



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Efeitos genómicos do octilmetoxicinamato (OMC) a nível vascular

Margarida Ferreira Lorigo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira
Coorientador: Prof. Doutor José Ignacio Verde Lusquiños

Covilhã, 2017

Dedicatória

Esta dissertação é dedicada a todos as pessoas que, das mais variadas formas, contribuíram para a sua concretização. Dedico-a, ainda, a todos os que podem vir a beneficiar do seu conteúdo.

Agradecimentos

Em 1º lugar, e como não poderia deixar de o fazer, o meu primeiro agradecimento vai para uma pessoa muito especial: a Prof^a. Doutora Elisa Cairrão, a minha orientadora. Foi sem dúvida para mim um enorme privilégio poder trabalhar com alguém que esteve sempre presente para mim, desde o 1º até ao último dia. Quem sempre me apoiou em todos os momentos, me ouviu, me deu força, e acreditou sempre em mim mesmo quando eu não acreditei. Obrigada. Obrigada por todas as horas passadas comigo no laboratório, por todas as horas investidas em mim, e comigo, neste trabalho. Por tanto ter exigido de mim, por ter lutado a meu lado, e por me ter feito acreditar que no fim, tudo ia valer a pena. Porque valeu! Se hoje sou a investigadora que sou, a si o devo. E hoje as palavras são poucas para lhe conseguir expressar o meu sincero e, de coração: obrigada, por tudo*

Ao meu coorientador, o Prof. Doutor Ignacio Verde, quero agradecer por me ter dado a oportunidade de fazer parte deste grupo de investigação. Pela forma como me recebeu quando aqui cheguei, pela confiança que sempre depositou em mim, e por toda a atenção e disponibilidade prestadas. A si, o meu muito obrigada.

Ao prof^o Doutor Cláudio Maia, a quem agradeço profundamente toda a atenção, paciência e disponibilidade para comigo, para me ensinar genética. Por tudo aquilo que me transmitiu, e pela forma com que sempre me recebeu e ajudou, o meu muito obrigada.

Não posso deixar de expressar o meu sincero agradecimento, também, ao prof^o Doutor Luís Passarinha, por ter aceite o nosso pedido de ajuda na elaboração do protocolo de HPLC. Pela partilha de conhecimentos, por toda a atenção e disponibilidade prestadas, obrigada.

À Prof^a Doutora Luiza Granadeiro, por toda a amizade incondicional que demonstrou para comigo, ao longo desta caminhada. Por todos os sorrisos e brincadeiras, por todas as palavras de incentivo, e por todo o apoio, o meu sincero obrigada!

À prof^a Doutora Adriana Santos, por toda a amizade e por todos os momentos partilhados, ao longo deste último ano. Obrigada também por todos os conselhos que me deu, por toda a ajuda, e pelas incansáveis palavras de apoio.

Quero agradecer também à Prof^a Doutora Cândida Tomaz, por toda a amizade e por todos os momentos “extra”. Obrigada por todas as conversas, por toda a preocupação e por todo o apoio incondicional que sempre tem demonstrado para comigo.

E finalmente, queria agradecer também à prof^a Doutora Graça Baltazar, pela sua constante boa disposição, por toda a simpatia e preocupação demonstradas para comigo, o meu sincero obrigada*

Ao Nelson, também gostaria de agradecer toda a ajuda para o estudo dos protetores. Por toda a atenção, simpatia e boa disposição com que sempre me abordou. O meu obrigada. Gostaria de manifestar o meu agradecimento também à pequena Ana, por todas as brincadeiras e momentos que passámos juntas, que tanta força me deram nos momentos mais difíceis. Obrigada pequenina*

De uma forma muito especial, gostaria de agradecer também à Mestre Joana Feiteiro. Tu, que foste a 1ª que me recebeu, há 3 anos atrás quando nem imaginava o que o futuro me reservava. Hoje tenho a certeza que esta foi a melhor escolha que fiz, e em parte essa escolha deveu-se a ti. Obrigada. Obrigada, por tudo o que me transmitiste ao longo de todos estes anos, por teres estado sempre comigo em todos os momentos. Por toda a confiança que sempre depositaste em mim, por toda a ajuda constante, por tudo o que me ensinaste, e acima de tudo, por toda a amizade. Não tenho palavras suficientes para te agradecer por tudo. Muito Obrigada Joana*

À Mestre Melissa Mariana - onde ao teu lado posso dizer que passei os momentos mais divertidos ao longo deste ano, mas também, aqueles que foram os mais sérios e mais importantes. Em todos eles, tu estiveste sempre lá para mim! Obrigada por tanto teres contribuído para que eu fosse, como tu dizias “uma de nós”. Por tudo o que me ensinaste, por toda a amizade e por todas as conversas, por tudo mesmo, o meu sincero e de coração, obrigada*

À Lara Leite, de uma forma muito carinhosa também - porque és a única que me acompanha, ao longo desta caminhada, desde o 1º ano que aqui entrei. Obrigada por me “aturares” há tanto tempo. Por tanto me teres ajudado. Por me teres dado a oportunidade de tanto aprender contigo. Por todos os momentos que já passámos juntas, que não esquecerei. Obrigada*

Quero agradecer ainda às minhas restantes colegas de laboratório, mas em especial à Patrícia, por todos os momentos partilhados ao longo deste ano, por todos os dias bons e menos bons, mas acima de tudo por toda a partilha de conhecimentos.

Aos meus “aprendizes”: à Bruna Melo e ao Pedro Seco, por todos os momentos e aventuras partilhados. Por toda a força que me deram nos momentos mais críticos. Por todos os sorrisos e brincadeiras, mas acima de tudo pela oportunidade de poder ensinar-vos. Por todas as perguntas difíceis e por toda a partilha de conhecimento. Por tudo, Obrigada*

A toda a equipa do CICS, o meu profundo agradecimento por todo o apoio técnico e científico, e por toda a partilha de emoções e convívências. Um obrigada especial aos meus colegas de câmara(s), com quem tantos momentos partilhei. E à Sofia, por toda a paciência e ensinamentos que me transmitiu.

À minha melhor amiga, a Marisa Pereira - por teres sido o mais que tudo. Por todas as palavras incondicionais de apoio, por todas as conversas, por todos os conselhos e por toda a força que sempre me transmitiste para que eu chegasse ao fim desta caminhada, o meu sincero obrigada*

À minha grande amiga Alexandra Coimbra - por teres sido o meu braço direito ao longo desta grande caminhada. Tu, mais que ninguém, sabes o que esta dissertação é e o que significa, pois foste tu quem sempre estive ao meu lado. Obrigada por isso. Não há palavras suficientes capazes de te agradecer tudo aquilo que fizeste por mim. Obrigada mesmo*

A todos os meus verdadeiros amigos, pela constante amizade, por todo o apoio incansável e por todas as palavras de incentivo nos momentos mais críticos desta fase. O meu sincero obrigada.

A todos os extraordinários funcionários desta casa, mas em especial ao segurança Zé, à D^a Ermelinda, e às equipas da cantina, bar e lavandaria de St^o António, da cantina e bar da FCS, e à equipa do fim de semana da biblioteca, o meu sincero agradecimento por toda a ajuda, por toda a simpatia, boa disposição e alegria com que sempre me receberam. Por toda a preocupação, e carinho com que sempre me trataram. A todos o meu muito obrigada!

Quase a terminar gostaria de agradecer à minha família, por todo o Grande, grande apoio que me deu nesta importante etapa da minha vida. Mas em especial, à minha mãe, por tudo aquilo que sou e por tudo o que me transmitiste, que permitiu que eu chegasse onde cheguei. Sem ti nada disto seria possível. Obrigada, mesmo, por todo o esforço que fizeste, que tornou tudo isto possível! Aos meus outros dois grandes apoios, a minha tia e a minha irmã. Obrigada pelas palavras de apoio incondicionais, por toda a preocupação, por terem acreditado sempre em mim, mesmo quando eu não acreditei. E por tanto terem contribuído, das mais variadas formas, para me dar força para eu continuar. E por fim, à minha tia-avó por todo o apoio incondicional que sempre me deu. A todos, o meu muito, muito obrigada, por todo o amor e por terem tornado isto uma realidade*

O meu obrigada muito sincero também a todas as mães doadoras, sem as quais a concretização deste trabalho nunca teria sido possível. Um obrigada também, a toda a equipa do Bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira, por toda a atenção e simpatia com que sempre me receberam, e pela sua colaboração para este trabalho. A todos, o meu sincero agradecimento.

Por fim, queria agradecer a todas as “estrelinhas” que iluminaram esta, que foi uma das minhas melhores caminhadas da minha vida. À minha irmã, aos meus avós, à minha “Zuzu”, ao S^o Vasco e ao S^o César. Para além da minha luz, vocês foram a força que em tantos dias precisei. A vossa “pirosa” não podia estar mais agradecida. Obrigada*

E porque este trabalho, não é só meu, é de todos aqueles que ao meu lado caminharam. Quero deixar um beijinho, e um sincero obrigada, a todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para que este sonho, fosse hoje uma realidade. Obrigada***

Resumo

A aplicação tópica de protetores solares contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta é a proteção preferida a nível mundial. Atualmente, o octilmetoxicinamato (OMC) é um dos filtros ultravioleta-B mais utilizado na composição dos protetores solares. Estudos recentes demonstraram que o OMC pode comportar-se como um disruptor endócrino, mas a nível vascular apenas um estudo iniciou a avaliação dos seus efeitos.

Neste sentido, o objetivo geral do presente trabalho consistiu no estudo do efeito do OMC no tónus arterial e na análise dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Para atingir este objetivo foram delineados os seguintes objetivos específicos: 1) Realizar com sucesso o isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC); 2) Analisar o efeito do OMC em artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio, e em HUASMC; 3) Analisar possíveis mecanismos envolvidos no efeito do OMC em HUA, principalmente o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio.

Os resultados demonstraram que o OMC exerce um efeito relaxante arterial rápido (não genómico) e independente de endotélio. Também provoca relaxamento a nível das HUASMC. O mecanismo de ação do OMC pode ser, em parte, semelhante ao dos estrogénios, envolvendo a ativação da guanil ciclase solúvel, com aumento dos níveis de cGMP. Para além disso, este mecanismo não envolve a ativação dos canais de cálcio do tipo L. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor o mecanismo de ação do OMC a nível vascular.

Palavras-chave

Octilmetoxicinamato, disruptor endócrino, artéria umbilical humana, células musculares lisas, relaxação.

Abstract

The topical application of sunscreens against the harmful effects of ultraviolet radiation is the preferred protection worldwide. Octylmethoxycinnamate (OMC) is one the most widely used ultraviolet-B filter in the composition of sunscreens. Recent studies have shown that the OMC behaves like an endocrine disruptor, but at vascular level only one study initiated the evaluation of its effects.

In this sense, the aim of the present study was to investigate the effect of the OMC on the arterial tonus and the analysis of the possible mechanisms involved in this effect. To achieve this prupose, specific objectives were outlined: 1) To perform the isolation and culture of the human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC); 2) To analyse the effect of the OMC in human umbilical arteries (HUA) without endothelium, and in HUASMC; 3) To analyse the mechanism involved in the OMC effect on HUA, mainly the involvement of cyclic nucleotides and calcium channels.

Our results demonstrated that the OMC exerts a rapid (non-genomic) relaxing arterial effect and independent of endothelium. It also causes a relaxation at HUASMC level. The mechanism of action of the OMC can be, in part, similar to that of oestrogens, involving the activation of soluble guanyl cyclase, with increase of the cGMP levels. In addition, it does not go through an activation of the L-type calcium channels. Further studies are needed to better understand the mechanism of action of the OMC at vascular level.

