrungskette mitberücksichtigt werden (Fische, Humanmilch). Ziel der durchgeführten Studie war es, das Wirkungspotential von nicht klassischen Östrogenrezeptor Agonisten wie zum Beispiel 4-MBC, während empfindlichen Entwicklungsphasen zu untersuchen. Hierfür

wurde die Elterngeneration (F0) vor der Verpaarung für mindestens 10 Wochen mit 4-MBC in unterschiedlichen Konzentrationen (0,7, 7, 24, 47 mg/kg/Tag) eingefüttert. Die Nachkommen (F1) wurden während der Schwangerschaft, der Laktation bis ins adulte Alter (12 Wochen) mit 4-MBC exponiert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit dem UV-Filter zu einer Verschiebung des Geschlechterverhältnisses und zu einer verringerten Überlebensrate in der F1-Generation führte. Das Körpergewicht zeigte eine dosis-abhängige Reduktion in den beiden ersten Lebenswochen; im Alter von 12 Wochen konnte jedoch kein Unterschied in den einzelnen Behandlungsgruppen determiniert werden. Die Gewichte der Reproduktionsorgane zeigten sowohl beim Männchen (Hoden u. ventrale Prostata), als auch beim Weibchen (Ovarien) eine Veränderung nach 4-MBC Behandlung. Zusätzlich fanden sich gewebs-spezifische Veränderungen der Genexpression der analysierten mRNA-Transkripte bei beiden Geschlechtern der F1-Generation. Die Dosis-Wirkungsbeziehung war hierbei abhängig vom Gewebe und den verschiedenen Genen.

Um eine mögliche Auswirkung des UV-Filters auf die Östrogensensitivität zu analysieren, wurden in einem zweiten Versuchsansatz 4-MBC exponierte Tiere der F1-Generation beider Geschlechter im Alter von 10 Wochen gonadektomiert und anschliessend mit einer von zwei Dosen Östradiol injiziert. Die Analyse der Genexpression erfolgte sechs Stunden nach Östradiol Applikation. Generell zeigten die 4-MBC vorbehandelten Tiere eine verminderte Östrogensensitivität in den untersuchten Genen im Vergleich zur Kontrolle. Im Uterus waren dies der PR, IGF-I, ER alpha und AR, in der ventralen Prostata der IGF-I, ER beta und der AR. Im Uterus wurde zudem noch eine reduzierte Expression des Steroidhormonrezeptor Coaktivators SRC-1 nach 4-MBC Behandlung beobachtet.

**B)** Die Exposition der Tiere mit dem Phytoestrogen **Genistein** erfolgte oral über das Futter in einer Dosis von 70 mg/kg/Tag. Die Gabe des genisteinhaltigen Futters begann ab dem zweiten Trächtigkeitstag bis hin zum postnatalen Tag 28 der F1-Generation. Behandlungseffekte konnten beim Gewichtsverlauf der trächtigen Muttertiere, dem Geschlechterverhältnis und dem Körpergewicht während der Entwicklung und im Erwachsenenalter sowie den Gewichten der Reproduktionsorgane der F1 Generation (12 Wochen) festgestellt werden. Die Genistein-Exposition führte zu einer Repression aller untersuchten Gene im Uterus und in der ventralen und dorsalen Prostata der 12 Wochen alten F1-Generation.

C) Das synthetische Östrogen, **Diethylstilbestrol (DES)**, ein voller Östrogenrezeptor Agonist für beide Subtypen, wurde subkutan trächtigen Muttertieren während dem Trächtigkeitstag 12 bis 20 in zwei verschiedenen Dosen (0.2 and 2.0 µg/kg) injiziert. In dieser Studie wurde die Transkriptomanalyse im Uterus und in der ventralen und dorsalen Prostata der F1-Generation (12 Wochen) untersucht. Prenatale DES-Behandlung führte zu einer Repression der ER alpha mRNA in adulten Uteri. Die ventrale und dorsale Prostata zeigte nach prenataler DES-Exposition eine Runterregulierung der Steroidhormonrezeptoren mRNA von ER alpha und beta und des AR, während die IGF-I mRNA Analyse eine bell-shaped Dosis-Wirkungsbeziehung zeigte.

Die Ergebnisse der untersuchten Stoffe 4-MBC, Genistein, und DES in den durchgeführten toxikologischen Langzeitstudien zeigten sowohl bei den klassischen toxikologischen Parameter wie auch bei der Analyse der Genexpression signifikante Effekte. Die molekulare Analyse scheint ein empfindlicher Endpunkt zu sein, um endokrin wirksame Substanzen zu detektieren.