



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Estudo do efeito do Octilmetoxicinamato (OMC) em artérias umbilicais humanas

Juliana Faria Filipe

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor José Ignacio Verde Lusquiños
Co-orientador: Professora Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

Covilhã, maio de 2016

Dedicatória

Dedico este trabalho a toda a minha família, como demonstração de que o esforço é sempre recompensado.

Dedico ainda a todos aqueles que possam vir a beneficiar do conteúdo desta investigação.

Agradecimentos

Agradeço a todos os membros constituintes do grupo de investigação em doenças cardiovasculares do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), em especial à Joana Feiteiro, por todo o carinho e paciência com que sempre me recebeu.

À Professora Doutora Maria Elisa Cairrão, por toda a disponibilidade, paciência, auxílio e ainda por todas as horas passadas comigo no laboratório, o meu muito obrigado.

Ao Professor Doutor Ignacio Verde, por ter aceite o meu pedido de orientação e por toda a ajuda que me deu, os meus sinceros agradecimentos.

Um obrigado a todos aqueles que me ajudaram e incentivaram para a conclusão deste projeto.

Agradeço ainda ao meu irmão e à minha irmã, que fizeram parte do meu crescimento e que sempre os considereei como exemplos a seguir. Apesar de estarem longe fisicamente, sempre me apoiam no que preciso.

Um obrigada especial aos meus pais, que sempre me educaram da melhor forma e que tudo fizeram para que eu pudesse concluir os estudos. É graças a eles que sou a pessoa que sou hoje, por todos os valores que me inculcaram, principalmente o valor do trabalho e do esforço e, principalmente, por todo o seu amor incondicional.

Resumo

Introdução: O octilmetoxicinamato é um dos filtros de radiação ultravioleta B mais utilizados em protetores solares e produtos cosméticos. Após alguns estudos *in vitro* e *in vivo*, há a suspeita de que possa atuar como disruptor endócrino, com possível atividade estrogénica e anti-tiroideia. É absorvido pela pele, sendo detetado no plasma depois da sua aplicação tópica. Também foi detetado em amostras do leite materno humano. Dada a sua natureza lipofílica, tende a acumular-se no ambiente e foi considerado uma substância de grande preocupação relativamente ao seu risco para a saúde. Ainda não foram elaborados estudos de modo a avaliar a sua ação no sistema cardiovascular, mas pensa-se que poderá ter efeitos semelhantes aos do estrogénio. A sua ação no músculo liso pode ser desencadeada por vias genómicas e não genómicas que podem ser dependentes ou independentes do endotélio.

Objetivo: Avaliar os efeitos do octilmetoxicinamato no músculo liso das artérias umbilicais humanas sem endotélio, de modo a analisar os seus possíveis efeitos não genómicos independentes do endotélio, e se estes se assemelham aos do estrogénio, a nível vascular.

Material e Métodos: Utilizando a técnica de banho de órgãos, anéis de artérias umbilicais humanas sem endotélio foram contraídas com serotonina $1\mu\text{M}$ e cloreto de potássio 60mM . O efeito do octilmetoxicinamato a diferentes concentrações foi analisado. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comité de ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E.

Resultados: Observou-se um efeito de vasorelaxamento, nas artérias umbilicais humanas sem endotélio contraídas com serotonina $1\mu\text{M}$ e com cloreto de potássio 60mM . Ocorreu um relaxamento semelhante entre os dois agentes contracteis nas diferentes concentrações, com efeito máximo na concentração $5 \times 10^{-5}\text{M}$, para os dois agentes contracteis analisados.

Discussão: O octilmetoxicinamato poderá desencadear o vasorelaxamento, de uma forma semelhante ao 17 β -Estradiol, por um mecanismo não genómico e independente do endotélio. Não existem estudos publicados relativamente ao efeito do octilmetoxicinamato a nível vascular, bem como o seu possível papel como disruptor endócrino e no desenvolvimento de patologias cardiovasculares. O presente estudo foi pioneiro nesse sentido. São necessários estudos adicionais de modo a averiguar se o seu mecanismo de ação está relacionado com a ativação do recetor GPR30.

Conclusão: O octilmetoxicinamato tem um efeito não genómico vasorelaxante em artérias umbilicais humanas através de um mecanismo independente do endotélio.

Palavras-chave

Octilmetoxicinamato · Disruptor endócrino · Artéria umbilical humana · Estrogénio · GPR30

Abstract

Introduction: Octyl-methoxycinnamate is one of the most commonly used ultraviolet B radiation filters in sunscreens and other cosmetic products. After some *in vitro* e *in vivo* studies, it is suspected that it can act as an endocrine disruptor, possibly with estrogenic and antithyroid actions. It is absorbed through the skin and can be detected in the plasma after topical application. It is detected in human milk samples as well. It is a lipophilic molecule, tends to bioaccumulate in the environment, and it was considered as a substance of high concern in relation to human risk and health. There is no studies evaluating the action of octyl-methoxycinnamate on the cardiovascular system but there is a possibility that it can have similar effects to those of estrogens in different arteries. It's action on vascular smooth muscle cells can be triggered through genomic and non-genomic pathways that can be dependent or independent of the endothelium.

Objective: Assess octyl-methoxycinnamate's effects on the smooth muscle of human umbilical arteries without endothelium in order to analyze its potential non-genomic effects independent of endothelium, and see if they are similar to those of estrogen at a vascular level.

Material and Methods: Using organ bath techniques, rings of human umbilical arteries without endothelium were contracted by serotonin 1 μ M and potassium chloride 60mM. The effects of octyl-methoxycinnamate were analyzed at different concentrations. All procedures were approved by the ethics committee of Cova da Beira's Hospital Center.

Results: Octyl-methoxycinnamate relaxed human umbilical arteries without endothelium contracted with both serotonin 1 μ M and potassium chloride 60mM. There was a similar vasorelaxant effect between the two contractile agents at different, with maximum effect at 5x10⁻⁵M, in both contractile agents.

Discussion: Octyl-methoxycinnamate could trigger a vasorelaxant effect in a similar way that of 17 β -Estradiol, through a non-genomic and endothelium independent mechanism. There isn't published data regarding octyl-methoxycinnamate effects at a vascular level, as well as it's possible action as an endocrine disruptor and in the development of cardiovascular diseases. The present study is a pioneer in that way. It is necessary more data to evaluate if the mechanism of action of octyl-methoxycinnamate is related with the activation of the receptor GPR30.

Conclusion: Octyl-methoxycinnamate has a non-genomic vasorelaxant effect in human umbilical arteries through an endothelium independent mechanism.

Keywords

Octyl-methoxycinnamate · Endocrine disruptor · Human umbilical artery · Estrogen · GPR30

Índice

1. Introdução	1
1.1. Radiação Ultravioleta (UV).....	1
1.1.1. Efeitos biológicos da radiação UV na pele.....	1
1.1.2. Fotoproteção	2
1.2. Disruptores Endócrinos	3
1.3. Octilmetoxicinamato (OMC)	4
1.3.1. Atividade estrogénica	5
1.3.2. Atividade tiroideia	5
1.3.3. Vias de exposição ao OMC	6
1.4. Estrogénio e o seu efeito a nível vascular.....	6
1.5. Enquadramento e Objetivo da Investigação	10
2. Material e Métodos	12
2.1. Extração e preparação das artérias umbilicais humanas (AUH)	12
2.2. Estudo de contratibilidade arterial.....	12
2.3. Químicos.....	13
2.4. Análise estatística	13
3. Resultados	14
3.1. Efeitos vasculares diretos do OMC em AUH	14
3.1.1. Efeitos do OMC na contração das AUH com 5-HT	14
3.1.2. Efeitos do OMC na contração das AUH com KCl	15
3.1.3. Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis	16
4. Discussão	18
6. Bibliografia	22

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do OMC	4
Figura 2: Vias de sinalização ativadas pelo GPR30	7
Figura 3: Mecanismos não genómicos de relaxamento do músculo liso vascular, dependentes do endotélio.....	8
Figura 4: Mecanismos não genómicos de contração do músculo liso vascular, independentes do endotélio	9

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Efeito relaxante do OMC (%) em AUH sem endotélio após contração com serotonina.....	15
Gráfico 2: Efeito relaxante do OMC em AUH sem endotélio (%), após contração com KCl.....	16
Gráfico 3: Efeito relaxante (%) do OMC (log [OMC]) em AUH sem endotélio contraídas com serotonina (5-HT) e com KCl 60mM.....	17

Lista de Tabelas

Tabela 1: Resposta Contrátil Máxima em gramas (g) em resposta à Serotonina (5-HT) e KCl 60mM nas AUH com OMC e controlo com Etanol	14
--	----