Keywords

Octylmethoxycinnamate, endocrine disruptor, human umbilical artery, smooth muscle cells, relaxation.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Radiação ultravioleta (UV)	1
1.1.1 Efeitos biológicos da radiação UV	3
1.1.2 Fotoproteção	3
1.2 Filtros UV solares	4
1.3 Protetores Solares	5
1.4 Disruptores endócrinos (ED).....	5
1.5 Octilmetoxicinamato (OMC).....	7
1.6 Propriedades químicas do octilmetoxicinamato.....	7
1.7 Vias de exposição ao OMC	9
1.8 Estudos realizados em animais	11
1.8.1 Atividade estrogénica.....	12
1.8.2 Atividade anti-androgénica	13
1.8.3 Atividade anti-progestagénica	13
1.8.4 Atividade anti-tiroidea	14
1.8.5 Atividade não relacionada com ER, AR, PR e TR.....	17
1.9 Estudos realizados em humanos.....	19
1.9.1 Estudos in vitro	19
1.9.2 Estudos in vivo	23
1.9.3 Estudos epidemiológicos	24
1.10 OMC e o seu efeito a nível vascular	24
1.11 Células musculares lisas (SMC)	25
1.11.1 Cordão Umbilical Humano (HUC).....	26
1.11.2 Artéria Umbilical Humana (HUA)	28
1.11.3 Cultura de células musculares lisas (SMC)	30
1.12 Regulação da função vascular da HUA	32
1.12.1 Contração das células musculares lisas na HUA	33
1.12.2 Relaxação das células musculares lisas na HUA	35
1.13 Influência de algumas hormonas com a função vascular	38

1.13.1	Efeito dos estrogénios na função vascular.....	38
1.13.2	Efeito das hormonas da tiroide na função vascular.....	40
2.	Enquadramento e objetivo da investigação	43
3.	Metodologias e Materiais.....	44
3.1	Metodologias Não-Laboratoriais.....	44
3.1.1	Estudo exploratório de protetores solares.....	44
3.2	Metodologias Laboratoriais.....	45
3.2.1	Recolha de Cordões Umbilicais Humanos (HUC)	45
3.2.2	Isolamento das Artérias Umbilicais Humanas (HUA).....	45
3.2.3	Cultura de Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana (HUASMC).....	46
3.2.5	Estudos de contractilidade arterial usando a técnica de Banho de Órgãos	46
3.2.6	Estudos de contractilidade das HUAMSC por PCSA (Planar Cell Surface Area)	49
3.2.8	Análise estatística.....	51
3.3	Soluções e Materiais.....	52
3.3.1	Soluções.....	52
3.3.2	Químicos	53
3.3.3	Materiais	53
4.	Resultados	55
4.1	Estudo exploratório: presença do OMC em protectores solares	55
4.2	Estudos de contractilidade arterial.....	60
4.2.1	Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pela serotonina (5-HT).....	60
4.2.2	Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pela histamina (His)	61
4.2.3	Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pelo cloreto de potássio (KCl).....	61
4.2.4	Comparação do vasorelaxamento entre os três agentes contrácteis.....	62
4.2.5	Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo OMC	63
4.2.6	Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação induzida pelo OMC	65
4.3	Estudos de contractilidade celular.....	68

4.3.1 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUASMC induzida pela seronina (5-HT).....	68
4.3.2 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUASMC induzida pela histamina (His)	69
4.3.3 Comparação do relaxamento entre os dois agentes contrácteis	69
5. Discussão Geral	71
6. Conclusões	76
7. Referências Bibliográficas	77

Índice de Figuras

Figura 1 - Radiação UV e a sua penetração na pele humana.....	2
Figura 2 - Mecanismo de ação dos filtros UV.....	4
Figura 3 - Estrutura química do <i>trans</i> -OMC desenhada no ChemSketch.	8
Figura 4 - Diagrama ilustrativo das diferentes vias de exposição ao OMC.	11
Figura 5 - Esquema-resumo do efeito do OMC a nível vascular.....	25
Figura 6 -Secção transversal de um cordão umbilical humano, onde se pode observar as duas artérias umbilicais humanas (na parte superior) e a veia umbilical (no centro).	27
Figura 7 -Secção transversal de uma veia umbilical humana	28
Figura 8 -Secção transversal de uma HUA com endotélio, onde se pode observar a disposição das duas camadas de células musculares lisas vasculares, sendo a longitudinal mais interna e a outra circular.	29
Figura 9 - Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana (HUASMC), onde A: ilustra o crescimento celular após 10 dias e B: ilustra o crescimento celular após 17 dias.	32
Figura 10 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na contração das células musculares lisas da artéria umbilical humana.	35
Figura 11 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos no relaxamento das células musculares lisas da artéria umbilical humana.	38
Figura 12 - Sistema experimental <i>in vitro</i> - Banho de Órgãos	48
Figura 13 - Microscópio invertido de fluorescência da marca Zeiss Axio Observer Z1.....	50

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) sobre as contrações induzidas por serotonina (5-HT, 1 μ M) em HUA.	60
Gráfico 2 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) sobre as contrações induzidas por histamina (His, 10 μ M) em HUA..	61
Gráfico 3 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio (KCl, 60mM) em HUA.	62
Gráfico 4 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 10 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M) em anéis de HUA contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ M).	64
Gráfico 5 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 1 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M), em anéis de HUA contraídos com histamina (His, 10 μ M).	64
Gráfico 6 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 10 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M), em anéis de HUA contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM).	65
Gráfico 7 - Efeitos da nifedipina (Nif, 1 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M), em anéis de HUA contraídos com serotonina (5-HT, 1 μ M). ..	66
Gráfico 8 - Efeitos da nifedipina (Nif, 1 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M), em anéis de HUA contraídos com histamina (His, 10 μ M).	66
Gráfico 9 - Efeitos da nifedipina (Nif, 0,1 μ M) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M), em anéis de HUA contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM).	67
Gráfico 10 - Efeito do OMC (50 μ M) sobre as contrações induzidas pela serotonina (5-HT, 1 μ M) em HUASMC.	68
Gráfico 11 - Efeito do OMC (50 μ M) sobre as contrações induzidas pela histamina (His, 10 μ M) em HUASMC.	69
Gráfico 12 - Efeito relaxante do OMC (50 μ M) sobre as contrações induzidas pela serotonina (5-HT, 1 μ M) e pela histamina (His, 10 μ M) em HUASMC.	70

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Efeitos biológicos da exposição à radiação UV.	2
Tabela 2 - Soluções utilizadas no decorrer desta investigação, e respetivas composições.....	52
Tabela 3 - Materiais/Equipamentos utilizadas no decorrer desta investigação.	54
Tabela 4 - Estudo exploratório de protetores solares, realizado no período de 15 julho - 15 agosto 2016.	55
Tabela 5 - Respostas máximas induzidas pelo OMC (50µM), expressas em percentagem (%), sobre as contrações induzidas por serotonina (5-HT), histamina (His) e cloreto de potássio (KCl)	63

Abreviaturas e Acrónimos

5-HT	Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (<i>Serotonin or 5-Hydroxytryptamine</i>)
Akt	Proteína Cinase B (<i>Protein kinase B</i>)
AR	Receptor clássico de androgénios (<i>Androgen Receptor</i>)
Asp	Aspartato ou ácido aspártico (<i>Aspartate or aspartic acid</i>)
BK _{Ca}	Canais de Potássio ativados por Cálcio (<i>Large Conductance Calcium-activated Potassium Channels</i>)
C3	Proteína do complemento 3 (<i>complement protein 3</i>)
Ca ²⁺	Cálcio (<i>Calcium</i>)
cAMP	Monofosfato cíclico 3'5'-Adenosina (<i>Cyclic Adenosine 3,5' - Monophosphate</i>)
cGMP	Monofosfato cíclico 3'5'-Guanosina (<i>Cyclic Guanosine 3,5' - Monophosphate</i>)
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde (<i>Health Sciences Research Centre</i>)
CNS	Sistema Nervoso Central (<i>Central Nervous System</i>)
CVDs	Doenças cardiovasculares (<i>Cardiovascular diseases</i>)
CYP	Citocromo P450 (<i>cytochrome P450</i>)
DHT	Di-hidrotosterona (<i>Dihydrotestosterone</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E2	Estradiol (<i>estradiol</i>)
EC50	Concentração de fármaco que induz metade do efeito máximo (<i>half maximal effective concentration</i>)
ED	Disruptor endócrino (<i>Endocrine disruptor</i>)
Eixo HPG	Eixo hipotálamo-pituitária-gónadas (<i>hypothalamic-pituitary-gonadal axis</i>)
Eixo HPT	Eixo hipotálamo-pituitária-tiroide (<i>hypothalamic-pituitary-thyroid axis</i>)
eNOS	Síntase do óxido nítrico endotelial (<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>)
ER	Recetor de estrogénios (<i>Estrogenic receptor</i>)
ER α	Recetor de estrogénios alfa (alfa estrogen receptor)
ER β	Recetor de estrogénios beta (<i>beta estrogen receptor</i>)
ETARs	Estações de Tratamento de Águas Residuais (<i>wastewater treatment plants</i>)
EU	União Europeia (<i>European Union</i>)
FRTL-5	Linha celular da tiroide de rato Fisher (<i>Fischer rat thyroid line</i>)
FSH	Hormona folículo-estimulante (<i>Follicle-stimulating hormone</i>)
FT3	Triiodotironina livre (<i>Free triiodothyronine</i>)
FT4	Tiroxina livre (<i>Free thyroxine</i>)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (<i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
Glu	Glutamato ou ácido glutâmico (<i>Glutamate or glutamic acid</i>)
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas (<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>)
HDL	Lipoproteína de alta densidade (<i>high-density lipoprotein</i>)

HepG2	Linha celular do hepatocarcinoma humano (<i>human hepatocarcinoma cell line</i>)
hER α	Recetor de estrogénios alfa humano (<i>Human estrogenic receptor alpha</i>)
His	Histamina (<i>Histamine</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
Hsp70	Proteína 70 de choque térmico (<i>Heat shock protein 70</i>)
HUA	Artéria umbilical humana (<i>Human Umbilical Artery</i>)
HUASMC	Células do músculo liso da artéria umbilical humana (<i>Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells</i>)
HUC	Cordão Umbilical Humano (<i>Human Umbilical Cord</i>)
ID1	Iodotironina deiodinase tipo 1 (<i>5'deiodinase type 1</i>)
ID2	Iodotironina deiodinase tipo 2 (<i>5'deiodinase type 2</i>)
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (<i>Insulin-like growth factor 1</i>)
IK _{Ca}	Canais de K ⁺ ativados por cálcio de condutância intermedia (<i>intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels</i>)
IP ₃	1,4,5-Trifosfato de Inositol (<i>Inositol-1,4,5-Triphosphate</i>)
K ⁺	Potássio (<i>Potassium</i>)
K _{2P}	Canais de K ⁺ de dois poros (<i>2-pore domains K⁺ channels</i>)
K _{ATP}	Canais de K ⁺ sensíveis a ATP (<i>ATP-sensitive K⁺ channels</i>)
KCl	Cloreto de Potássio (<i>potassium chloride</i>)
K _{IR}	Canais de K ⁺ rectificadores (<i>inwardly rectifying K⁺ channels</i>)
K _V	Canais de K ⁺ operados por Voltagem (<i>Voltage-Gated Potassium Channels</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
LH	Hormona luteinizante (<i>Luteinizing hormone</i>)
LTCC	Canais de cálcio operados por voltagem do tipo L (<i>L-type calcium channel</i>)
MCF-7	Linha celular do adenocarcinoma da mama humano (<i>human breast adenocarcinoma cell line</i>)
MDA-kb2	Linha celular do carcinoma da mama humano (<i>human breast carcinoma cell line</i>)
ME	Enzima Mállica (<i>malic enzyme</i>)
NCX	Permutador Na ⁺ /Ca ²⁺ (<i>Na⁺/Ca²⁺ exchanger</i>)
Nif	Nifedipina (<i>Nifedipine</i>)
Nis	Simportador Sódio/Iodo (<i>sodium/iodide symporter</i>)
NO	Óxido Nítrico (<i>Nitric Oxide</i>)
NP	Péptidos Natriuréticos (<i>Natriuretic Peptides</i>)
NT	Neurotransmissores (<i>Neurotransmitters</i>)
OMC	Octilmetoxicinamato (<i>Octylmethoxycinnamate</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde (<i>world health organization</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDE	Fosfodiesterases (<i>Phosphodiesterases</i>)
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α (<i>prostaglandin F₂α</i>)

PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase (<i>phosphoinositide 3-kinase</i>)
PKA	Proteína Cinase A (<i>Protein Kinase A or Cyclic AMP-dependent Protein Kinase</i>)
PKG	Proteína Cinase G (<i>Protein Kinase G or Cyclic GMP-dependent Protein Kinase</i>)
PLA	Polímero Biodegradável poli _(D,L) -lactídeo (<i>(poly (D, L-lactide))</i>)
PLC	Fosfolipase C (<i>Phospholipase C</i>)
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática (<i>plasma membrane Ca²⁺-ATPase</i>)
PR	Recetor de progesterona (<i>progesterone receptor</i>)
PSS	Solução salina fisiológica estéril (<i>sterile physiological saline solution</i>)
qPCR	PCR em tempo real (<i>real-time polymerase chain reaction or quantitative polymerase chain reaction</i>)
ROCC	Canais de cálcio operados por recetores (<i>receptor-operated Ca²⁺ channels</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
SACC	Canais de cálcio operados por stress físico (<i>stretch-activated Ca²⁺ channels</i>)
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo Sarco-plasmático (<i>sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase</i>)
sGC	Guanil Ciclase Solúvel (<i>Soluble Guanylyl Cyclase</i>)
SHBG	Globulina de ligação às hormonas sexuais (<i>sex hormone-binding globulin</i>)
SKCA	Canais de K ⁺ ativados por cálcio de baixa condutância (<i>small-conductance calcium-activated K⁺ channels</i>)
SMC	Células Musculares Lisas (<i>Smooth Muscle Cells</i>)
SM-MHC	Cadeia pesada de miosina do músculo liso (<i>smooth muscle -myosin heavy chain</i>)
SNP	Nitroprussiato de Sódio (<i>Sodium Nitroprusside</i>)
SOCC	Canais de cálcio operados por depósitos intracelulares (<i>store-operated Ca²⁺ channels</i>)
SPF	Fator de proteção solar (<i>Sun protection factor</i>)
STIM	Moléculas de interação stromal (<i>stromal interaction molecule</i>)
T3	Triiodotironina Total (<i>Total Triiodothyronine</i>)
T4	Tiroxina Total (<i>Total Thyroxine</i>)
TBG	Globulina de ligação à tiroxina (<i>Thyroxine-binding globulin</i>)
TERP1	Isoforma pituitária-específica do recetor de estrogénios alfa (<i>truncated estrogen receptor product-1</i>)
Tes	Testosterona (<i>Testosterone</i>)
TGF-β	Fator de Crescimento de Transformação Beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
TPO	Peroxidase tireóidea (<i>thyroid peroxidase</i>)
TR	Recetor da tiroide (<i>Thyroid receptor</i>)
TRH	Hormona libertadora de tireotrofinas (<i>thyrotropin-releasing hormone</i>)
TRα	Recetor da tiroide alfa (<i>Thyroid hormone receptor alpha</i>)
TSH	Hormona estimuladora da tiroide (<i>thyroid-stimulating hormone</i>)
TSHR	Recetor da TSH (<i>TSH receptor</i>)
U-2 SO	Linha celular do osteossarcoma humano (<i>human osteosarcoma cell line</i>)