Lista de Acrónimos

5-HT	Serotonina
AUH	Artéria Umbilical Humana
CaD	Caldesmona
CAM	Calmodulina
cAMP	3',5' adenosina monofosfato
CaP	Calponina
COX	Cicloxygenase
DAG	Diacilglicerol
DE	Disruptor endócrino
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estrial
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EGFR	Recetor do fator crescimento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ER	Recetor de estrogénio
ERO	Espécies reativas de oxigénio
EUA	Estados Unidos da América
HB-EGF	Fator de crescimento epidérmico ligado ao heparano
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IGF-1	Fator de crescimento de insulina tipo 1
IP3	Inositol trifosfato
KCl	Cloreto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LTCC	Canais de cálcio operados por voltagem tipo L
MAPK	Proteína cinase ativadora de mitógenos
MEK	Proteína cinase de MAPK
MLC	Cadeias leves de miosina
MLCK	Cinase das cadeias leves de miosina
MMP	Metaloproteinase da matriz
NO	Óxido nítrico
OMC	Octilmetoxicinamato
PGI2	Prostaciclina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase

PKA	Proteína cinase A
PKG	Proteína cinase G
PLC	Fosfolipase C
PR	Recetor de progesterona
Pro-HB-EGF	Fator de crescimento epidérmico ligado ao pro-heparano
PSS	Solução salina fisiológica estéril
SNC	Sistema Nervoso Central
SphK	Esfingosina cinase
SR	Retículo sarcoplasmático
TR	Recetor tiroide
TSH	Hormona estimuladora da tiroide
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta

1. Introdução

1.1. Radiação Ultravioleta (UV)

À superfície da Terra, ao nível do mar, o espectro de radiação solar consiste em energia eletromagnética com comprimento de onda entre os 290 e 3000 nanómetros (nm). É dividido em radiação ultravioleta (UV) (290-400nm), radiação visível (400-760 nm) e radiação infravermelho (mais do que 760 nm). A radiação solar de comprimento de onda menor do que 290 nm é absorvida e filtrada na camada de ozono pelo oxigénio da estratosfera, pelo que não é detetado ao nível do mar.⁽¹⁾

A radiação UV é subdividida em 3 bandas, com energia crescente: UVA (320 a 400nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290nm).⁽¹⁾ Esta última é a radiação mais perigosa, com capacidades bacteriostáticas e bactericidas.⁽²⁾ Apesar de a radiação solar UVC não atingir a superfície da Terra tendo em conta o seu comprimento de onda, esta pode ser encontrada no espectro de radiação proveniente de luzes artificiais.^(1, 2) As radiações UVA e UVB são responsáveis respetivamente por 20% e 80% dos efeitos prejudiciais da luz solar.⁽²⁾

A radiação UVB, que corresponde a cerca de 5-10% da radiação UV que atinge a superfície terrestre ⁽²⁾, é responsável pelos efeitos biológicos mais importantes exercidos nos seres vivos. É absorvida pelo estrato córneo e pode lesar diretamente o DNA^(2, 3), levando ao desenvolvimento de dímeros de bases pirimidicas ⁽²⁻⁴⁾, predispondo as células à acumulação de mutações. As reações induzidas pela radiação UVB são imediatas, resultando na libertação de mediadores inflamatórios, o que leva à dilatação de capilares sanguíneos e ao desenvolvimento de eritema e edema. ⁽²⁾.

A radiação UVA penetra mais profundamente nas camadas da pele, atingindo a derme^(4,5) podendo levar à produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) que, indiretamente, lesam o DNA e outras estruturas celulares.^(3, 5)

Os efeitos da radiação solar UV na pele podem ser classificados em agudos, com início rápido e curta duração, e efeitos crónicos, com início gradual e de longa duração.⁽⁶⁾

1.1.1. Efeitos biológicos da radiação UV na pele

A exposição à radiação pode ter efeitos positivos, nomeadamente a promoção do bem estar, o aumento da atividade mental e ainda a síntese de vitamina D₃, essencial na homeostase do

cálcio.⁽³⁾ Pode também ter efeitos benéficos em doenças dermatológicas como nos casos de dermatite atópica e psoríase.⁽²⁾

Um dos efeitos deletérios da exposição solar mais conhecidos são as queimaduras solares, também denominadas de eritema, que são lesões devidas à dilatação dos vasos superficiais na derme, principalmente das vénulas subpapilares.⁽²⁾

O fotoenvelhecimento, com deterioração da estrutura e função da pele, é outro efeito negativo da radiação.^(2, 6) Os seus sinais clínicos são a secura da pele, o aparecimento de rugas profundas, o desenvolvimento de hiperqueratose e hiperpigmentação da pele, a perda de elasticidade por alterações no colagénio e nos tecidos elásticos e ainda, o desenvolvimento de telangiectasias.^(2, 5, 6) Especula-se que talvez cerca de 80% do fotoenvelhecimento induzido pela radiação solar UV ocorra dentro dos primeiros 20 anos de vida.⁽²⁾ A exposição à radiação pode ainda levar ao desenvolvimento de foto-imunossupressão, pela redução na quantidade de células de Langerhans⁽³⁾, que pode levar à alteração das respostas imunes e alteração da função e distribuição dos componentes do sistema imune.⁽¹⁾

Os olhos são outro órgão alvo dos efeitos deletérios da radiação UV.^(1, 6) Os danos fotoquímicos cumulativos podem levar ao desenvolvimento de lesões na córnea, cristalino e retina. Estas lesões podem evoluir para pterígio, fotoqueratite e ainda cataratas, sendo esta última a principal causa de cegueira no mundo.⁽⁶⁾

Um dos efeitos mais preocupantes e alarmantes na exposição solar diz respeito à fotocarcinogénese por lesão direta do DNA, e diminuição das funções imunológicas da pele.⁽⁶⁾ Pode desenvolver-se cancro de pele não melanoma, que corresponde a cerca de 90% dos cancros de pele e compreende o carcinoma basocelular e o carcinoma espinho-celular, e pode ainda desenvolver-se melanoma.⁽⁶⁾ Alguns estudos revelaram que a causa primária de mais de 65% dos melanomas e 90% dos cancros não melanoma é a exposição à radiação solar UV.⁽⁵⁾

1.1.2. Fotoproteção

Está documentado que a proteção contra os raios UV diminui o fotoenvelhecimento e reduz o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas com a pele.⁽⁵⁾ Apesar de este órgão ter os seus próprios mecanismos de defesa, tais como o bronzamento e o aumento da espessura da epiderme (hiperplasia da epiderme), estes são insuficientes para a proteção contra os efeitos nefastos da radiação UV.⁽⁷⁾

De modo a prevenir as consequências negativas da exposição à radiação solar, recomenda-se a redução do tempo de exposição direta ao sol, principalmente entre as 10 horas da manhã e as 3 horas da tarde^(1, 2), o uso de roupa adequada e utilização de protetores solares.⁽²⁾ Esta última medida apesar de não ser a mais eficaz, é a preferida pelos indivíduos.⁽³⁾

O uso frequente e apropriado de protetor solar, apesar de providenciar apenas uma proteção temporária contra a radiação UV, demonstrou prevenção do fotoenvelhecimento e redução do risco de desenvolvimento de neoplasias, nomeadamente cancro de pele não melanoma e melanoma^(3, 5). Confere ainda proteção contra queimaduras solares.^(2, 5) Alguns estudos demonstram que o seu uso diário, após aplicação tópica, pode prevenir o aparecimento de queratose actínica⁽⁴⁾ e atrasar o desenvolvimento de nevos.⁽⁸⁾ Existe ainda evidência sugestiva de que o seu uso possa vir a prevenir exacerbações de fotodermatose.^(4, 9)

Recomenda-se a aplicação tópica de 2mg/cm² de protetor solar, cerca de 30 minutos antes e a cada 2-3 horas durante a exposição ao sol, e ainda após o contato com a água.^(2-4, 8)

De modo a exercer a sua ação benéfica, os protetores solares têm na sua constituição substâncias, que funcionam como filtros à radiação do sol.⁽⁴⁾ Estes podem ser classificados em filtros orgânicos e inorgânicos, sendo que os primeiros atuam absorvendo os raios UV e os segundos atuam através da absorção, reflexão e refração dos raios.⁽⁴⁾ Podem ser agrupados em três categorias: a primeira utilizando filtros orgânicos, a segunda utilizando filtros inorgânicos e a terceira utilizando uma combinação dos dois filtros.⁽⁷⁾ Os filtros solares existem não só em protetores solares, como também em outros produtos cosméticos como bálsamos labiais, champôs, vernizes para as unhas, loções para pele, entre outros, de modo a garantir a estabilidade e durabilidade dos produtos.^(10, 11)

Apesar do uso de protetores solares ser recomendado^(7, 8), alguns problemas de saúde estão a ser associados ao seu uso, como o caso do desenvolvimento de reações alérgicas. Recentemente têm-se desenvolvido estudos que demonstram que muitos filtros solares UV podem ter uma ação como disruptores endócrinos (DE)^(7, 8, 10, 12), levantando dúvidas acerca da segurança de tais produtos cosméticos.

1.2. Disruptores Endócrinos

Os disruptores endócrinos (DE) são compostos exógenos com potencial para alterar a regulação e o normal funcionamento do sistema endócrino podendo afetar, conseqüentemente, a saúde dos indivíduos e da sua descendência, quando a eles expostos.⁽¹³⁻¹⁶⁾ São um grupo heterogêneo que inclui tanto compostos naturais como os fitoestrogénios, como químicos sintéticos usados em pesticidas, solventes industriais, lubrificantes, metais pesados e ainda substâncias utilizadas em produtos de cosmética, de modo a garantir a sua estabilidade e durabilidade.^(11, 14, 16)

Os DE podem interferir na função hormonal de várias formas, podendo alterar diretamente a biossíntese, libertação, metabolismo, transporte e o mecanismo de ação das hormonas.⁽¹³⁾ Podem ainda atuar a nível genómico, influenciando a expressão genética, ou através mecanismos epigenéticos como alterações na metilação do DNA.^(14, 16)

As hormonas, responsáveis pela manutenção da hemóstase corporal, realizam a sua ação através da interação com recetores que se podem dividir em recetores membranares, que respondem primariamente a hormonas hidrofílicas, ou recetores nucleares, que são ativados principalmente por hormonas lipofílicas, como as hormonas esteróides, culminado na regulação da expressão genética.^(13, 14)

Dados epidemiológicos indicam um aumento na prevalência e incidência de doenças relacionadas com disruptores endócrinos tais como obesidade, *diabetes mellitus*, cancro da mama, próstata e testículos, e ainda diminuição da fertilidade nos últimos 50 anos.^(14, 17) No entanto, o impacto dos DE na saúde e os seus efeitos químicos no organismo são ainda desconhecidos.⁽¹³⁾

Hoje em dia a população utiliza de forma crescente uma grande quantidade de produtos cosméticos em busca da juventude eterna⁽¹⁰⁾ e do tão desejado ideal de beleza, cada vez mais cobiçado pelos valores da sociedade atual. Há uma preocupação crescente com a natureza e segurança dos químicos utilizados pela indústria cosmética devido aos seus possíveis efeitos como disruptores endócrinos. Alguns estudos já documentaram o potencial efeito de parabenos, ftalatos e filtros ultravioleta (UV) como DE.^(7, 10, 12, 14, 18)

1.3. Octilmetoxicinamato (OMC)

O octilmetoxicinamato (OMC), também denominado por 2-etilhexil 4-metoxicinamato⁽¹⁹⁾, é um dos filtros UV orgânicos mais utilizados em vários produtos de cosmética.⁽¹²⁾ É um filtro UVB, que atua através da absorção de fotões UV na superfície da pele, antes que estes penetrem profundamente na epiderme e derme.⁽²⁰⁾ A energia absorvida leva os eletrões a adquirir um estado excitado e, ao retornarem ao estado de repouso, levam à libertação de energia sob a forma de calor.⁽⁴⁾ É comercializado em produtos com concentração máxima entre 7,5% e 10%, nos Estados Unidos da América (EUA) e na União Europeia (UE), respetivamente.⁽¹²⁾ Tem o pico de absorção de radiação aos 311nm de comprimento de onda.⁽³⁾

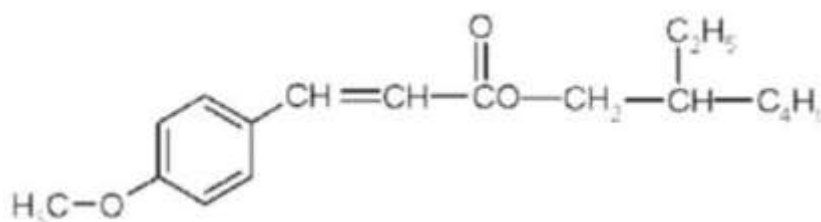


Figura 1: Estrutura química do OMC (a partir de Schreurs, R et al. 2002⁽²¹⁾)

Dada a crescente preocupação com o potencial efeito como DE dos filtros solares, foram realizados alguns estudos para avaliar se o OMC poderia ser um dos filtros com essa potencialidade. Em alguns estudos revelou ter atividade estrogénica quer *in vivo*, quer *in vitro*^(11, 19, 21-25), efeitos no eixo hipotálamo-hipófise-tiróide, também quer *in vitro* quer *in vivo*.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Um estudo demonstrou ainda que o OMC se comportou como um antagonista forte contra os recetores de progesterona (PR).⁽²⁵⁾ Não foi descrita atividade androgénica ou antiandrogénica *in vitro*.^(25, 29) Foram ainda documentadas alterações na libertação de neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) em estudos *in vitro*.^(30, 31)

1.3.1. Atividade estrogénica

Relativamente aos estudos *in vitro*, um deles revelou que o OMC levou à proliferação de células do cancro da mama MCF-7, exercendo cerca de 77,18% do efeito observado com o estradiol, e com uma EC₅₀ de 2,37µM.⁽¹¹⁾ Um outro estudo levou à expressão do gene pS2, também em linhas celulares MCF-7, corroborando o seu potencial efeito estrogénico.⁽²²⁾

A afinidade de ligação do OMC pelos recetores de estrogénio α (ERα) e recetores de estrogénio β (ERβ) também foi investigada⁽¹⁹⁾. O OMC revelou capacidade de transativação do ERα^(19, 21), tendo sido considerado um agonista dos ERα fraco.⁽²⁵⁾ No que concerne aos estudos *in vivo*, foi documentado um efeito uterotrófico dose-dependente em ratos imaturos após ingestão oral de OMC de 268 a 2667 mg/kg/dia.⁽¹¹⁾ Em ratos fêmeas adultos ooforectomizados foi observado aumento de peso, aumento de expressão de ERβ e do gene C3 no útero, após administração oral de OMC de 10 a 1000 mg/kg/dia, durante cinco dias.⁽²³⁾

Foi ainda demonstrado um aumento da concentração plasmática de vitelogenina (VTG), um marcador clássico de atividade estrogénica, bem como aumento da expressão de mRNA de VTG e de ERα no fígado de peixes da espécie *O. Latipes*, expostos ao OMC em concentrações de 0,034 a 34 mM durante cerca de sete dias.⁽²⁴⁾

Em ratos adultos ooforectomizados, que ingeriram diferentes quantidades de OMC, foi descrito um aumento da espessura do endométrio e miométrio, bem como do epitélio vaginal.⁽³²⁾ O mesmo estudo revelou ainda aumento da expressão de PR bem como de fator de crescimento de insulina tipo 1 (IGF-1), o que mais uma vez demonstra o seu potencial efeito estrogénico.⁽³²⁾ Um estudo do mesmo género documentou diminuição dos depósitos de tecido adiposo, dos níveis séricos de leptina, dos níveis de triglicéridos, colesterol sérico, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL).⁽³³⁾

1.3.2. Atividade tiroideia

Um estudo *in vivo* em ratos ooforectomizados com ingestão de OMC entre 2,5 e 12,5 mg/kg durante 12 semanas, revelou diminuição dos níveis séricos de T4 e diminuição da expressão da

enzima 5' desiodinase no fígado.⁽²⁶⁾ Adicionalmente foi documentado uma diminuição de até 38% dos níveis de hormona estimuladora da tiroide (TSH), uma diminuição de até 63% dos níveis de T3 e até 75% dos níveis de T4 em ratos alimentados com diferentes dosagens de OMC.⁽²⁷⁾ Foi ainda demonstrado, *in vitro*, uma diminuição da captação de iodo pelas células da tiroide, e ainda transativação dos recetores da tiroide (TR) em células HepG2.⁽²⁸⁾

No entanto, um estudo pioneiro em humanos, com aplicação tópica de 2mg/cm² de protetor solar com 3 filtros solares diferentes, entre eles o OMC com concentração máxima de 10%, por todo o corpo, não revelou alterações estatisticamente significativas da homeostase das hormonas tiroideias em humanos adultos.⁽³⁴⁾

1.3.3. Vias de exposição ao OMC

Os indivíduos podem ser expostos ao OMC por absorção transdérmica, por ingestão pelo comportamento “mão-boca”, principalmente em crianças, e pelo uso de batons, e ainda pela inalação de partículas de produtos comercializados em spray.^(7, 10) Existe a hipótese de que o consumo de peixes contaminados poderá constituir uma via de exposição.⁽²²⁾

Um estudo experimental revelou que o OMC é absorvido pela pele, sendo detetado no plasma 1 a 2 horas depois da sua aplicação tópica. Demonstrou ainda que é excretado na urina, na ordem dos ng/mL.⁽³⁵⁾ As concentrações deste composto quer no plasma, quer na urina, revelaram-se diferentes em homens e mulheres, podendo pensar-se numa diferença de género na farmacocinética deste composto.⁽³⁵⁾

O OMC foi ainda detetado em amostras do leite materno humano.⁽³⁶⁾ Um estudo documentou a presença de OMC em cerca de 77,78% das amostras de leite materno humano.⁽³⁶⁾ Esta via poderá constituir um meio de exposição para os recém-nascidos. São necessários estudos para análise do líquido amniótico de modo a investigar se poderá existir exposição perinatal ao OMC.⁽¹²⁾