UBI	Universidade da Beira Interior (<i>University of Beira Interior</i>)
USA	Estados Unidos da América (<i>United States of America</i>)
UV	Ultravioleta (<i>Ultraviolet</i>)
VOCC	Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (<i>Voltage Operated Calcium Channel</i>)
VTG	Viteogenina (<i>vitellogenin</i>)
α -SMA	α -actina do músculo liso (<i>α-smooth muscle actin</i>)
ϵ	Coefficiente de absorção molar (<i>coeficiente de absorção molar</i>)
$\lambda_{\text{máx}}$	Absorvância máxima (<i>wavelength of maximum absorption</i>)

1. Introdução

1.1 Radiação ultravioleta (UV)

A luz solar é um espectro contínuo de radiação eletromagnética composta por radiação ultravioleta (UV) (200-400 nm), luz visível (400-700 nm) e infravermelho (>700 nm). Dentro do espectro de radiação UV, os efeitos biológicos variam com o comprimento de onda, resultando numa classificação em três regiões distintas. ⁽¹⁾ Entre os fotobiologistas ambientais e dermatológicos, essas regiões são definidas como UV-C (200-290nm), UV-B (290-320 nm) e UV-A (320-400 nm), do menor para o maior nível energético, respetivamente. ^(1, 2)

A radiação UV-C não consegue atravessar a atmosfera terrestre devido ao facto de ser completamente absorvida pelo oxigénio molecular da camada de ozono, ^(2, 3) no entanto, os humanos continuam expostos a este tipo de radiação, por fontes artificiais, como é o caso das lâmpadas germicidas. ⁽⁴⁾ A radiação UV-C é considerada a radiação mais perigosa por possuir fortes propriedades mutagénicas e causadoras de eritema, bem como ações bacteriostáticas e bactericidas. ⁽⁵⁾

A radiação UV-B, por outro lado, já consegue atingir a superfície terrestre, mas a quantidade que atravessa a superfície é apenas parcial, e determinada pela quantidade de ozono estratosférico, uma vez que este é um forte absorvente da radiação nestes comprimentos de onda. ⁽²⁾ Contudo, a radiação UV-B representa cerca de 5-10% de toda a radiação UV capaz de atingir a superfície terrestre, ⁽⁵⁾ e é considerada a principal responsável pelos efeitos biológicos mais importantes nos seres vivos, como queimaduras solares, problemas na pigmentação, inductor da síntese de vitamina D₃ (colecalciferol), imunossupressão e carcinogénese. ^(2, 5, 6) À medida que a radiação UV-B é absorvida pela epiderme, ⁽⁶⁾ mais especificamente no estrato córneo, por cromóforos, ⁽⁵⁾ o ácido desoxirribonucleico (DNA) pode sofrer danos diretos que se refletem na criação de ligações covalentes entre as bases de pirimidina (formação de dímeros) que, pelo seu elevado potencial mutagénico, têm posteriormente que ser corrigidas por mecanismos de reparação do DNA. ^(3, 5, 7, 8) Podem ainda ocorrer danos indiretos como a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), danos oxidativos no DNA e também ativação de mediadores inflamatórios, ⁽³⁾ como histamina, serotonina e prostaglandinas, que conduzem à dilatação dos capilares e ao desenvolvimento de eritema e edema, de forma imediata. ⁽⁵⁾

A radiação UV-A consegue atingir quase totalmente a superfície terrestre, sem perdas significativas na passagem pela atmosfera terrestre, ⁽²⁾ uma vez que não é absorvida pela camada de ozono. ⁽⁷⁾ Deste modo consegue penetrar profundamente na pele, ⁽⁶⁾ e atinge a derme, ⁽³⁾ onde os melanócitos que residem na camada basal se responsabilizam pelo envelhecimento prematuro da pele, também denominado de fotoenvelhecimento (**Figura 1**). ^(6, 7) Tal como a

radiação UV-B, também a radiação UV-A lesa direta⁽⁸⁾ e indiretamente o DNA e outras estruturas celulares.^(3, 6, 8)

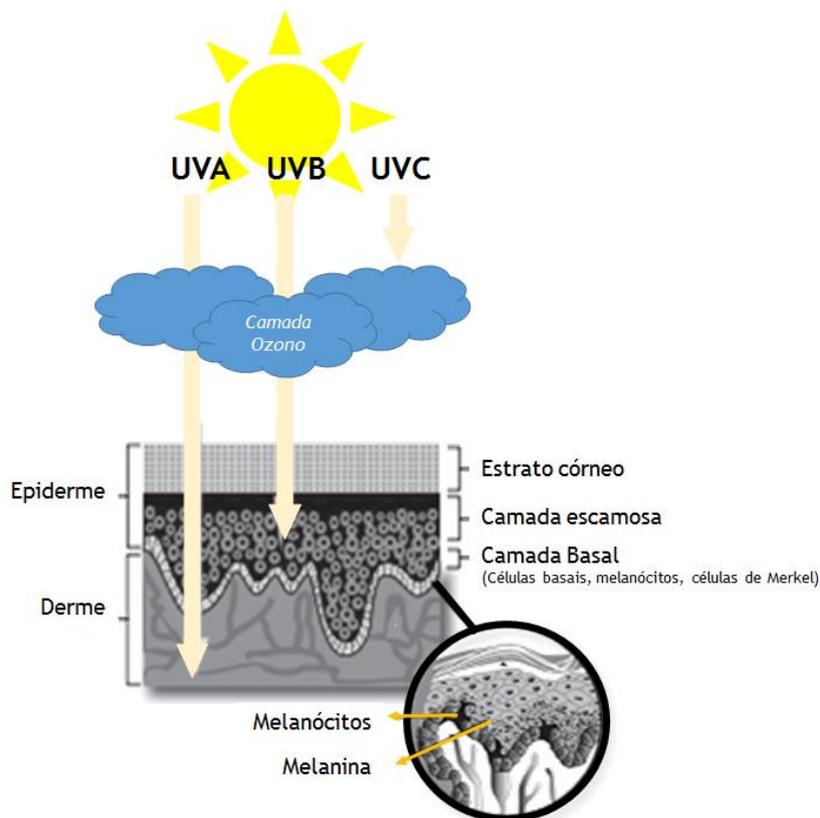


Figura 1 - Radiação UV e a sua penetração na pele humana. Adaptado de⁽⁷⁾

Os eventos biológicos que ocorrem após a exposição à radiação UV (Tabela 1) podem ser classificados em efeitos agudos (imediatos), com início rápido e de curta duração, ou efeitos crónicos (longo prazo) com início gradual e de longa duração.⁽¹⁾

Tabela 1 - Efeitos biológicos da exposição à radiação UV. Adaptado de⁽¹⁾

Efeitos agudos da exposição à radiação UV	Efeitos crónicos da exposição à radiação UV
- Síntese de vitamina D ₃	- Inflamação Crónica
- Eritema	- Supressão imune
- Escurecimento pigmentar	- Fotoenvelhecimento
- Hiperplasia da epiderme	- Mutações no DNA não reparadas, que predispõem o desenvolvimento de neoplasias cutâneas como: cancros não-melanoma (carcinoma basocelular e carcinoma espinocelular) e melanoma.
- Danos no DNA	
- Formação de espécies reativas de oxigénio	
- Indução de genes supressores de tumores (p53) - sobre regulação de genes pró-apoptóticos e proteínas	

1.1.1 Efeitos biológicos da radiação UV

Em quantidades moderadas, a radiação UV tem efeitos benéficos para o ser humano, como a promoção do bem-estar por redução do *stress*, o aumento da atividade mental e a ativação da síntese de vitamina D₃ - essencial para a homeostase do cálcio. Além disso, também é benéfica no tratamento de várias doenças dermatológicas, nomeadamente dermatite atópica e psoríase. ⁽⁵⁾

Contudo, e como referido anteriormente, a radiação UV produz efeitos nocivos sobre a pele e tem um papel preponderante no desenvolvimento de neoplasias cutâneas. ⁽⁶⁾ Inclusive, foi já classificada como sendo “cancerígena completa”, pela sua capacidade de causar cancro de pele sem qualquer iniciador ou promotor adicional. ⁽⁴⁾ Estudos recentes indicaram que a exposição à radiação UV é a causa primária de cerca 90% e 65% de casos de cancro de pele não melanoma e melanoma, respetivamente. ^(3, 6)

Embora seja atualmente impossível prevenir ou reverter os processos genéticos responsáveis pelo envelhecimento cutâneo intrínseco e pelas neoplasias cutâneas, as alterações cutâneas associadas ao envelhecimento extrínseco e à fotocarcinogénese são em grande parte evitáveis, ⁽⁶⁾ através de uma correta fotoproteção. ⁽³⁾

1.1.2 Fotoproteção

A pele humana possui mecanismos de defesa contra os efeitos imunossupressores e mutagénicos da radiação. ^(2, 5) São exemplo desses mecanismos endógenos a hiperplasia da epiderme, os mecanismos de reparação de DNA, a apoptose, as enzimas antioxidantes e a pigmentação. ⁽⁵⁾ No entanto, essa fotoproteção é apenas parcial e por isso, insuficiente. ⁽²⁾

As autoridades de saúde têm por isso feito um maior esforço na promoção de atitudes e comportamentos saudáveis relacionados com o sol. ⁽⁵⁾ A fotoproteção aconselhada inclui evitar a exposição solar reduzindo o tempo de exposição ao sol, especialmente durante as 10 horas da manhã e as 2 horas da tarde. ⁽⁵⁾ Também se pode minimizar essa exposição através do uso de roupa adequada, a procura de sombra e aplicação regular de protetores solares. ⁽³⁾ É recomendada uma aplicação tópica de 2 mg/cm² de protetor solar, cerca de 30 minutos antes da exposição e cada 2-3 horas durante a exposição solar, e ainda após contacto com a água. ^(3, 5, 8) Entre as medidas apresentadas, o uso de protetores solares contendo filtros UV é o método de proteção preferido pelo público em geral. ^(3, 9)

1.2 Filtros UV solares

Os filtros UV solares são uma classe de químicos que absorvem a radiação ultravioleta e que se encontram numa grande variedade de produtos: desde adesivos, plásticos ou produtos de cosmética, incluindo protetores solares. ^(10, 11)

Podem ser classificados em filtros UV orgânicos (também designados físicos) ou inorgânicos (também designados químicos) de acordo com a sua composição química e o seu mecanismo de ação (**Figura 2**). ^(3, 12) Os filtros UV orgânicos são compostos aromáticos que exercem os seus efeitos protetores ao absorver fotões de alta energia da radiação UV. A energia absorvida é transmitida aos eletrões, que passam para um estado excitado, e ao retornarem ao estado fundamental, libertam a sua energia sob a forma de calor ou radiação, num comprimento de onda maior. É essa transição de regresso ao estado fundamental que tem o potencial de causar modificações químicas, resultando em filtros que são menos eficazes a filtrar a radiação. ⁽³⁾ Os filtros UV inorgânicos, por outro lado, são minerais que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV e que em comparação com os filtros orgânicos, são mais estáveis à degradação da exposição aos raios UV. ⁽³⁾

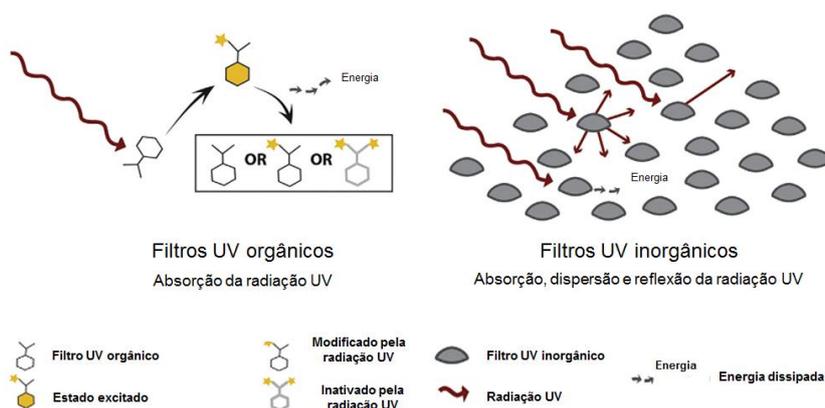


Figura 2 - Mecanismo de ação dos filtros UV. Adaptado de ⁽³⁾

Durante a última década, tem-se verificado um aumento do uso de filtro UV em protetores solares, como resultado das crescentes preocupações públicas sobre os efeitos da radiação UV na pele humana. ^(13, 14) Hoje, os filtros UV solares constituem os ingredientes ativos dos protetores solares, sendo os responsáveis por exercer a proteção temporária conferida por estes cosméticos. ⁽³⁾