Dada a sua natureza lipofílica, o OMC tende a acumular-se no ambiente, principalmente nos ecossistemas aquáticos.^(11, 21) Foi detetado em amostras de água de rios da Suíça e em água de torneiras em Espanha, na ordem dos ng/L.^(37, 38) Foi ainda encontrado em amostras de pó de apartamentos privados, edifícios públicos e no habitáculo de veículos, na ordem dos µg/g.⁽³⁹⁾

1.4. Estrogénio e o seu efeito a nível vascular

Os estrogénios endógenos são hormonas sexuais esteróides que incluem a estrona (E1), estradiol (E2) e estriol (E3).⁽⁴⁰⁾ Afetam o desenvolvimento e função do sistema reprodutor feminino e promovem ainda o desenvolvimento e diferenciação de outros tecidos como tecido adiposo, sistema nervoso, sistema músculo-esquelético e sistema cardiovascular.⁽¹⁶⁾ Estudos apontam para o seu papel na modulação do tónus vascular, contribuindo para o relaxamento do músculo liso vascular.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾

Atuam em recetores de estrogénio (ER) que podem estar localizados no núcleo, alterando a expressão genética através da ligação a certas regiões do DNA ou pela ativação de fatores de transcrição (efeitos genómicos), ou podem estar localizados na superfície da célula, iniciando rapidamente a ativação de diversos mensageiros secundários (efeitos não genómicos).⁽⁴¹⁾

Estudos recentes, têm relacionado a ativação dos efeitos genómicos com o recetor membranar ao qual o E2 se liga com alta afinidade, o GPR30. Este recetor tem 7 domínios transmembranares e é acoplado à proteína G. Pode estar localizado quer no retículo endoplasmático quer na membrana plasmática e, é possível que seja responsável por ações rápidas, não genómicas dos estrogénios, uma vez que poderá ativar várias vias de sinalização (Figura 2).⁽⁴⁰⁾

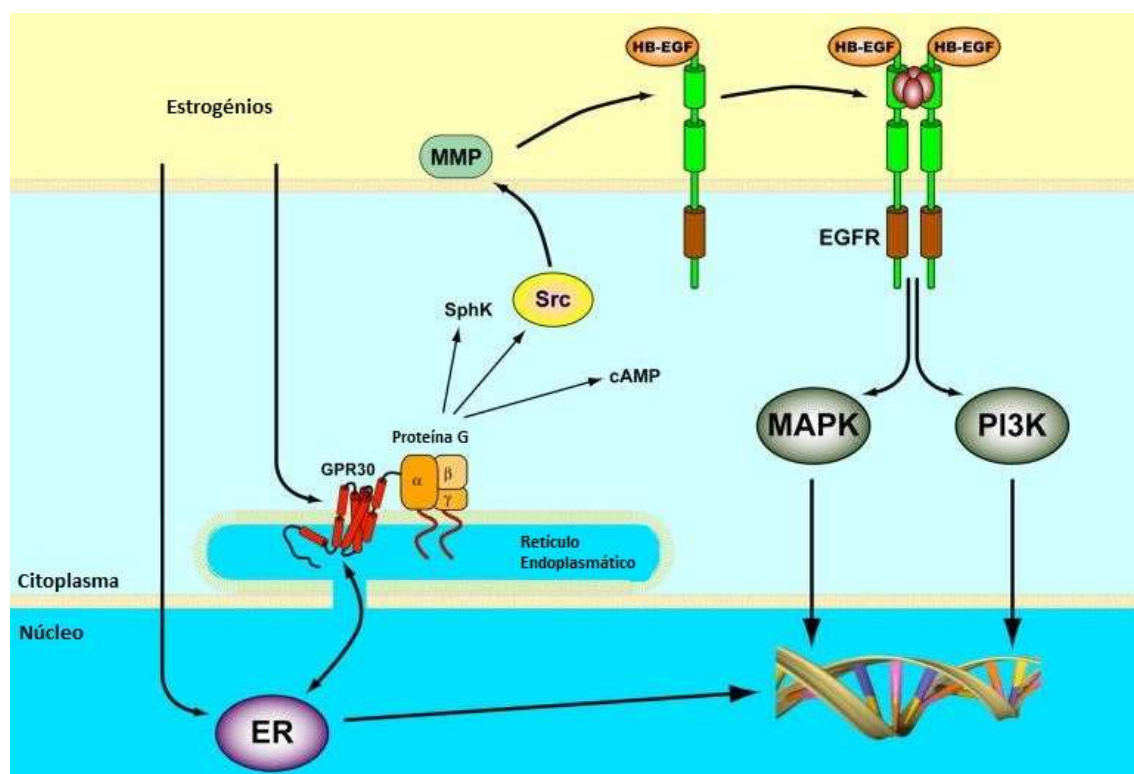


Figura 2 Vias de sinalização ativadas pelo GPR30. ER: recetor de estrogénio; MMP: metaloproteínase da matriz; HB-EGF: fator de crescimento epidérmico ligado ao heparano; SphK: esfingosina cinase; EGFR: recetor do fator de crescimento epidérmico; MAPK: proteína cinase ativadora de mitógenos; PI3K: fosfatidilinositol 3-cinase (adaptado de Prossnitz and Maggiolini 2009 ⁽⁴³⁾)

A ligação dos estrogénios ao recetor GPR30 leva à dissociação da subunidade α -GTPase do complexo heterotrimérico $G\alpha\beta\gamma$ -GTPase.⁽⁴⁰⁾ A subunidade $G\beta\gamma$ -GTPase dissociada leva à ativação da Src cinase e da esfingosina cinase (SphK) que, por sua vez, ativam metaloproteínases da matriz (MMPs).⁽⁴⁴⁾ As MMPs clivam o fator de crescimento epidérmico ligado ao pro-heparano (pro-HB-EGF) da superfície celular, libertando o fator de crescimento epidérmico ligado ao heparano (HB-EGF). Este leva à transativação do recetor do factor de crescimento epidérmico (EGFR).^(40, 44, 45) O EGFR dá início a uma série de eventos celulares, entre os quais, a ativação da fosfolipase C (PLC), proteínas cinases ativadoras de mitógenos (MAPKs) e fosfatidilinositol 3-cinase (PI3Ks).⁽⁴⁴⁾ A subunidade $G\alpha$ -GTPase ativa a adenil ciclase,

levando à libertação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP).^(40, 44, 45) Este mensageiro secundário, por intermédio da proteína cinase A (PKA), leva à supressão da actividade de Erk1/2 induzida por EGFR.^(40, 45)

Tendo em conta o mecanismo de ação descrito, conclui-se que o recetor GPR30, após a ligação dos estrogénios, pode apresentar dois mecanismos distintos, com efeitos opostos no eixo EGFR-MAPKs.

Efeitos não genómicos são efeitos rápidos, independentes da síntese proteica, envolvendo proteínas reguladoras ligadas à membrana ou citoplasmáticas.⁽¹⁶⁾ Demoram entre segundos a minutos a iniciarem a sua ação, são efeitos reversíveis, e são insensíveis a inibidores da síntese proteica.⁽⁴²⁾ Os estrogénios podem apresentar efeitos não genómicos vasorelaxantes em diversas artérias.⁽⁴⁰⁾ Os efeitos vasculares não genómicos dos estrogénios podem ser divididos em mecanismos dependentes do endotélio ou mecanismos independentes do endotélio.⁽⁴²⁾