1.3 Protetores Solares

Os protetores solares são produtos de cosmética que têm vindo a ser desenvolvidos e comercializados, com o fim de proteger o ser humano contra a radiação UV e os efeitos adversos a ela associados. ⁽²⁾

Aplicados dermicamente de forma tópica, os protetores solares são capazes de proteger temporariamente, contra as radiações UV-A e UV-B, ou apenas contra a radiação UV-B, de acordo com os filtros ultravioleta que possuem. ^(2, 3) Dependendo da sua formulação, podem assim ser classificados em 3 grupos distintos: o primeiro que diz respeito aos protetores cujos filtros UV que possuem são absorventes químicos orgânicos; o segundo grupo que representa a classe de protetores que possuem na sua constituição filtros UV inorgânicos e o terceiro grupo, que inclui as formulações que combinam ambos os filtros. ⁽²⁾

De forma a tornar os protetores solares mais seguros e eficazes para os consumidores, os fabricantes estão constantemente a modificar os seus ingredientes ativos e inativos, através do aumento do seu fator de proteção solar (SPF). O SPF é um valor numérico que indica o nível de proteção contra queimaduras solares. Na sua maioria, os protetores solares cujo SPF é superior são os mais recomendados. No entanto, a segurança dos mesmos continua a ser relativa e questionável. Em parte, deve-se ao facto de ao aumentar o SPF, a complexidade da formulação aumenta, e assim consequentemente a possibilidade de efeitos combinados vem aumentada também. ⁽²⁾

Hoje, a aplicação tópica de protetores solares, contendo filtros ultravioleta, é a proteção preferida a nível mundial contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta, ⁽⁹⁾ e está documentado que essa proteção é capaz de diminuir o fotoenvelhecimento e reduzir os riscos de desenvolvimento de doenças de pele relacionadas à idade. ^(6, 8) Evidentemente, o uso de protetores solares é eficaz na prevenção de diversas queimaduras, no entanto, a evidência para os seus efeitos protetores contra o cancro de pele melanoma é menos conclusiva. Sabe-se, por um lado, que a utilização de protetores solares com filtros UV é vasta e está a aumentar em todo o mundo, mas por outro lado, também a incidência de melanoma maligno, para o qual os filtros solares deveriam proteger, tem aumentado rapidamente.

Para além disso, é de elevada preocupação que uma série de estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* tenham indicado para os filtros UV o papel de disruptores endócrinos ⁽¹⁵⁻²¹⁾ pela sua capacidade de produzir numerosos potenciais efeitos adversos. ⁽⁹⁾ Isto levanta a possibilidade de os protetores solares constituírem hoje uma ameaça não identificada. ⁽²⁾

1.4 Disruptores endócrinos (ED)

Os disruptores endócrinos (ED) são substâncias químicas capazes de imitar, bloquear ou alterar a atividade de substâncias endógenas que são sintetizadas pelo sistema endócrino. ⁽²²⁾

A exposição humana aos ED começa desde muito cedo: inicia-se no útero e acompanha o ser humano ao longo de toda a sua vida. ⁽²⁾ Isto porque, este grupo de compostos é altamente heterogéneo e encontra-se numa grande variedade de produtos de uso diário que incluem, entre outros, os protetores solares. ^(2, 23) Alguns estudos têm revelado, que certos ingredientes dos protetores solares exercem distúrbios endócrinos e contém propriedades nefastas para a saúde humana. ^(15, 20, 21) São essas propriedades e o destino dos ED no nosso organismo, bem como a sua capacidade de produzir efeitos combinados, que são as responsáveis por determinar o impacto final destas substâncias no ser humano. ⁽²⁾

Os mecanismos pelos quais os ED desempenham a sua desordem endócrina são vários, ^(23, 24) podendo alterar diretamente a produção, libertação, metabolismo, eliminação e/ou o mecanismo de ação das hormonas. ⁽²⁴⁾ Responsáveis pela manutenção da homeostase corporal, as hormonas desempenham a sua função interagindo com recetores membranares, que respondem essencialmente a hormonas peptídicas e hidrofílicas, como a insulina, ou interagindo com recetores nucleares, que são ativados principalmente por hormonas lipofílicas pequenas, como as hormonas esteroides. ⁽²⁴⁾

Uma vez que muitos dos ED são pequenos compostos lipofílicos (esteroides), uma via privilegiada para eles atuarem é através da interação direta com um determinado recetor nuclear, que conseqüentemente irá perturbar/modular a expressão de um determinado gene. Esta classe de recetores hormonais clássicos, reconhecem apenas uma ou mais moléculas de alta afinidade e incluem os recetores de estrogénios (ER), de androgénios (AR), de progesterona (PR), e da tiroide (TR). ⁽²⁴⁾ Para além destes recetores, os ED podem também interagir com moléculas alvo no citosol, culminando na ativação da via de sinalização Src/Ras/Erk ou na ativação ou inibição do óxido nítrico (NO). ⁽²³⁾ Podem ocorrer também mudanças no metabolismo das próprias hormonas endógenas, “*cross-talking*” entre vias genómicas e não genómicas, “*cross-talking*” entre os ER após ligação e outros recetores, interferência com a regulação de *feedback* e com as células neuro endócrinas, ou até mudanças na metilação do DNA ou modificações nas histonas que têm como consequência uma instabilidade genómica, ⁽²³⁾ ainda pouco explorada. ⁽²⁵⁾ Foi sugerido que os ED com ação estrogénica, por exemplo, podem causar danos no DNA, promovendo uma diferenciação maligna das células afetadas, mas outros aspetos importantes como o impacto epigenético, continuam ainda por esclarecer. ⁽²⁵⁾

Dados epidemiológicos têm indicado que, nos últimos anos, a incidência e/ou prevalência de problemas de saúde associados à perturbação endócrina tem aumentado. ⁽²³⁾ Estudos recentes têm sugerido que os ED contribuem para uma série de problemas de saúde, que envolvem não só, doenças como o cancro da próstata ou da mama, mas também incluem doenças metabólicas, como a obesidade. Efeitos a nível do desenvolvimento e reprodução humana, assim como a nível da tiroide, sistema cardiovascular e sistema neuro-endócrino foram adicionalmente reportados. ^(2, 23, 24, 26)

1.5 Octilmetoxicinamato (OMC)

O octilmetoxicinamato (OMC) é um dos filtros ultravioleta mais utilizados a nível mundial em produtos de cuidados pessoais (PCPs), nomeadamente protetores solares. ^(18, 27) Atualmente, o OMC constitui, em vários países, uma das substâncias mais utilizadas e discutidas em PCPs. ^(28, 29) Comercializado sob o nome de Uvinul® MC 80, ⁽³⁰⁾ o OMC faz parte da lista dos 27 filtros UV aprovados para uso em formulações de cosméticos, na União Europeia (EU) e nos Estados Unidos da América (USA) ⁽¹¹⁾, onde a concentração máxima autorizada está estabelecida para 10% e 7,5%, respetivamente. ⁽⁹⁾ Além disso, o OMC integra ainda a lista prioritária de compostos ativos de ED na base de dados da Comissão Europeia de 2014 e o banco de dados SIN de 2014, <http://sinlist.chemsec.org/>, no EDC DataBank. ⁽³¹⁾

Atualmente, o OMC é considerado pela base de dados da União Europeia como um disruptor endócrino, mas cujo conhecimento acerca dos seus efeitos na saúde humana é desconhecido e pouco claro. ⁽²⁷⁾ Na verdade, alguns estudos demonstraram que o OMC pode agir como um disruptor endócrino, ^(15, 21) mas até à data, poucos foram os estudos desenvolvidos de modo a avaliar as suas atividades hormonais. Já foi demonstrado que o OMC possui uma atividade estrogénica, anti-androgénica, anti-progestagénica e anti-tireóideia. Mas a grande maioria dos estudos foram em animais, e apenas alguns estudos avaliaram os efeitos de dirupção endócrina do OMC em seres humanos.

1.6 Propriedades químicas do octilmetoxicinamato

O octilmetoxicinamato (OMC), também conhecido pelo seu nome comercial, octinoxato ⁽³²⁾ e denominado etilhexilmetoxicinamato (EHMC) pela nomenclatura internacional de produtos de cosmética ⁽³³⁾ é, à temperatura ambiente, um líquido incolor ou ligeiramente amarelo, muito solúvel em solventes orgânicos e óleos, mas insolúvel em água. Representa-se quimicamente por $C_{18}H_{26}O_3$ e tem um peso molecular de 290 g/mol. ⁽³⁰⁾

O OMC exerce os seus efeitos protetores ao absorver fotões de alta energia da radiação UV-B comportando-se, deste modo, como um filtro ultravioleta orgânico. ^(3, 8) Este filtro UV, que pertence ao grupo dos derivados do ácido p-metoxicinâmico, é um composto aromático que se caracteriza por ter uma estrutura molecular com uma ligação insaturada entre o anel aromático e o grupo carboxilo, ⁽¹¹⁾ (**Figura 3**) que lhe permite ter o seu pico de absorção máximo ao comprimento de onda de 311 nm. ⁽⁸⁾ O seu coeficiente de absorvidade molar (ϵ) é bastante elevado, aproximadamente 22 000 - 24 000 $M^{-1} cm^{-1}$. ⁽³⁴⁾

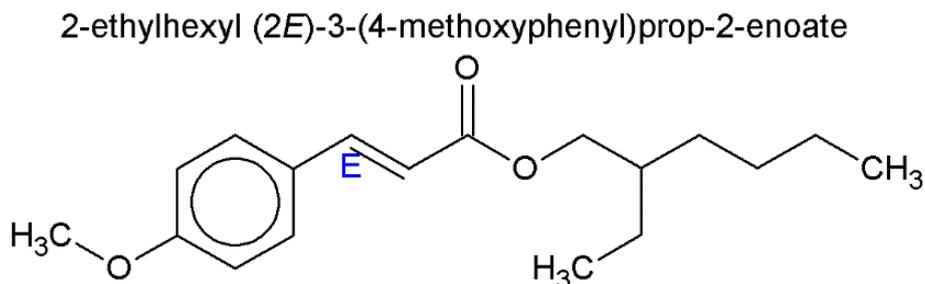


Figura 3 - Estrutura química do *trans*-OMC desenhada no ChemSketch.

O OMC apresenta dois isómeros (*cis* e *trans*), sendo que nos protetores solares apenas se encontra o isómero *trans*, enquanto noutros produtos de proteção solar é possível encontrar um ou ambos os isómeros. ⁽³⁵⁾ Alguns estudos têm demonstrado, que quando exposto à luz solar, o OMC sofre uma fotoisomerização do isómero *trans* (E) para o seu isómero *cis* (Z). ^(12, 34, 36) Apesar dos dois isómeros terem comprimentos de onda máximos semelhantes, o isómero *cis* tem um coeficiente de absorvidade molar substancialmente menor ($12\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), ^(12, 34) o que diminui a eficiência do OMC como filtro UV-B. ^(12, 36) Ambos os isómeros também formam produtos de degradação, como o 4-metoxibenzaldeído (4-MBA) e o 2-etilhexanol (2-EH), e podem ainda dimerizar para formar vários ciclodímeros. ⁽³⁷⁾ Alguns desses fotoprodutos já foram isolados e caracterizados. ⁽³⁷⁾ Por exemplo, a mistura após fotólise do OMC mostrou ser mais tóxica para células de mamíferos do que o OMC sozinho. ⁽³⁸⁾ Contudo, esse estudo não foi capaz de avaliar a toxicidade dos componentes individuais do fotolisato do OMC. Stein e os seus colaboradores conseguiram, pela primeira vez, em 2017, isolar, caracterizar e avaliar a citotoxicidade dos fotoprodutos do OMC, incluindo os ciclodímeros. Os resultados obtidos sugerem que diferentes componentes do fotolisato do OMC contribuem de forma diferente para a sua toxicidade celular. ⁽³²⁾