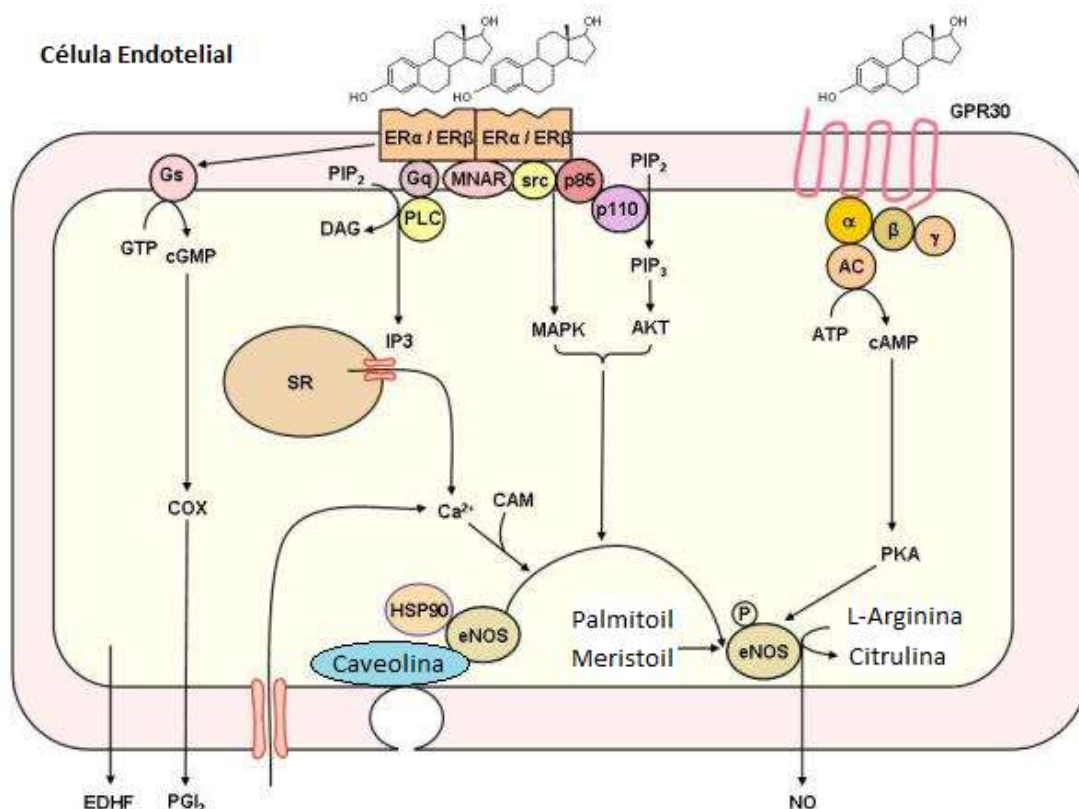


Figura 3 Mecanismos não genómicos de relaxamento do músculo liso vascular, dependentes do endotélio. SR: retículo sarcoplasmático; CAM: calmodulina; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial; MAPK: proteína cinase ativadora de mitógenos; AKT: proteína cinase B; PKA: proteína cinase A; COX: cicloxigenase; PGI₂: prostaciclina; NO: óxido nítrico; EDHF: fator hiperpolarizante derivado do endotélio (adaptado de Smiley, D. A. 2009⁽⁴⁰⁾)

Em relação aos efeitos dependentes do endotélio (Figura 3), a ligação dos estrogénios aos recetores de superfície de membrana leva à ativação de uma cascata de transdução de sinal e ativação de mensageiros secundários que culminam na ativação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) levando à produção de óxido nítrico (NO), e ainda à ativação da cicloxigenase

Um outro mecanismo celular que leva à contração do músculo liso é a ativação da proteína RhoA. Esta por sua vez ativa a Rho cinase (RhoK). A RhoK fosforila e inativa a MLC fosfatase, aumentando a quantidade de MLC fosforilada, promovendo a contração.⁽⁴⁰⁾

A ligação dos estrogénios a recetores na superfície da membrana plasmática, através de um efeito não genómico, pode interromper uma série de mecanismos celulares que levam à contração de células do músculo liso vascular.

A ativação de canais de potássio levando à hiperpolarização de membrana; a inibição dos canais de cálcio, inibindo desta forma a fosforilação das MLC dependentes de cálcio e, consequentemente, a contração do músculo vascular liso⁽⁴⁰⁾, são algumas das hipóteses da ação não genómica dos estrogénios.⁽⁴⁰⁾ Também se pensa que os estrogénios possam inibir a expressão e atividade da RhoK.⁽⁴⁰⁾

A modulação dos canais iónicos é um dos principais efeitos das ações não genómicas dos estrogénios.⁽⁴²⁾ Em células do músculo liso vascular o estrogénio inibe os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem.⁽⁴²⁾ Um estudo realizado no músculo liso de artérias aortas de ratos documentou que o relaxamento vascular verificado com o 17 β -Estradiol era devido à inibição dos canais de Ca^{2+} operados por voltagem do tipo L (LTCC).⁽⁴²⁾

1.5. Enquadramento e Objetivo da Investigação

Tendo em conta que o OMC é um dos filtros solares mais utilizados em protetores solares e cosméticos e, após alguns estudos *in vitro* e *in vivo*, questiona-se a sua segurança, quer para os seres vivos, quer para os ecossistemas.^(9, 12, 20) Foi considerada uma substância de grande preocupação relativamente ao seu risco para a saúde.⁽¹²⁾

Estima-se que cerca de 75% da superfície da pele está, muitas vezes diariamente, em contacto com protetores solares ou outros produtos cosméticos contendo filtros UV, por um período de 3 a 4 meses, no verão.⁽²²⁾ Assim sendo, e dada a sua natureza lipofílica com tendência à bioacumulação, depreende-se que seja uma substância à qual os indivíduos estão em constante exposição.

Questiona-se até que ponto a aplicação de produtos cosméticos será inócua, dado que não existe informação acerca da farmacocinética dos filtros UV no organismo.^(11, 46)

Tendo em conta o seu potencial efeito estrogénico como disruptor endócrino, já anteriormente referido em alguns estudos, levanta-se a hipótese de que o OMC poderá apresentar efeitos a nível vascular, semelhantes aos do estrogénio. Ainda não foram elaborados estudos de modo a avaliar a sua ação no sistema cardiovascular.

A presente investigação tem assim como objetivo testar os efeitos do OMC nas artérias umbilicais humanas (AUH), de modo a avaliar os seus possíveis efeitos não genómicos, rápidos, e se estes se assemelham aos do estrogénio a nível vascular, uma vez que existe evidência científica de que o OMC possa exercer efeitos estrogénicos como DE no organismo.

2. Material e Métodos

2.1. Extração e preparação das artérias umbilicais humanas (AUH)

Pedaços de cordão umbilical, com cerca de 3-7cm, foram obtidos de partos termo, por via vaginal, de grávidas sem patologia, com o consentimento das mesmas. Todos os procedimentos levados a cabo com os cordões umbilicais humanos foram aprovados pelo Comité de ética do Centro Hospitalar da Cova da Beira EPE.

As amostras de cordão umbilical foram colhidas em solução salina fisiológica estéril (PSS; composição, mM: NaCl 110; CaCl₂ 0.15; KCl 5; MgCl₂ 2; HEPES 10; NaHCO₃ 10; KH₂PO₄ 0.5; NaH₂PO₄ 0.5; Glucose 10; EDTA 0.49). De modo a evitar a contaminação e degradação tecidual, foram adicionados à solução de PSS: penicilina (5 U/ml), estreptomicina (5 µg/ml), anfotericina B (12.5 ng/ml), e antiproteases (leupeptina 0.45 mg/l, benzamidina 26 mg/l, e inibidor de tripsina 10 mg/l). As amostras de cordão umbilical foram mantidas à temperatura de 4°C por 4-24 h.

Todos os procedimentos até à obtenção da túnica média foram realizados à temperatura de 0-4°C, em placas de Petri contendo PSS. Inicialmente, a geleia de Wharton que circunda as artérias, e a veia umbilical, foram removidas, cautelosamente, com o auxílio de tesouras e pinças. A parede mais espessa das artérias facilita a remoção do tecido conjuntivo adjacente.

Posteriormente, as artérias foram cortadas em anéis de 3-5mm utilizando tesouras. A túnica íntima (endotélio) foi removida mecanicamente por fricção de uma linha de algodão no lúmen da artéria. Estes pedaços de artéria sem endotélio foram colocados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), à temperatura de 0-4°C por cerca de 24h e, de seguida, utilizados para estudos de contratibilidade.

2.2. Estudo de contratibilidade arterial

Anéis de artéria umbilical humana sem a túnica íntima foram colocados em câmaras de banho de órgãos (LE01.004, Letica) contendo solução de Krebs (composição, mmol/L: NaCl 119, KCl 5.0, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 0.5, MgSO₄ 1.2, EDTA 0.03, glucose 11) à temperatura de 37°C, continuamente em contacto com carbogénio.

Os anéis das artérias foram suspensos em 2 arames paralelos de aço inoxidável e a medição da tensão em gramas (g) foi realizada utilizando transdutores isométricos (TRI201, Panlab SA,

Spain), amplificador (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments), interface PowerLab/4SP (ML750, ADInstruments), e sistema compurizado com software Chart5PowerLab (ADInstruments).

Para análise, a tensão isométrica medida foi expressa em miligramas (mg) de força provocada pela artéria na presença de drogas. Para analisar os dados de relaxamento, utilizou-se a percentagem de redução da tensão na contração máxima induzida por agentes contráteis (serotonina (5-HT 1 μ M) e cloreto de potássio (KCl60 mM)). Durante os períodos de repouso, a solução no banho de órgãos foi mudada de 15 em 15 minutos. Inicialmente, os anéis das artérias foram equilibrados por 60 minutos até alcançar uma tensão de repouso de 1,5 gramas. Posteriormente, as artérias foram colocadas em contacto com serotonina (5-HT 1 μ M) para testar a sua viabilidade. Artérias que induziram uma concentração máxima menor que 1,5 gramas, quando em contacto com 5-HT, foram excluídas do estudo. Posteriormente, as artérias foram contraídas com KCl (60 mM) e 5-HT e o efeito vascular do OMC nestas contrações foi avaliado. O efeito do OMC nas AUH sem endotélio foi analisado nas seguintes concentrações: 1-100 nM e 1-50 μ M. Foram utilizadas estas concentrações com base no trabalho de Schlumpf, Cotton et al. 2001.⁽¹¹⁾ Procedimentos de controlo com etanol, o veículo usado para dissolver o OMC, foram sempre realizados.

2.3. Químicos

Durante a realização deste trabalho foram utilizados diversos compostos químicos e drogas obtidos na Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal), nomeadamente OMC, serotonina e etanol.

2.4. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Foram analisados utilizando o Sistema de Análise Estatística SIGMASTAT, versão 4.00 (Systat Software, London, UK). A significância estatística entre dois grupos de dados foi analisada utilizando o teste T de Student. A comparação entre mais de dois grupos de dados foi analisada segundo o método ANOVA (one-way) seguido do teste post-hoc, teste de Tukey ou Dunnett, para determinar as diferenças significativas entre as médias.

As diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significativas com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Efeitos vasculares diretos do OMC em AUH

Anéis de artérias umbilicais humanas (AUH) sem endotélio foram contraídos com 5-HT (1 μM) e KCl (60 mM), tendo-se obtido contrações estáveis após 5 a 10 minutos, aproximadamente. A média de contração máxima obtida, em gramas, com 5-HT e KCl é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Resposta Contrátil Máxima em gramas (g) em resposta à Serotonina (5-HT) e KCl 60mM nas AUH com OMC e controlo com Etanol. Os dados são expressos como média \pm erro padrão de (n) experiências.

Agente contrátil	OMC	Controlo
5-HT 1 μM	1,632 \pm 0,191 (9)	1,923 \pm 0,199 (7)
KCl 60mM	1,723 \pm 0,276 (7)	1,829 \pm 0,212 (7)

Após terem atingido a contração máxima, as AUH sem endotélio foram colocadas em contacto com concentrações crescentes de OMC (1-100 nM e 1-50 μM), a cada, aproximadamente, 5 minutos, de modo a avaliar o seu efeito a nível vascular. Os procedimentos de controlo foram realizados simultaneamente com etanol, veículo utilizado para dissolver o OMC. Os efeitos observados eram reversíveis uma vez que, após lavagem com solução de Krebs, estes foram revertidos.

3.1.1. Efeitos do OMC na contração das AUH com 5-HT

A contração máxima atingida nas AUH com 5-HT está descrita na Tabela 1. Verificou-se que o OMC exerceu um efeito vasorelaxante, tal como evidenciado no Gráfico 1. O efeito máximo ocorreu na concentração de 50 μM , tendo-se obtido um relaxamento de cerca de 16,127 \pm 4,472% da contração máxima atingida.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$, teste T de Student) entre o grupo de AUH em contacto com OMC e o grupo de AUH de controlo com o solvente utilizado, nas concentrações de 1 e 50 μM (Gráfico 1).

O grupo de controlo não evidenciou um efeito vasorelaxante nas AUH sem endotélio.

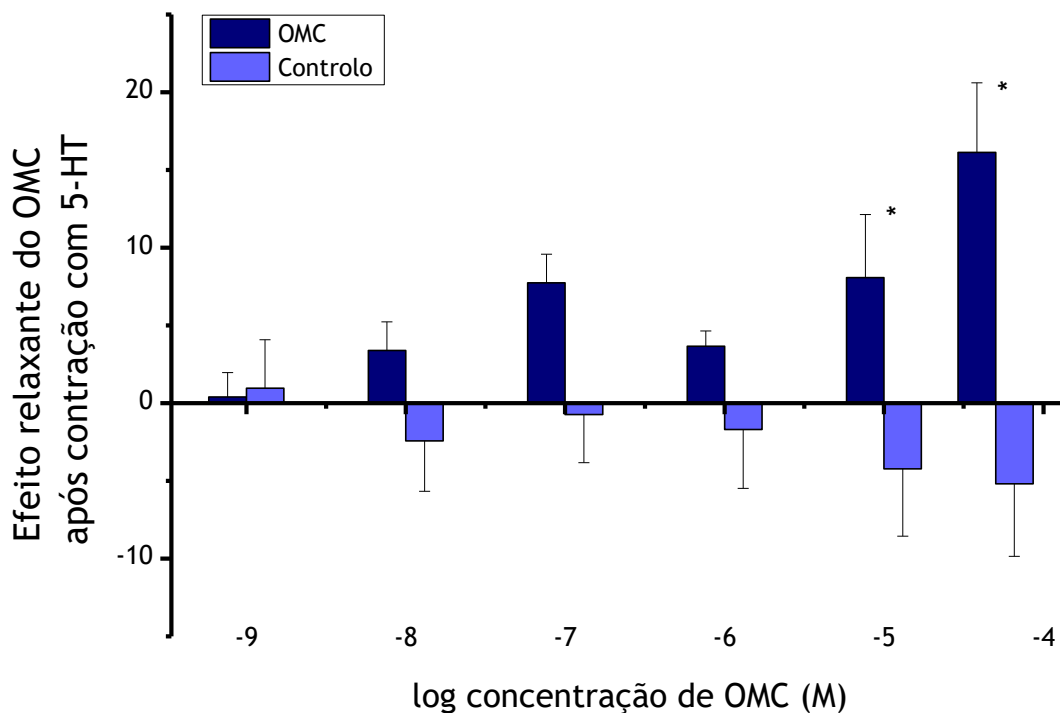


Gráfico 5: Efeito relaxante do OMC (%) em AUH sem endotélio após contração com serotonina (5-HT μM; n=9). Como controlo foi usado o solvente do OMC (n=7). As barras correspondem à média e as linhas verticais ao erro padrão, de (n) experiências. *p<0,05 entre os efeitos do OMC com o respetivo controlo, teste T de Student.

3.1.2. Efeitos do OMC na contração das AUH com KCl

A contração máxima atingida nas AUH com KCl 60 mM está descrita na Tabela 1. Verificou-se que o OMC exerceu um efeito vasorelaxante, tal como evidenciado no Gráfico 2. O efeito máximo ocorreu na concentração de 50 μM, tendo-se obtido um relaxamento de cerca de 20,179%±5,036%.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p<0,05, teste T de Student) entre o grupo de AUH em contacto com OMC e o grupo de AUH de controlo, nas concentrações de 1 nM, 1 μM, 10 μM e 50 μM (Gráfico 2).

O grupo de controlo não evidenciou um efeito vasorelaxante nas AUH sem endotélio.

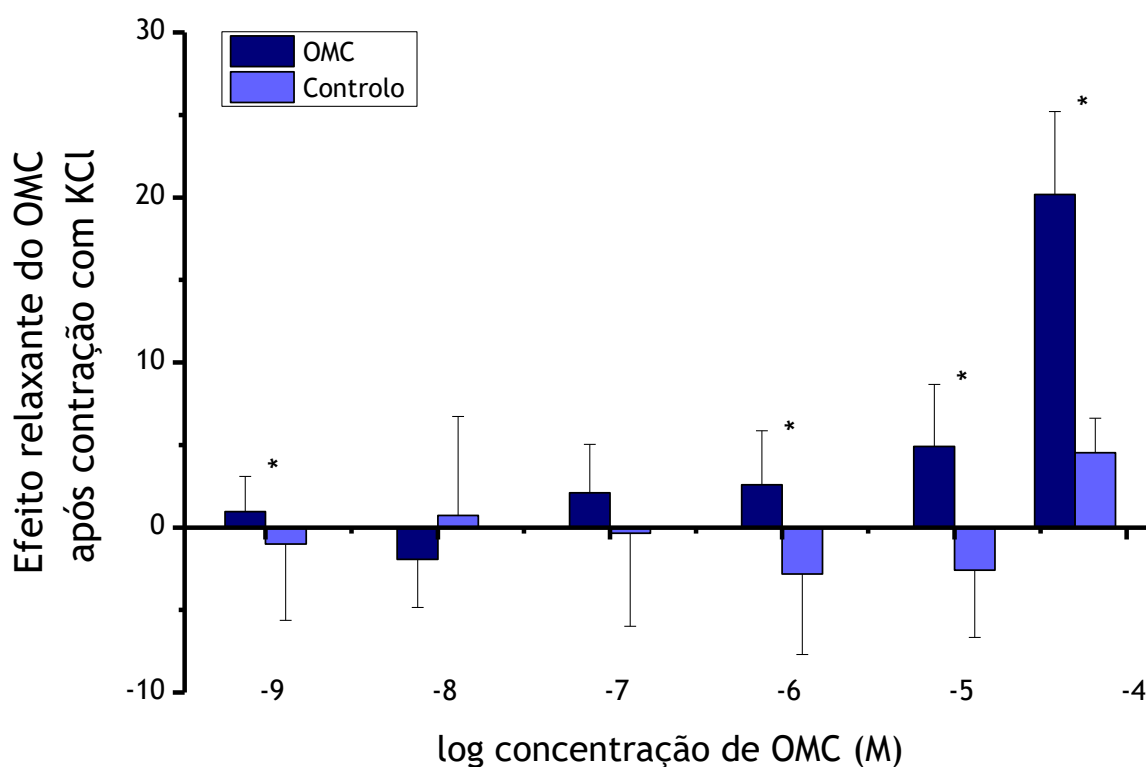


Gráfico 6: Efeito relaxante do OMC em AUH sem endotélio (%), após contração com KCl (60mM; n=7). Como controlo foi usado o solvente do OMC (n=7). As barras correspondem à média e as linhas verticais ao erro padrão, de (n) experiências. * $p < 0,05$ entre os efeitos do OMC com o respetivo controlo, teste T de Student.