Considerados em conjunto, estes dados sugerem que a toxicidade do OMC pode aumentar devido à sua fotoisomerização, após exposição à radiação UV ^(38, 39) através, por exemplo, de uma interferência com processos celulares ou uma indução de danos oxidativos na pele humana. ⁽³⁸⁾ Até porque atualmente sabe-se que a radiação UV pode levar à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), pelos cromóforos epidérmicos, mas a formação de ROS é ainda mais estimulada quando há uma prévia absorção de protetores/filtros solares. ^(6, 39, 40) Neste sentido, estudos têm proposto a nano-encapsulação polimérica como uma estratégia para a estabilidade química. No caso do OMC, um estudo já demonstrou que a nano-encapsulação do polímero biodegradável poli(_{D,L}-lactídeo) (PLA) consegue estabilizar este filtro UV, sem que ele perca a sua eficiência como absorvedor de radiações. O objetivo é reduzir o contacto entre o filtro UV e a superfície da pele. Mais especificamente, com a ajuda das nanopartículas, consegue-se regular a libertação do OMC pela alta hidrofobicidade e cristalinidade do polímero, e pela lipofilicidade do fármaco, reduzindo desse modo a ocorrência da fotoisomerização, e a ocorrência de possíveis foto-alergias. ⁽⁴¹⁾ Curiosamente, apesar da conhecida fotoisomerização

do OMC, os estudos realizados inicialmente demonstraram que a sua aplicação tópica (isolado ou numa mistura de filtros UV) é bem tolerada, e com pouca ou insignificante irritação para a pele, reações adversas (eritema, edema, etc), efeitos fototóxicos ou fotoalergénicos. ^(32, 38, 42, 43)

No entanto, atualmente, observa-se que a foto-instabilidade dos filtros UV constitui uma preocupação a nível ambiental, ⁽⁴⁴⁾ enquanto, por outro lado, constitui um fator de grande interesse para os formuladores de cosméticos. ⁽⁴¹⁾ No caso do OMC, estudos relativos ao fator de proteção solar (SPF) realizados por Huong e os seus colaboradores, demonstraram que o OMC consegue reduzir mais de 30% o SPF de uma formulação, que contenha o OMC na sua forma livre. Esses autores demonstraram também que os veículos dos cosméticos podem apresentar uma forte influência na eficácia e estabilidade dos filtros UV. ⁽⁴⁵⁾ No caso do OMC, por exemplo, foi reportado que a sua fotoisomerização ocorre em stocks de E-OMC em etanol ⁽⁴⁶⁾ tendo-se verificado (nestes casos com solventes) que ocorre também uma diminuição da sua eficiência como filtro UV. ⁽³⁶⁾

Maioritariamente, o OMC é encontrado em produtos de proteção solar, mas é possível entrar em contacto com ele através de outras fontes de exposição como produtos para o cabelo, ⁽⁴⁷⁾ batons, maquiagem, perfumes ⁽⁴⁸⁾ e outros produtos de cuidados da pele. ^(20, 48) Deste modo, a exposição a este filtro UV pode acontecer de uma forma agregada. ⁽²⁸⁾ Hanson e os seus colaboradores demonstraram, que nestas condições, o OMC pode formar fotoprodutos que podem sensibilizar o singlete de oxigénio (1O_2), e assim levar à formação de espécies reativas de oxigénio, por um mecanismo que ainda não é conhecido. ^(39, 40)

Os seres humanos encontram-se amplamente expostos aos filtros UV, e já diversos estudos têm sugerido que os mesmos parecem ter efeitos nefastos sobre o sistema endócrino humano. Filtros UV solares, como o OMC, são por isso atualmente considerados uma fonte de preocupação para os seres humanos principalmente, ⁽⁹⁾ mas também para os organismos aquáticos e selvagens. Estes potenciais riscos associados aos possíveis efeitos da desregulação endócrina, exercidos pelo OMC, têm recebido especial atenção não só dentro da comunidade científica como do público em geral - através dos media e de organizações não governamentais. No entanto, este assunto continua a ser debatido. ⁽²⁸⁾

1.7 Vias de exposição ao OMC

Na nossa vida quotidiana, encontramos-nos expostos ao OMC de diversas formas (**Figura 4**). A principal via de exposição a este filtro ultravioleta é dérmica, ^(2, 13) uma vez que a aplicação de protetores solares, contendo filtros ultravioleta, é feita na pele de forma tópica. ⁽²⁾ Este facto, é de extrema importância pois, deste modo, os filtros UV são capazes de entrar na circulação sistémica diretamente, sem serem primeiro metabolizados pelo fígado, e assim atingir mais rapidamente todos os tecidos do corpo na sua forma inalterada. ⁽⁹⁾

É ainda importante notar que a pele, apesar de ser o maior órgão do corpo humano e de possuir os seus próprios mecanismos de defesa, possui uma eficácia contra substâncias químicas, agentes biológicos e radiação que em muito depende de fatores como o local de aplicação, a duração e frequência de exposição ao produto, a idade e o estado de saúde da pessoa, e até a possível presença de substâncias químicas que podem aumentar a penetração de outras. ^(2, 47) Alguns estudos já demonstraram, por exemplo, que a absorção e a retenção de protetores solares no estrato córneo da face é mais elevada que na parte de trás do corpo e nos braços ⁽⁴⁷⁾ e que ingredientes ativos, como o OMC, podem atuar como intensificadores da penetração dérmica do ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um herbicida com actividade de ED conhecida. ⁽²⁾

Além do uso pessoal e a subsequente exposição a esses agentes por contato com a pele, a exposição ao OMC também pode ocorrer por inalação e ingestão. ⁽²⁾ Uma inalação deste filtro UV é verificada muitas vezes, porque alguns protetores solares se encontram comercializados sob a forma de sprays, e contêm fragâncias com ED. ⁽²⁾ Para além disso, o OMC já foi encontrado em amostras de pó de apartamentos privados, edifícios públicos e veículos, na ordem dos $\mu\text{g/g}$, ⁽⁴⁹⁾ levantando a hipótese de se poder inalar o OMC através do contacto com estas fontes. Por outro lado, é muito comum ocorrer uma ingestão destes agentes pelo uso de batons solares, principalmente em crianças pelo seu hábito de levar tudo à boca, atitude que constitui um importante fator de risco. ⁽²⁾ Evidências crescentes têm classificado as crianças, até aos 7/10 anos de idade, como alvos mais suscetíveis de disrupção endócrina. ⁽²²⁾ Além de possuírem uma barreira mais acessível no estrato córneo, ⁽⁵⁰⁾ têm fracamente desenvolvidos os mecanismos de eliminação de fármacos, pois têm níveis mais baixos da enzima citocromo P450 (CYP) e uma glucoronidação deficiente, quando comparados com os adultos. ^(22, 51) Para além disso, possuem uma maior área superficial por peso corporal, o que leva a uma absorção mais elevada e a uma maior bioacumulação. ^(22, 50, 51) Deste modo, é importante ter um especial cuidado com a exposição das crianças, porque embora as mudanças causadas pela exposição a este tipo de produtos químicos numa fase mais jovem do desenvolvimento possam não ser imediatamente aparentes, elas podem levar a consequências numa fase da vida posterior. ⁽²⁸⁾

Uma exposição ao OMC por inalação ou ingestão é também bastante comum acontecer durante atividades como a natação. Em áreas de natação lotada, como a piscina ou a praia, grandes quantidades de químicos solares acabam na água e a exposição torna-se ainda mais complexa. ⁽²⁾ Uma série de estudos tem demonstrado que devido à sua elevada lipofilicidade, filtros ultravioleta como o OMC, tendem a acumular-se no ambiente, principalmente no meio aquático. ^(13, 15) Já foram detetadas quantidades de OMC, na ordem dos $\mu\text{g/L}$, em águas de piscinas, ⁽⁵²⁾ e reportado que este filtro consegue reagir com o processo de cloração das mesmas, ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾ podendo levar à produção de substâncias mutagénicas. ⁽⁵³⁾ Para além das piscinas, já foi detetada a sua presença em amostras de água da torneira e água potável, ^(56, 57) confirmando que os processos convencionais de tratamento de águas parecem não eficientes na remoção de resíduos deste filtro UV. Esta substância foi também detectada na água do mar de quatro praias na Itália ⁽⁵⁸⁾ e em águas de rios e lagos da Suíça, ⁽⁵⁹⁻⁶³⁾ na ordem dos ng/L . Foi

possível encontrar o OMC também em estações de tratamento de águas residuais (ETARs), ⁽⁶¹⁾ em lamas das ETARs ^(59, 64) e até em águas residuais não tratadas. ⁽⁶¹⁾ É importante notar que o OMC também já foi encontrado em diferentes espécies de peixes comestíveis, ^(10, 61, 65) o que levanta a hipótese de que, através da cadeia alimentar, o consumo de peixes contaminados possa constituir uma via de exposição para os seres humanos. ⁽⁶⁶⁾

Por último, estudos epidemiológicos têm indicado que é possível encontrar o OMC no leite materno humano, ^(19, 48) colocando a hipótese de esta ser uma via de exposição neonatal. Estudos adicionais são necessários para investigar também uma possível exposição perinatal ao OMC via líquido amniótico, bem como elucidar quais os possíveis efeitos perturbadores exercidos pelo OMC no feto humano. ⁽⁹⁾



Figura 4 - Diagrama ilustrativo das diferentes vias de exposição ao OMC.

1.8 Estudos realizados em animais

Vários autores reportaram, tanto *in vitro* como *in vivo*, que o OMC tem uma atividade semelhante à dos estrogénios, ^(13-15, 17, 21, 50, 66-72) e demonstraram que este composto consegue interferir, também, com o eixo hipotálamo-pituitária-tiroide (eixo HPT) a diferentes níveis. ^(16-18, 73, 74) Outros estudos têm avaliado a atividade androgénica do OMC *in vitro* ^(20, 75, 76) e *in vivo*, ^(74, 77) e demonstraram que este filtro UV consegue provocar também alterações a nível do recetor de progesterona. ^(69, 74, 76) Alterações a nível da toxicidade reprodutiva, no desenvolvimento, e a nível do sistema nervoso central, foram adicionalmente reportadas. ^(22, 30, 74, 78, 79)

1.8.1 Atividade estrogénica

No que diz respeito à atividade estrogénica, sabe-se que muitos dos filtros UV exibem atividade estrogénica *in vitro*, embora em estudos *in vivo* o mesmo nem sempre se verifica. Estudos recentes *in vivo* têm reportado que o OMC possui uma atividade estrogénica. ^(14, 15, 17, 21, 50, 69) Ao contrário, *Schreurs* e os seus colaboradores não observaram esta actividade do OMC em ensaios realizados com *zebrafish* ⁽¹³⁾. Relativamente aos estudos *in vitro*, *Morohoshi* e os seus colaboradores não detetaram qualquer atividade estrogénica para o OMC, quando avaliaram a sua ligação competitiva ao recetor de estrogénio (ER) pelo método de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ⁽⁸⁰⁾. No entanto, *Kunz* e *Fent* detetaram uma atividade de antagonista estrogénico do OMC em leveduras que expressam recetor de estrogénios alfa humano (hER α), pois observaram uma inibição completa da atividade do estradiol (E2) ⁽²⁰⁾.

Alguns estudos *in vivo* demonstraram que o OMC apresenta um efeito similar ao do E2. Em estudos realizados com ratos *Long Evans* imaturos ^(15, 21) e ratos fêmea *Sprague-Dawley* ovariectomizadas, ^(17, 50, 69) foi demonstrado que o OMC consegue aumentar o peso uterino, a espessura endometrial e miometrial, e a espessura epitelial uterina e vaginal. Foram observados, também, aumentos nos níveis de expressão do recetor de progesterona (PR) e do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) no útero e vagina, ⁽⁶⁹⁾ de proteína do complemento 3 (C3) no útero e de TERP1 na pituitária. ⁽⁵⁰⁾ Uma diminuição significativa do peso corporal, dos depósitos de tecido adiposo, ⁽¹⁷⁾ e dos níveis de expressão de IGF-1 no fígado, ⁽⁵⁰⁾ também foram referidos. Esta atividade estrogénica também foi demonstrada em peixes *medaka*. ⁽¹⁴⁾

Curiosamente, foram encontradas alterações contrárias às observadas para o E2, como a nível ósseo, ⁽⁶⁹⁾ a nível dos triglicéridos, do ERB ⁽⁵⁰⁾ e na hormona luteinizante (LH). ⁽¹⁷⁾ No que diz respeito à densidade óssea, não se verificaram alterações provocadas pelo OMC, mas, em contrapartida, a concentrações elevadas, o OMC já conseguiu diminuir os níveis de osteocalcina. ⁽⁶⁹⁾ Foi possível observar-se também uma diminuição dos níveis de triglicéridos, ^(17, 50) assim como um aumento da expressão do ERB ⁽⁵⁰⁾ e das concentrações de LH no soro, em ratos. ⁽⁶⁹⁾

No que diz respeito ao perfil lipídico, os resultados não são totalmente consensuais em relação aos níveis séricos de colesterol, leptina, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL). Enquanto um estudo, em 2005, revelou que o OMC consegue diminuir os níveis séricos de colesterol e LDL, sem provocar alterações nos níveis séricos de leptina e HDL, ⁽⁵⁰⁾ em 2006, foi demonstrado que o OMC consegue reduzir os níveis de todos estes parâmetros, de forma semelhante ao E2. ⁽¹⁷⁾

Um estudo realizado em peixes *medaka* expostos a diferentes concentrações de OMC (0,034 a 34 nM) durante cerca de sete dias, demonstrou que o OMC é capaz de aumentar no fígado a concentração plasmática de vitelogenina (VTG) e os níveis de expressão de mRNA de vitelogenina e de coriogenina (dois genes responsivos aos estrogénios), assim como de ER α . ⁽¹⁴⁾

Todos estes dados analisados conjuntamente sugerem, que o OMC possuiu uma atividade estrogénica, como sugerido inicialmente. Contudo, alguns estudos têm comparado os efeitos exercidos pelo OMC e pelo E2, e tem-se verificado que nem sempre os efeitos exercidos por ambas as moléculas são totalmente idênticos. ^(17, 50, 69) Por este motivo, colocou-se a hipótese do OMC poder estar a atuar por um mecanismo diferente dos recetores clássicos de estrogénios - ER α e ER β - o que ainda não foi explorado. ^(17, 69) Estudos adicionais são assim necessários, de modo a elucidar o mecanismo pelo qual o OMC exerce a sua atividade estrogénica.

1.8.2 Atividade anti-androgénica

A fim de avaliar a atividade androgénica do OMC foram realizados alguns estudos *in vitro* ⁽²⁰⁾ e *in vivo*. ^(74, 77) Kunz e Fent observaram, usando leveduras que expressavam ER α humano (hER α), uma atividade de agonista parcial do OMC. ⁽²⁰⁾ O mesmo estudo revelou que o OMC inibe a atividade da di-hidrotestosterona (DHT). ⁽²⁰⁾

Em 2011, um estudo realizado com ratos imaturos, o OMC revelou ainda, conseguir diminuir os níveis de testosterona (Tes) no soro de ratos filhos, ⁽⁷⁴⁾ resultados que estão de acordo com os obtidos anteriormente por Kunz e os seus colaboradores. ⁽²⁰⁾

Mais recentemente, em 2014, *Isling* e os seus colaboradores demonstraram, usando ratos em desenvolvimento, que o OMC induz efeitos duradouros, capazes de se manifestar numa fase mais tardia da vida. Na descendência feminina, observou-se mais cedo uma senescência reprodutiva, e na descendência masculina foi possível observar uma redução de esperma epididimal, bem como uma maior hiperplasia atítica prostática. Em ambos os sexos, foi ainda observada uma maior incidência de tumores da pituitária. Os autores atribuíram esses resultados a uma atividade anti-androgénica do OMC. ⁽⁷⁷⁾

Em suma, ainda poucos estudos foram realizados a fim de avaliar a atividade anti-androgénica do OMC. No entanto, todos eles ^(20, 74, 77) parecem ser consensuais, sugerindo uma ação anti-androgénica exercida pelo OMC. Contudo, é necessária a realização de novos estudos pois o número de estudos realizados até ao momento é reduzido, sendo necessários para a compressão dos mecanismos pelos quais o OMC actua. Para além disso, uma vez que estamos perante uma atividade que está relacionada com a puberdade/hormonas sexuais é importante a realização de mais estudos *in vivo* que permitam uma comparação dos efeitos pré-puberdade/em desenvolvimento, com os os efeitos numa fase do desenvolvimento maduro.

1.8.3 Atividade anti-progestagénica

De modo a perceber de que forma o OMC consegue provocar alterações no recetor de progesterona, PR, foram realizados alguns estudos *in vivo*. ^(69, 74) Os primeiros autores a analisar esta atividade foram *Seidlová-Wuttke* e os seus colaboradores, em 2006, que demonstraram um

aumento da transcrição do PR no útero e vagina de ratos fêmea *Sprangre-Dawley* ovariectomizadas, após exposição oral ao OMC durante 3 meses. ⁽⁶⁹⁾ Mais tarde, em 2011, *Axelstad* e os seus colaboradores, reportaram uma diminuição na concentração plasmática de progesterona em ratos *Wistar* em desenvolvimento. ⁽⁷⁴⁾ Todos estes resultados sugerem que o OMC pode estar a desempenhar uma ação anti-progestagénica. ^(69, 74, 76)

Analogamente, ao que acontece para a atividade androgénica, também poucos são ainda os estudos realizados, que avaliem a atividade progestagénica do OMC. Curiosamente, também aqui, parece existir uma correlação entre todos os estudos realizados. Sabe-se que uma diminuição da atividade de um recetor vem muitas vezes acompanhada de um aumento da expressão do mesmo, devido aos seus mecanismos de *feedback*. Essa resposta compensatória exercida pelo recetor, vem também associada a outros mecanismos de *feedback*, onde um aumento da expressão (transcrição) do recetor, se reflete muitas vezes numa diminuição da concentração da sua hormona-ligando. ⁽⁸¹⁾ Nos estudos realizados, para avaliar a atividade progestagénica do OMC, parece existir esta correlação entre eles: *in vivo*, o OMC aumenta a transcrição do PR, e diminui a concentração plasmática de progesterona, sugerindo uma anterior diminuição da atividade do recetor de progesterona. Por esclarecer continuam ainda, os mecanismos pelos quais o OMC realiza essa atividade anti-progestagénica, pelo que, mais estudos são necessários. Para além disso, também aqui, são necessários estudos adicionais *in vivo* que permitam comparar os efeitos pré-puberdade/em desenvolvimento, com os efeitos numa fase de desenvolvimento maduro, assim como os efeitos com e sem os órgãos sexuais envolvidos.

1.8.4 Atividade anti-tiroidea

Em relação à atividade tiroidea, uma série de estudos *in vivo* ^(16-18, 73, 74) e *in vitro* ⁽⁷³⁾ revelaram que o OMC interfere com o eixo hipotálamo-pituitária-tiroide (HPT) a diferentes níveis.

Estudos realizados em 2004, ⁽¹⁶⁾ 2006, ⁽¹⁷⁾ e 2007 ⁽⁷³⁾ com ratos fêmea *Sprangre-Dawley* ovariectomizadas expostos ao OMC durante 3 meses, revelaram resultados contraditórios relativamente às hormonas triiodotironina total (T3) e hormona estimuladora da tiróide (TSH). ^(16, 17, 73) Em 2004, foi sugerida uma alteração nos níveis de T3 e TSH - não consistente com os conhecidos mecanismos de regulação, por *feedback* ⁽¹⁶⁾ - enquanto em dois estudos posteriores não foram detetados quaisquer alterações a nível destas hormonas. ^(17, 73) Alterações a nível da histologia da glândula da tiroide também não foram encontradas. ⁽⁷³⁾ Em contrapartida, nos três estudos referidos observou-se uma diminuição dos níveis de tiroxina total (T4) no sangue após exposição ao OMC. ^(16, 17, 73)

Ainda em 2007, *Klammer* e os seus colaboradores, documentaram que o OMC não consegue provocar alterações a nível da expressão da proTRH, mas curiosamente, consegue diminuir os níveis de T3, T4 e TSH de forma dose-dependente. ⁽¹⁸⁾ Seria de esperar, que pelos mecanismos

de regulação por *feedback* do eixo HPT, uma diminuição dos níveis de T3, T4 e TSH provocados pelo OMC potenciase um aumento da proTRH no hipotálamo; contudo, isso não se verificou. ⁽¹⁸⁾

Até agora, a expressão inalterada da hormona libertadora de tireotrofinas (TRH) permanece desconcertante, mas pode especular-se que o grau de alterações nas concentrações hormonais e/ou o período de níveis hormonais baixos era pequeno e/ou demasiado curto para ser capaz de estimular significativamente a expressão de proTRH no hipotálamo. ⁽¹⁸⁾ Do mesmo modo, pode ser possível que a expressão de mRNA não reflita a produção de péptidos, o processamento pós-tradução ou a secreção da hormona. A síntese de TRH é regulada tanto pela transcrição do gene como pelo processamento de proTRH, mas também por pro-hormonas convertases PC1/3 que são sobre-reguladas quando os níveis das hormonas tiroideas diminuem. Uma vez que o OMC não provocou alterações a nível da expressão de proTRH, os autores colocaram a hipótese do OMC poder estar a atuar sob uma forma mais ou menos direta nas pro-hormonas convertases capaz de neutralizar, dessa forma, os efeitos que as hormonas tiroideas iriam exercer, por *feedback* no hipotálamo. ⁽¹⁸⁾ Contudo, os efeitos exercidos por ED na TRH ou nas pro-hormonas convertases, no hipotálamo, ainda não foram descritos pelo que a hipótese de que o OMC possa atuar diretamente a nível do hipotálamo continua em aberto.

De forma análoga, uma diminuição dos níveis de T3 e T4 levaria a uma diminuição dos níveis de TSH, exercidos pelos mecanismos de regulação por *feedback*, do eixo HPT. Contudo, verificou-se que o OMC foi capaz de reduzir os níveis das três hormonas: T3, T4 e TSH. ⁽¹⁸⁾ Isto levanta a hipótese de que o OMC pode também atuar diretamente na glândula pituitária e levar à diminuição dos níveis de TSH de forma direta, e não apenas por mecanismos de *feedback*. ⁽¹⁸⁾

Para descobrir uma possível explicação para a diminuição dos níveis de T3 e T4, exercidos pelo OMC, alguns autores avaliaram outros parâmetros essenciais à síntese, metabolismo e ação das hormonas tiroideas, como os níveis de expressão de co-transportador de sódio/iodo (NIS), ⁽¹⁸⁾ das enzimas peroxidase tireóidea (TPO) ⁽¹⁸⁾, da enzima málica (ME) ⁽⁷³⁾, do recetor da TSH (TSHR) ⁽¹⁸⁾, assim como os níveis de atividade da enzima 5' deiodinase tipo 1 (ID1). ^(16, 18, 73) O tratamento com OMC em nada alterou os níveis de expressão de NIS e de TPO, pelo que esta não é a justificação para a diminuição dos níveis de T3 e T4 observada. ⁽¹⁸⁾ Em contraste, observou-se um aumento dos níveis de expressão de TSHR. ⁽¹⁸⁾ Contudo, foi sugerido que o aumento de expressão do TSHR seja uma resposta compensatória, exercida pelo próprio recetor para ajudar a sua sensibilidade à diminuição de TSH. ⁽¹⁸⁾ No que diz respeito aos estudos realizados para avaliar a atividade da ID1, verificou-se uma diminuição da atividade da enzima quer no fígado ^(16, 18, 73) quer no rim, ⁽⁷³⁾ de roedores. Essa diminuição pode estar relacionada com a diminuição das hormonas tiroideas, uma vez que a expressão da ID1 é estimulada pelas referidas hormonas, mais especificamente pela T4. ⁽¹⁸⁾ Estes resultados são consensuais com dados publicados anteriormente, onde o OMC administrado, durante 12 semanas em ratos fêmea *Sprague-Dawley* ovariectomizadas provocou a diminuição dos níveis de T4 no soro. ^(16, 73)

Mais tarde, em 2011, *Axelstad* e os seus colaboradores, num estudo com ratos *Wistar* em desenvolvimento, demonstraram que o OMC foi capaz de diminuir os níveis de tiroxina total (T4) em ratos fêmea grávidas e na descendência jovem masculina, bem como aumentar o peso da tiroide em ratos jovens de ambos os sexos. Curiosamente, a descendência feminina apresentou-se menos sensível à exposição ao OMC, não tendo manifestado qualquer efeito nos níveis de T4. Uma possível explicação baseia-se na hipótese dos efeitos do OMC, a concentrações muito baixas, poderem ser observados na descendência feminina, que por algum motivo, apenas tenham afetado ligeiramente os níveis de T4. Alternativamente a descendência feminina, por algum outro motivo, podia ser menos sensível aos efeitos da diminuição da T4, pelo OMC, que as progenitoras. ⁽⁷⁴⁾

In vitro, o OMC numa concentração de 0,1 µmol/L, revelou ser capaz de diminuir a entrada de iodo em células da linha celular da tiroide de rato Fisher (FRTL-5), não se tendo, contudo, verificado alterações a nível da TPO. ⁽⁷³⁾.

Considerados em conjunto, os estudos referidos indicam que o OMC possui propriedades perturbadoras da homeostase das hormonas da tiroide, e mais especificamente, reduz os níveis de T4. ^(16-18, 73, 74) O OMC demonstra exercer efeitos no eixo HPT que não refletem os mecanismos clássicos de regulação dependentes das hormonas e dos fenómenos de *feedback*, pelo que pode ocorrer que interfira com a síntese, metabolismo, distribuição e ação das hormonas tiroideas, através de múltiplos alvos e de mecanismos diferentes. ^(16, 73) Além da sua ação ser diferente para os vários órgãos, pode acontecer que o OMC afete mais do que um alvo no eixo HPT, ou mesmo mais que um eixo endócrino, de forma sinérgica. Adicionalmente, a sua ação estrogénica como ED pode aumentar ou mascarar a sua ação anti-tiroidea. ⁽⁷³⁾

Uma vez que não foi verificada uma correlação óbvia entre as alterações nos níveis de TSH e T3/T4, no estudo realizado em 2004, ⁽¹⁶⁾ poderia pensar-se num efeito estrogénico exercido pelo próprio ED. Contudo, estudos realizados de modo a investigar a ação estrogénica exercida pelo OMC, no eixo HPT, descartaram essa hipótese. A interferência do OMC com a função do eixo HPT foi clara, mas alterações provocadas pelo E2 não foram encontradas. ^(17, 18) É possível pensar-se, deste modo, que o OMC seja capaz de exercer os seus efeitos a nível da tiroide, de uma forma não estrogénica. ⁽¹⁷⁾ Esta hipótese foi corroborada por *Klammer* e os seus colaboradores, que demonstraram que o OMC foi capaz de exercer os seus efeitos, no eixo HPT, de forma não-genómica (rápida) e dependente da dose. ⁽¹⁸⁾

Por esclarecer está ainda, se os efeitos que o OMC pode exercer no eixo HPT de uma forma genómica, também estão sob influência de ações não-estrogénicas exercidas por este ED. Deste modo, estudos genéticos posteriores são requeridos, para avaliar os efeitos genómicos exercidos pelo OMC, a nível da tiroide, que continuam ainda por esclarecer.