Em suma, o OMC exerceu um efeito relaxante, quer nas artérias contraídas com 5-HT, quer nas artérias contraídas com KCl 60mM.

3.1.3. Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis

Ocorreu um relaxamento semelhante entre os dois agentes contráteis nas AUH sem endotélio nas diferentes concentrações de OMC ($p > 0,05$, teste T de Student), com efeito máximo na concentração 50 μM de $16,127\% \pm 4,472\%$ e $20,179\% \pm 5,036\%$, respetivamente (Gráfico 3).

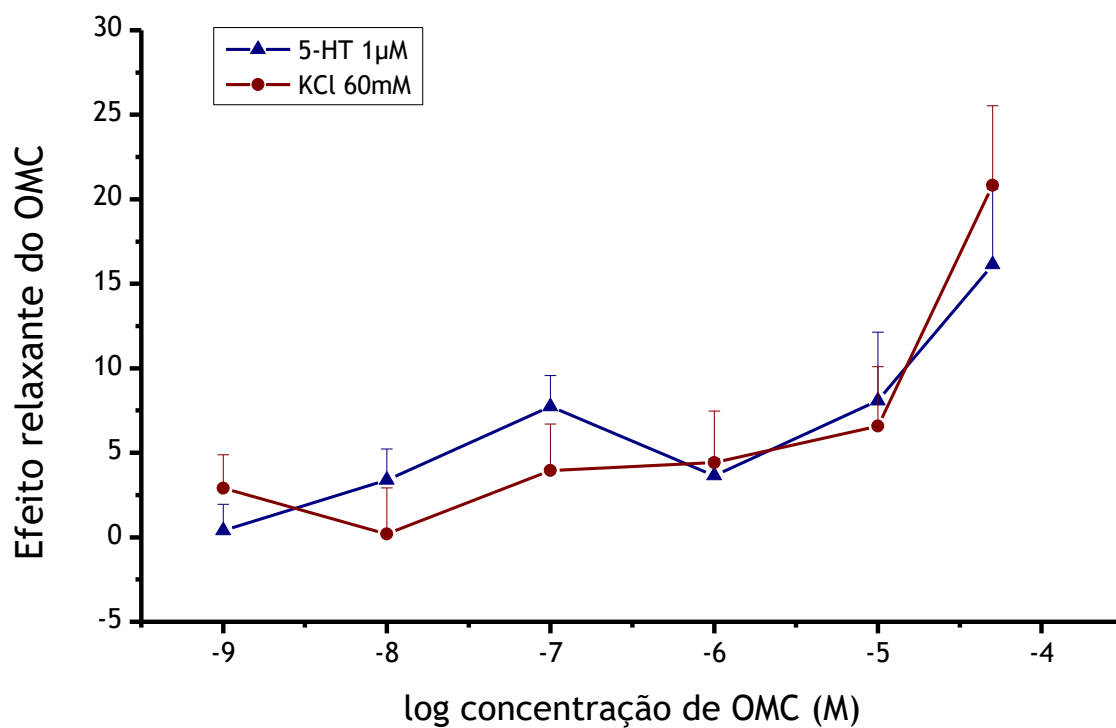


Gráfico 7: Efeito relaxante (%) do OMC (log [OMC]) em AUH sem endotélio contraídas com serotonina (5-HT; n=9) e com KCl 60mM (n=7). Cada ponto representa a média e as linhas verticais o erro padrão, do número (n) de experiências indicado.

4. Discussão

No presente estudo foi avaliada a resposta vascular ao OMC em AUH sem endotélio. Os dados demonstraram que o OMC exerceu um efeito vasorelaxante, quer nas artérias contraídas com 5-HT (1 μ M), quer nas artérias contraídas com KCl 60mM, verificando-se o efeito máximo na concentração de 50 μ M para ambos os agentes contráteis. A resposta vasorelaxante também foi semelhante entre os dois agentes contráteis.

A nível vascular, os estrogénios podem exercer efeitos genómicos e não genómicos que conduzem ao vasorelaxamento.⁽⁴⁰⁾ Na via genómica, clássica, os ER atuam como fatores de transcrição, modulando a expressão genética.⁽⁴⁰⁾

Relativamente ao OMC, alguns autores tentaram ligar a sua ação como possível DE através da avaliação do seu potencial efeito estrogénico a nível genómico.

Foi documentada a proliferação de células do cancro da mama MCF-7, exercendo cerca de 77,18% do efeito observado com o estradiol.⁽¹¹⁾ Os efeitos foram considerados estatisticamente significativos a partir da concentração de 10 μ M⁽¹¹⁾, tal como nesta investigação. Um outro estudo também em linhas celulares MCF-7 revelou que o OMC levou à expressão do gene pS2, a partir da concentração de 1 μ M.⁽²²⁾ A expressão deste gene é considerada uma medida da estrogenicidade do OMC.⁽²²⁾

O mecanismo de ação pelo qual o OMC possa exercer os seus efeitos estrogénicos ainda não é conhecido. Foi investigada a afinidade de ligação do OMC pelos recetores de ER α e ER β ^(19, 21). Foi caracterizado como um agonista fraco dos RE α , mas também como um potente antagonista PR.⁽²⁵⁾ Adicionalmente, foi observada capacidade de transativação do ER α entre as concentrações de 0,1 e 10 μ M.⁽¹⁹⁾ No entanto, numa outra investigação, apenas foi observada transcrição genética do ER α estatisticamente significativa na dose de 100 μ M.⁽²¹⁾

No que concerne aos estudos *in vivo*, foi documentado um efeito uterotrófico dose-dependente em ratos imaturos após ingestão oral de OMC de 268 a 2667 mg/kg/dia.⁽¹¹⁾ Em ratos fêmeas adultos ooforectomizados foi observado aumento de peso, aumento de expressão de RE β e do gene C3 no útero, após administração oral de OMC de 10 a 1000 mg/kg/dia, durante cinco dias.⁽²³⁾

Existem, no entanto, algumas investigações que contrariam a premissa de que o OMC poderá exercer um efeito estrogénico. Morohoshi, Yamamoto et al. 2005⁽⁴⁷⁾ não detetaram qualquer actividade estrogénica, nomeadamente a ligação competitiva aos ER avaliada por ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática). Provavelmente não foram encontrados efeitos estrogénicos dado que a dose mais alta avaliada foi de 37,5 μ M.⁽⁴⁷⁾ Também não foi detetada atividade

estrogénica por Kunz e Fent 2006⁽⁴⁸⁾. Pelo contrário, foi observada atividade antiestrogénica a partir da concentração de 100 μM num ensaio com leveduras que expressavam ER α humano.⁽⁴⁸⁾ Tendo em conta os achados contraditórios destes autores, pode-se colocar a hipótese de que o OMC possa exercer os efeitos por outros mecanismos não relacionados diretamente com os RE.⁽⁴⁸⁾

Os efeitos não genómicos são respostas que ocorrem de forma demasiado curta para serem mediadas pela transcrição genética, e são independentes da síntese proteica.⁽⁴⁰⁾ Os estrogénios exercem um efeito não genómico vasorelaxante que envolve a ativação de cinases e fosfatases que alteram o fluxo iónico através da membrana plasmática.⁽⁴⁰⁾ Estes efeitos podem ser dependentes ou independentes do endotélio.

Um estudo realizado também em AUH verificou que o 17 β -Estradiol relaxou as artérias em cerca de 25 a 29%, com efeito máximo na concentração de 100 μM .⁽⁴⁹⁾ Em artérias epiploicas humanas, foi descrito um efeito vasodilatador do 17 β -Estradiol na concentração de 3 μM .⁽⁵⁰⁾ Um estudo realizado por este grupo de investigação demonstrou que o 17 β -Estradiol exerce um efeito de relaxamento vascular independente do endotélio, a partir da concentração de 10 μM em artérias aortas de ratos.⁽⁴²⁾

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, coloca-se a hipótese de que o OMC poderá desencadear o vasorelaxamento de forma semelhante ao 17 β -Estradiol, por um mecanismo não genómico e independente do endotélio.