1.8.5 Atividade não relacionada com ER, AR, PR e TR

Alguns estudos experimentais *in vivo*, têm avaliado a toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento ^(30, 74) exercida pelo OMC, e dado especial foco aos efeitos deste ED a nível do sistema nervoso central (CNS). ^(22, 74, 78, 79) Mais especificamente, neste último caso, têm sido avaliados os efeitos do OMC sobre a libertação hipotalâmica da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) em ratos imaturos ⁽²²⁾ e em ratos normais, castrados e castrados com terapia substitutiva, ⁽⁷⁸⁾ assim como sobre o sistema de aminoácidos neurotransmissores (NT). ^(22, 78)

O primeiro estudo a observar os efeitos do OMC não relacionados com ER, foi realizado por *Schneider* e os seus colaboradores, em 2005, onde avaliaram alguns parâmetros de fertilidade e reprodução para a toxicidade sistémica parental e de desenvolvimento, num estudo de duas gerações de ratos *Wistar*. Os animais foram expostos ao OMC em doses de 0, 150, 450 ou 1000 mg/kg de peso corporal/dia, na alimentação, durante os períodos de prematuração, gestação, lactação e maturação sexual. ⁽³⁰⁾ Os resultados demonstraram que o OMC, apenas na dose mais elevada, conseguiu provocar uma diminuição no ganho do peso corporal, assim como no peso corporal adulto, da descendência de ambos os sexos. Foi possível observar-se também, curiosamente, um aumento do peso do fígado na descendência feminina. Dado que estes resultados apenas se verificaram na maior dosagem de OMC, os autores sugerem que este não esteja a exercer um efeito estrogénico, nos animais parentais nem nos seus descendentes. ⁽³⁰⁾

Um estudo do mesmo género, foi realizado mais tarde, em 2011, por *Axelstad* e os seus colaboradores, novamente com ratos *Wistar*, mas apenas numa geração em desenvolvimento. ⁽⁷⁴⁾ Os resultados demonstraram que o OMC conseguiu provocar, na descendência masculina, uma diminuição dependente da dose nos níveis de testosterona; uma diminuição do peso e uma alteração histológica da próstata, e uma diminuição do peso dos testículos e do número de espermatozoides. A diminuição dependente da dose observada nos níveis de testosterona está de acordo com as reduções dos pesos dos testículos e próstata, assim como com as alterações histopatológicas observadas nestes órgãos. Os dados de expressão genética indicam que os baixos pesos prostáticos não estão relacionados com um antagonismo do recetor de androgénios, AR. Pode chegar-se a esta conclusão, uma vez que tanto o gene PBP C3 como o TRPM-2, que são regulados por vias mediadas pelo AR, não tiveram alterações na sua expressão após exposição ao OMC. A redução dos níveis de testosterona também não se deveu a efeitos sobre a expressão das enzimas esteroide-génicas, uma vez que estas também não foram alteradas pelo OMC. No que diz respeito à diminuição do número de espermatozoides após exposição ao OMC, pode inferir-se que uma vez que nenhum parâmetro de motilidade espermática foi alterado, o OMC consegue afetar o número, mas não a função dos espermatozoides. ⁽⁷⁴⁾ No geral, parece que o aumento da exposição ao OMC pode estar relacionado com o aumento da infertilidade. Mas mais estudos são necessários para elucidar o modo como isso poderá acontecer.

No que diz respeito à toxicidade de desenvolvimento provocada pelo OMC a nível do CNS, *Axelstad* e os seus colaboradores, reportaram ainda níveis de atividade motora diminuídos na descendência feminina, enquanto na descendência masculina, em oposição, foi possível observar melhorias nas capacidades de memória e aprendizagem espacial. Poderia ser colocada a hipótese destas alterações comportamentais serem devidas aos baixos níveis de T4, também observados, uma vez que está anteriormente descrito que baixos níveis das hormonas da tiroide estão associados a anomalias estruturais no cérebro. Contudo, este não é o caso, uma vez estudos anteriores realizados nas mesmas condições, não demonstraram os mesmos efeitos. Os níveis de atividade motora diminuídos na descendência feminina também não estão relacionados com as reduções observadas com o estradiol, e as melhorias na capacidade de aprendizagem e memória na descendência masculina também são difíceis de explicar com base nas propriedades anti-tiróideas do OMC. ⁽⁷⁴⁾

Relativamente ao efeito do OMC sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (eixo HPG), *Szwarcfarb* e os seus colaboradores demonstraram, em dois estudos também com ratos *Wistar*, que o OMC consegue diminuir significativamente a libertação de GnRH nos respetivos animais. ^(22, 78) Nenhum efeito foi observado nos níveis de GnRH de ratos castrados sem terapia substitutiva. ⁽⁷⁸⁾ Verificou-se que, em ratos macho, o OMC foi capaz de aumentar a libertação do ácido γ -aminobutírico (GABA), enquanto em ratos fêmea diminuiu os níveis de glutamato, não se tendo, contudo, observado alterações a nível da libertação hipotalâmica de GABA. ^(22, 78) Apenas num dos estudos foi possível observar-se também uma diminuição na produção de glutamato (Glu) e aspartato (Asp), em ratos macho e ratos fêmea, respetivamente. ⁽⁷⁸⁾ Estes resultados sugerem que durante a maturação sexual, o efeito inibitório do OMC na libertação de GnRH parece estar relacionado com sua ação nos aminoácidos NT inibitórios e excitatórios, ⁽²²⁾ e que ao atuar como ED, o OMC pode conseguir alterar o eixo HPG, em ratos adultos. ⁽⁷⁸⁾

Mais tarde, *Lichtensteiger* e os seus colaboradores, utilizando cérebros de rato em desenvolvimento durante um período crítico (sensível a hormonas sexuais) demonstraram que as misturas que contêm o OMC apresentavam padrões de expressão genética específicos de sexo e região, como resultado das interações com as hormonas sexuais, hormonas da tiroide, ou outros sistema de sinalização. ⁽⁷⁹⁾ Contudo, os autores sugeriram que as mudanças de expressão genética não se encaixavam consistentemente com os efeitos transcripcionais conhecidos para os recetores nucleares ER ou AR, podendo os mesmos resultar em parte de outros processos de desenvolvimento mais complexos. Além disso, a interação com as hormonas da tiroide foi também difícil de explicar. ⁽⁷⁹⁾

Assim, os efeitos exercidos pelo OMC a todos estes níveis parecem não estar relacionados com nenhuma das suas atividades com ER, AR, PR ou TR, mas sim com um mecanismo de ação que envolve a interferência com a regulação hormonal por *feedback* e com as células neuro endócrinas. O OMC parece estar a exercer estes efeitos - a nível da reprodução e no desenvolvimento - ao atuar por um dos possíveis mecanismos de ação dos ED. ⁽²³⁾ Mais especificamente, ao interferir na libertação de GnRH - através de uma alteração nos níveis de

NT inibitórios e excitatórios - o OMC pode conseguir, assim, afetar as hormonas sexuais LH e FSH (isto porque, estas hormonas estão sob o controlo da hormona hipotalâmica GnRH). Ora, deste modo, ocorrem conseqüentemente alterações a nível desenvolvimental e reprodutivo, exercido por essas hormonas. Essas alterações, podem devem-se ao OMC ter conseguido, também, interferir com a regulação das mesmas, por *feedback*, a nível neuro-endócrino. Esta hipótese é apoiada pelos estudos acima mencionados, ^(22, 30, 74, 78, 79) cujos autores sugerem que os diferentes efeitos observados não são devido a nenhuma das atividades com o ER, AR ou TR exercidas pelo OMC. De um modo geral, parece que este ED pode provocar todos estes efeitos, de uma forma “indireta”, e os resultados são sugestivos que, desse modo, o OMC pode mesmo ser capaz de provocar uma diminuição no sucesso reprodutivo, na idade adulta.

1.9 Estudos realizados em humanos

Actualmente, existem já vários estudos que analisam os efeitos de disrupção endócrina induzidos pelo OMC em humanos. ^(13, 15, 19, 27, 32, 38, 40, 48, 51, 66, 67, 73, 75, 76, 82-90) De forma a avaliar esses efeitos, foram realizados diferentes estudos: estudos *in vitro*, estudos *in vivo* com humanos e estudos epidemiológicos.

1.9.1 Estudos *in vitro*

▪ Atividade estrogénica

Vários estudos *in vitro* sugerem que o OMC possui uma atividade estrogénica. Usando uma linha celular de rim embrionário humano 293 (HEK293), *Schreurs* e os seus colaboradores demonstraram que o OMC foi capaz de ativar o receptor de estrogénios alfa (ER α) a concentrações superiores a 100 μM , ⁽¹³⁾ e os mesmos resultados foram obtidos em linhas celulares modificadas HELN, HELN ER α e HELN ER β com concentrações entre 0,1 e 10 μM de OMC. ⁽⁶⁷⁾ No entanto, os autores não verificaram nenhuma alteração nos níveis do receptor de estrogénios beta (ER β). ^(13, 67)

Outros investigadores realizaram estudos similares usando células da linha celular do adenocarcinoma da mama humano (MCF-7). ^(15, 66) Foi possível observar-se que o OMC conseguiu aumentar a proliferação celular com uma EC₅₀ de 2,37 μM , exercendo cerca de 77,18% do efeito provocado pelo estradiol. ⁽¹⁵⁾ Para além disso, foi demonstrado que o OMC, numa concentração de 1 μM ⁽⁶⁶⁾ e 10 μM , ⁽¹⁵⁾ consegue aumentar a expressão do gene pS2 ⁽⁶⁶⁾ e a secreção da proteína por ele codificada - proteína pS2. ⁽¹⁵⁾ Uma vez que a expressão deste gene é considerada uma medida de estrogénica, estes resultados corroboram o potencial efeito estrogénico do OMC.

^(15, 66)

Tomados em conjunto, os dados acima referidos sugerem que o OMC possui uma atividade estrogénica, e estão em concordância com os resultados obtidos nos estudos em animais. Inicialmente, foi colocada a hipótese do OMC possuir uma atividade semelhante à observada com o estradiol (E2). Contudo, devido ao facto de vários estudos não terem reportado uma atividade estrogénica do OMC em relação ao ErB, ^(13, 67) ou terem reportado uma atividade anti estrogénica face ao mesmo recetor, ⁽⁵⁰⁾ tem que se considerar que o OMC desempenha uma atividade do tipo agonista parcial/antagonista ⁽¹⁵⁾. Assim, sabendo que o E2 atua preferencialmente pelo ER α , e uma vez que o OMC não compartilha dos seus efeitos com o estradiol para os dois tipos de ER, poderia pensar-se, por isso, que exercia os seus efeitos estrogénicos unicamente pelo recetor de ER α , semelhantemente ao que acontece para o E2. ⁽⁶⁹⁾ Por esse motivo, alguns estudos compararam os efeitos exercidos pelo OMC e pelo E2, e o que se tem verificado é que nem sempre os efeitos exercidos por ambas as moléculas são totalmente compartilhados. ^(17, 50, 69) Foi então colocada a hipótese do OMC poder estar a atuar por um mecanismo diferente dos recetores clássicos de estrogénios - ER α e ER β - que ainda não foi explorado. ^(17, 69) Estudos posteriores são assim necessários, de modo a elucidar o mecanismo pelo qual o OMC exerce a sua atividade estrogénica. Sugere-se a utilização de bloqueadores específicos de diversos recetores ou canais iónicos, nos efeitos similares e diferentes do E2, de modo a conhecer os mecanismos celulares envolvidos neste processo.

▪ Atividade anti-androgénica

No que diz respeito aos estudos realizados de modo a avaliar a atividade androgénica do OMC em seres humanos, dois estudos sugerem que o OMC não apresenta nenhuma atividade como agonista ⁽⁷⁵⁾ nem como antagonista ⁽⁷⁶⁾ do recetor de androgénios (AR). Estes estudos usaram linhas celulares do carcinoma da mama humano (MDA-kb2) ⁽⁷⁵⁾ e linhas celulares do osteossarcoma humano (U-2 SO). ⁽⁷⁶⁾

Fazendo uma comparação com os resultados obtidos nos estudos em animais, ^(20, 74, 77) verifica-se que os estudos em humanos ^(75, 76) apresentam dados dissimilares, uma vez que não sugerem para o OMC uma atividade anti-androgénica. Neste sentido, estudos adicionais são necessários para esclarecer o efeito do OMC a este nível, devido, não só, ao reduzido número de estudos realizados até ao momento, mas também à falta de conexão dos dados obtidos. Os estudos realizados até agora, não permitem estabelecer uma relação óbvia do que acontece *in vitro/in vivo*, nem perceber os mecanismos pelos quais o OMC atua. Para além disso, e como já mencionado, uma vez que estamos perante uma atividade que está relacionada com a puberdade/hormonas sexuais é importante a realização de mais estudos *in vivo* que permitam uma comparação dos efeitos pré-puberdade/em desenvolvimento, dos efeitos numa fase do desenvolvimento maduro.