A modulação dos canais iónicos é um dos principais efeitos das ações não genómicas dos estrogénios.⁽⁴²⁾ Em células do músculo liso vascular o estrogénio inibe os canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem.⁽⁴²⁾ Um estudo realizado no músculo liso de artérias aortas de ratos documentou que o relaxamento vascular verificado com o 17 β -Estradiol era devido à inibição dos canais de Ca²⁺ operados por voltagem do tipo L (LTCC).⁽⁴²⁾

Recentemente tem-se dado muita atenção ao recetor GPR30. É um recetor acoplado à proteína G, com grande afinidade para o E2, que foi implicado na mediação de efeitos tanto diretos, não genómicos, como indiretos, relacionados com a transcrição genética. Uma vez ativado, pode apresentar dois mecanismos de ação distintos, com efeitos opostos no eixo EGFR-MAPKs.^(40, 45) Não existem muitos dados publicados relativamente ao seu mecanismo de ação a nível vascular. Um estudo no músculo liso de artérias mesentéricas de ratos, sem endotélio, demonstrou que a ação do agonista do GPR30, o G-1, levou a um efeito de vasorelaxamento. Este foi atribuído à ativação da adenil ciclase com consequente aumento da produção de cAMP.⁽⁵¹⁾

Não existem estudos publicados relativamente ao efeito do OMC a nível vascular, bem como o seu possível papel como DE e no desenvolvimento de patologias cardiovasculares. O presente estudo foi pioneiro nesse sentido. São necessários estudos adicionais de modo a averiguar se o OMC poderá atuar sobre o recetor GPR30. A sua ligação a este recetor poderá desencadear um aumento do cAMP no músculo liso vascular, o que poderá constituir um mecanismo de ação pelo qual o OMC exerça o efeito vasorelaxante não genómico independente do endotélio. São ainda necessárias investigações adicionais relativamente ao papel fisiológico do GPR30 para analisar os mecanismos celulares e moleculares que levam ao relaxamento vascular, uma vez que poderá constituir um alvo terapêutico em patologias cardiovasculares, nomeadamente na hipertensão arterial.

A natureza lipofílica com tendência à bioacumulação do OMC⁽²¹⁾, a constante exposição dos indivíduos a este composto uma vez que se trata de um dos filtros UV mais utilizado⁽¹²⁾, bem como a falta de informação relativamente aos seus efeitos biológicos no organismo humano, coloca em causa o seu perfil de segurança, quer para os indivíduos, quer para o ecossistema.

Igualmente importante seria avaliar a farmacocinética do OMC no organismo humano, uma vez que este foi detetado no plasma 1 a 2 horas depois da sua aplicação tópica e apresentou excreção urinária, na ordem dos ng/mL.⁽³⁵⁾ Foi ainda detetado em amostras do leite materno humano, podendo constituir uma forma de exposição para os recém nascidos⁽³⁶⁾. São necessários estudos para análise do líquido amniótico de modo a investigar se poderá existir exposição perinatal ao OMC e quais as possíveis repercussões.⁽¹²⁾

5. Conclusão

Este estudo demonstrou que o OMC tem um efeito não genómico vasorelaxante por um mecanismo independente do endotélio. Sendo este efeito vasorelaxante similar aos efeitos dos estrogénios a nível vascular, corroborando a hipótese que o OMC poderá exercer um efeito estrogénico como DE. São necessários estudos adicionais para avaliar o papel do recetor GPR30 neste mecanismo, bem como as alterações celulares e moleculares que levam ao vasorelaxamento. É ainda importante que se desenvolvam estudos para que se possa averiguar o perfil de segurança do OMC.

6. Bibliografia

1. Pathak MA. Sunscreens: topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1982;7(3):285-312.
2. Skotarczak K, Osmola-Mankowska A, Lodyga M, Polanska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: facts and controversies. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2015;19(1):98-112.
3. Burnett ME, Hu JY, Wang SQ. Sunscreens: obtaining adequate photoprotection. *Dermatologic therapy*. 2012;25(3):244-51.
4. Mancebo SE, Hu JY, Wang SQ. Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. *Dermatologic clinics*. 2014;32(3):427-38, x.
5. Touitou E, Godin B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinics in dermatology*. 2008;26(4):375-9.
6. Diffey BL. Ultraviolet radiation and human health. *Clinics in dermatology*. 1998;16(1):83-9.
7. Maipas S, Nicolopoulou-Stamati P. Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. *Hormones (Athens, Greece)*. 2015;14(1):32-46.
8. Loden M, Beitner H, Gonzalez H, Edstrom DW, Akerstrom U, Austad J, et al. Sunscreen use: controversies, challenges and regulatory aspects. *The British journal of dermatology*. 2011;165(2):255-62.
9. Duale N, Olsen AK, Christensen T, Butt ST, Brunborg G. Octyl methoxycinnamate modulates gene expression and prevents cyclobutane pyrimidine dimer formation but not oxidative DNA damage in UV-exposed human cell lines. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;114(2):272-84.
10. Nicolopoulou-Stamati P, Hens L, Sasco AJ. Cosmetics as endocrine disruptors: are they a health risk? *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2016.
11. Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental health perspectives*. 2001;109(3):239-44.

12. Krause M, Klit A, Blomberg Jensen M, Soeborg T, Frederiksen H, Schlumpf M, et al. Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International journal of andrology*. 2012;35(3):424-36.
13. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*. 2011;73:135-62.
14. De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*. 2012;2012:713696.
15. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: fact or urban legend? *Toxicology letters*. 2013;223(3):295-305.
16. Hampl R, Kubatova J, Starka L. Steroids and endocrine disruptors-History, recent state of art and open questions. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2016;155(Pt B):217-23.
17. Safe S. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. *Toxicology*. 2004;205(1-2):3-10.
18. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens, Greece)*. 2010;9(1):9-15.
19. Gomez E, Pillon A, Fenet H, Rosain D, Duchesne MJ, Nicolas JC, et al. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2005;68(4):239-51.
20. Hanson KM, Narayanan S, Nichols VM, Bardeen CJ. Photochemical degradation of the UV filter octyl methoxycinnamate in solution and in aggregates. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2015;14(9):1607-16.
21. Schreurs R, Lanser P, Seinen W, van der Burg B. Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Archives of toxicology*. 2002;76(5-6):257-61.
22. Heneweer M, Muusse M, van den Berg M, Sanderson JT. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 2005;208(2):170-7.

23. Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Jarry H. Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate in vivo A 5-day sub-acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats. *Toxicology*. 2005;215(1-2):90-6.
24. Inui M, Adachi T, Takenaka S, Inui H, Nakazawa M, Ueda M, et al. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*. 2003;194(1-2):43-50.
25. Schreurs RH, Sonneveld E, Jansen JH, Seinen W, van der Burg B. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2005;83(2):264-72.
26. Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*. 2004;205(1-2):95-102.
27. Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Schmutzler C, Gotthardt I, Kohrle J, et al. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology*. 2007;238(2-3):192-9.
28. Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, et al. Endocrine disruptors and the thyroid gland--a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environmental health perspectives*. 2007;115 Suppl 1:77-83.
29. Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2003;74(1):43-50.
30. Szwarcfarb B, Carbone S, Reynoso R, Bollero G, Ponzo O, Moguilevsky J, et al. Octyl-methoxycinnamate (OMC), an ultraviolet (UV) filter, alters LHRH and amino acid neurotransmitters release from hypothalamus of immature rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2008;116(2):94-8.
31. Carbone S, Szwarcfarb B, Reynoso R, Ponzo OJ, Cardoso N, Ale E, et al. In vitro effect of octyl - methoxycinnamate (OMC) on the release of Gn-RH and amino acid neurotransmitters by hypothalamus of adult rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2010;118(5):298-303.

32. Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W. Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)--2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;210(3):246-54.
33. Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W. Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicology and applied pharmacology*. 2006;214(1):1-7.
34. Janjua NR, Kongshoj B, Petersen JH, Wulf HC. Sunscreens and thyroid function in humans after short-term whole-body topical application: a single-blinded study. *The British journal of dermatology*. 2007;156(5):1080-2.
35. Janjua NR, Kongshoj B, Andersson AM, Wulf HC. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2008;22(4):456-61.
36. Schlumpf M, Kypke K, Wittassek M, Angerer J, Mascher H, Mascher D, et al. Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*. 2010;81(10):1171-83.
37. Fent K, Zenker A, Rapp M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2010;158(5):1817-24.
38. Diaz-Cruz MS, Gago-Ferrero P, Llorca M, Barcelo D. Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2012;402(7):2325-33.
39. Negreira N, Rodriguez I, Rubi E, Cela R. Determination of selected UV filters in indoor dust by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2009;1216(31):5895-902.
40. Smiley DA, Khalil RA. Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current medicinal chemistry*. 2009;16(15):1863-87.
41. Watson CS, Jeng YJ, Guptarak J. Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011;127(1-2):44-50.

42. Cairrao E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. Non-genomic vasorelaxant effects of 17beta-estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca²⁺ current inhibition. *Acta pharmacologica Sinica*. 2012;33(5):615-24.
43. Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;308(1-2):32-8.
44. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual review of physiology*. 2008;70:165-90.
45. Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR, Jr., Bland KI. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2002;16(1):70-84.
46. Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, et al. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology*. 2004;205(1-2):113-22.
47. Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2005;19(4):457-69.
48. Kunz PY, Fent K. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic toxicology*. 2006;79(4):305-24.
49. Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 1999;6(1):27-31.
50. Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Vedernikov YP. Effects of estradiol-17 beta and progesterone on isolated human omental artery from premenopausal nonpregnant women and from normotensive and preeclamptic pregnant women. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1996;174(1 Pt 1):246-53.
51. Lindsey SH, Liu L, Chappell MC. Vasodilation by GPER in mesenteric arteries involves both endothelial nitric oxide and smooth muscle cAMP signaling. *Steroids*. 2014;81:99-102.