▪ Atividade anti-progestagénica

De forma a perceber de que forma o OMC consegue provocar alterações no recetor de progesterona (PR), um estudo *in vitro* foi realizado. ⁽⁷⁶⁾ Schreurs e os seus colaboradores, em 2005, avaliaram a atividade progestagénica do OMC usando bioensaios CALUX para o recetor de progesterona. Os resultados revelaram que o OMC (0,5 µM) exibe uma ação antagonista potente do recetor de progesterona (ORG2058) em células U-2 OS. ⁽⁷⁶⁾ Os resultados deste estudo concordam com os obtidos nos estudos em animais, ^(69, 74) sugerindo que o OMC pode desempenhar uma ação anti-progestagénica.

Analogamente, ao que acontece para a atividade androgénica, também poucos são ainda os estudos realizados, que avaliem a atividade progestagénica do OMC. Curiosamente, aqui, é possível fazer uma relação do que acontece em animais com o que acontece em humanos. Como referido anteriormente, uma diminuição da atividade de um recetor vem muitas vezes acompanhada de um aumento da expressão do mesmo, devido aos seus mecanismos de *feedback*. Essa resposta compensatória exercida pelo recetor, vem também associada a outros mecanismos de *feedback*, onde um aumento da expressão (transcrição) do recetor, se reflete muitas vezes numa diminuição da concentração da sua hormona-ligando. ⁽⁸¹⁾ Nos estudos realizados para avaliar a atividade progestagénica do OMC, parece existir uma correlação entre eles: neste estudo *in vitro*, o OMC ao exercer uma ação antagonista potente do PR, conseguiu desse modo, diminuir a atividade do recetor; e *in vitro*, o OMC aumentou a transcrição do PR, e diminuiu a concentração plasmática de progesterona. ^(69, 74) Por esclarecer continuam ainda, os mecanismos pelos quais o OMC realiza essa atividade anti-progestagénica, pelo que, mais estudos posteriores são necessários. Para além disso, também aqui, são necessários estudos *in vivo* que permitam comparar os efeitos pré-puberdade/em desenvolvimento, dos efeitos numa fase do desenvolvimento maduro, assim como os efeitos com e sem os órgãos sexuais envolvidos.

▪ Atividade anti-tiroideia

No que diz respeito à interferência do OMC a nível da tiróide, em linhas celulares do hepatocarcinoma humano (HepG2) foi demonstrado que este ED tem uma ação agonista do recetor da tiroide (TR). ⁽⁷³⁾ Contudo, é de referir que o ligando natural - a hormona T3 - atua neste recetor a concentrações na ordem dos pico ou nano molar, ou seja, concentrações mais elevadas às utilizadas no estudo em questão. Deste modo, estudos posteriores *in vivo* tornam-se necessários não só, para entender se de facto o OMC a uma concentração na ordem dos micro-molar tem alguma relevância fisiológica ou fisiopatológica ⁽⁷³⁾ mas também, para confirmar ou refutar a atividade anti-tiroidea anteriormente demonstrada nos estudos em animais.

Mais recentemente foi ainda demonstrado, na linha celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), que os níveis de expressão de 10 genes (ID2, ID3, CCL2, TBX3, TGOLN2, C1orf71, ZNF676,

GULP1, KLF9 e ITGB5) foram alterados por vários disruptores químicos de deiodinases, incluindo o OMC. Estes dados são sugestivos que estes genes podem ser potenciais biomarcadores para a deteção de uma deficiência de deiodinases e, conseqüentemente podem ajudar na previsão acerca dos seus efeitos ao nível da produção de hormonas da tireóide. ⁽⁹⁰⁾

▪ **Atividade não relacionada com ER, AR, PR e TR**

Estudos recentes têm reportado para o OMC uma série de efeitos que parecem não estar directamente co-relacionados com a sua actividade ao nível dos recetores de estrogénios (ER), de androgénios (AR), da progesterona (PR) ou da tiroide (TR), em humanos.

Começando pelo sistema nervoso central, um outro estudo também usando a linha celular de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y) foi realizado de modo a compreender os efeitos do OMC ao nível da viabilidade celular e processo apoptótico. ⁽⁸³⁾ Os resultados demonstraram que o OMC afetou a viabilidade das células nervosas, possivelmente através do aumento do processo de apoptose (atividade da caspase-3). Este processo apoptótico pode ser um dos fatores envolvidos na patogénese de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson ou de Alzheimer, ⁽⁸³⁾ pelo que estes resultados são sugestivos que o OMC possa ser um promotor de doenças neurodegenerativas.

Em relação ao sistema imunitário humano, um estudo com células imunes humanas realizado por *O'Keefe* e os seus colaboradores demonstrou que o OMC não apresenta citotoxicidade em monócitos, nem mesmo na maior concentração utilizada no estudo ($EC_{50} = 200 \mu\text{g/mL}$). Também em monócitos, o OMC não foi capaz de alterar os níveis de IL-8, mas pelo contrário, em macrófagos, os níveis de IL-8 aumentaram ligeiramente quando estas células foram expostas ao OMC. No entanto, este aumento não foi considerado estatisticamente significativo. ⁽⁸⁸⁾ Pelo contrário, ainda este ano, *Sharma* e os seus colaboradores demonstraram que ambos os isómeros do OMC apresentam genotoxicidade em células estaminais humanas do fígado (HL1-hT1) e em células lífoblastoides humanas (TK-6). ⁽²⁷⁾

Por último, este ano também foi ainda reportado que o OMC pode influenciar diretamente o sistema endócrino. *Strajhar* e os seus colaboradores demonstraram usando a linha de células corticais adrenais humanas H295R que o OMC aumenta a produção de corticosteroides, através da indução da expressão de CYP11B2 (a enzima que converte os glucocorticoides em aldosterona) e de 3 β -HSD2 (a enzima que converte a pregnenolona em progesterona). ⁽⁸⁷⁾

Apesar das múltiplas actividades hormonais (acima mencionadas) já reportadas para o OMC, estudos recentes demonstraram, curiosamente, que este filtro UV é bem tolerado com menor irritação de pele ou dermatite atópica, sendo os efeitos colaterais observados mais frequentes numa fase mais tardia, após aplicação tópica. ^(32, 38, 42, 43) No entanto, foi verificado que o OMC consegue reduzir a taxa de sobrevivência de células humanas, o que indica que o OMC é tóxico para as células de mamíferos. ^(38, 83) Foi também reportado que o OMC pode gerar espécies

reativas de oxigénio na epiderme, levando ao aparecimento de danos oxidativos na pele e células subjacentes. ⁽⁴⁰⁾ Estudos *in vitro* já reportaram que o OMC causa genotoxicidade. ^(82, 89) Para além da pele, uma outra matriz biológica foi utilizada para estudar os efeitos do OMC - o cabelo humano. Estudos realizados por Li e os seus colaboradores demonstraram que o tratamento com OMC reduziu significativamente a peroxidação lipídica e a degradação protéica dos cabelos. Estes resultados sugerem que o OMC é capaz de bloquear a radiação UV-B no cabelo e protege as fibras, mantendo-as intactas. ⁽⁸⁶⁾

Em suma, o OMC parece ter múltiplos alvos no corpo humano, com alterações a nível dos sistemas nervoso, imune e endócrino já reportadas. A nível dermatológico, alguns estudos foram também realizados. Uma vez que já foi demonstrado que o OMC é um disruptor endócrino com evidências crescentes que sugerem múltiplas alterações no corpo humano, é importante considerar que este é um assunto de grande interesse público. Neste sentido, mais estudos são necessários não só para aumentar a informação disponível (que ainda é escassa) mas para esclarecer também quais as reais as implicações que este filtro UV tem para a saúde humana.

1.9.2 Estudos *in vivo*

Até ao momento, apenas três estudos experimentais *in vivo* analisaram os efeitos da desregulação endócrina exercida pelo OMC em humanos. ^(51, 84, 85)

Janjua e os seus colaboradores, avaliaram os efeitos de uma mistura de três filtros UV, entre eles o OMC, nas hormonas reprodutivas ⁽⁸⁵⁾ e da tiroide, ⁽⁸⁴⁾ após aplicação tópica de 2 mg/cm² de protetor solar, por todo o corpo. ^(84, 85) Os resultados revelaram uma diminuição, pequena mas significativa, de testosterona, estradiol e inibina B, ⁽⁸⁵⁾ e nenhuma alteração nos níveis de triiodotironina livre (FT3), tiroxina livre (FT4), triiodotironina total (T3), tiroxina total (T4) e globulina de ligação à tiroxina (TBG). ⁽⁸⁴⁾ Estes últimos resultados levantam a hipótese de que o OMC não é capaz de perturbar a homeostase das hormonas da tiroide em humanos adultos. ⁽⁸⁴⁾ Os níveis da hormona folículo-estimulante (FSH), da hormona luteinizante (LH) e da globulina de ligação às hormonas sexuais (SHBG), também avaliados, não demonstraram qualquer alteração, levando a crer que as concentrações sistémicas do OMC também parecem não interferir com o eixo hipotálamo-pituitária-gónadas (eixo HPG). ⁽⁸⁵⁾ No entanto, todos estes resultados foram considerados ser devido a uma variação biológica, e não à aplicação da mistura dos filtros. ^(84, 85) Note-se que, uma vez que a duração desses estudos foi demasiado curta - 2 ⁽⁸⁵⁾ e 12 ⁽⁸⁴⁾ semanas e a concentração utilizada foi apenas uma - os mesmos não podem ser tomados como conclusivos.

Mais tarde, em 2008, um outro estudo experimental realizado novamente por *Janjua* e os seus colaboradores demonstrou que o OMC é rapidamente permeado pela pele de forma intacta, e pode ser detetado no plasma 1-2h após a sua aplicação. O mesmo estudo, com a duração de 4 dias, demonstrou ainda que o OMC é excretado na urina, na ordem dos ng/ml. Curiosamente,

as concentrações de OMC foram mais elevadas a nível plasmático e urinário para homens, do que para mulheres. ⁽⁵¹⁾ Estes resultados são sugestivos de uma diferença entre homens e mulheres quanto à farmacocinética do OMC, bem como da existência de um possível efeito crónico. Contudo, é de referir que o destino metabólico, bem como a farmacocinética do OMC continuam, até agora, por desvendar.

1.9.3 Estudos epidemiológicos

Estudos epidemiológicos indicaram que é possível encontrar o OMC no leite materno humano. ^(19, 48) Resumidamente, foram recolhidas amostras de leite de mães, e realizados questionários às progenitoras acerca da sua utilização de produtos de cosmética, contendo filtros ultravioleta. ^(19, 48) Os resultados permitiram demonstrar a presença de filtros UV no leite materno em 76,5% das amostras ⁽¹⁹⁾ e correlacioná-los com o uso de protetores solares em 54,72% dos casos. ⁽⁴⁸⁾ O OMC estava presente numa percentagem de cerca de 60% das amostras. ^(19, 48) Curiosamente, a maioria das mulheres que mencionaram o uso de produtos cosméticos, contendo filtros ultravioleta, não usaram protetores solares. ^(19, 48) Estes dados levantam a hipótese de uma possível via de exposição neonatal a este filtro. Mais estudos são necessários para confirmar isso.

1.10 OMC e o seu efeito a nível vascular

Até à data, não existem dados publicados relativamente aos efeitos do octilmetoxicinamato (OMC) a nível vascular, nem sobre o seu papel como disruptor endócrino (ED) no possível envolvimento em doenças cardiovasculares (CVDs).

Atualmente, as CVDs constituem uma das principais causas de morte a nível mundial e, de acordo com um relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), afetam dezenas de milhões de seres humanos a cada ano. Portanto, é emergente e importante, encontrar uma forma de melhorar o seu diagnóstico, tratamento e prevenção. ⁽⁹¹⁾

Um estudo realizado pelo nosso grupo de investigação, e não publicado ainda, foi pioneiro em avaliar a ação do OMC no sistema cardiovascular. ⁽⁹²⁾ Tendo em conta o potencial estrogénico como ED do OMC, já descrito em estudos anteriores, os autores colocaram a hipótese inicial do OMC poder estar a apresentar efeitos a nível vascular, semelhantes aos dos estrogénios. Neste sentido, artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio foram utilizadas para estudos de contractilidade arterial, usando a técnica de banho de órgãos. Os resultados demonstraram que o OMC foi capaz de induzir um rápido relaxamento nas artérias contraídas tanto com serotonina (5-HT; 1 μ M) como cloreto de potássio (KCl; 60mM). Os efeitos vasorelaxantes foram semelhantes independentemente do agente contráctil usado e o relaxamento máximo foi conseguido para uma concentração de 50 μ M de OMC. Foi sugerido que o OMC, a curto prazo,

poderia estar a desencadear um vasorelaxamento - de forma semelhante ao E2 - por um mecanismo não genómico e independente de endotélio. ⁽⁹²⁾

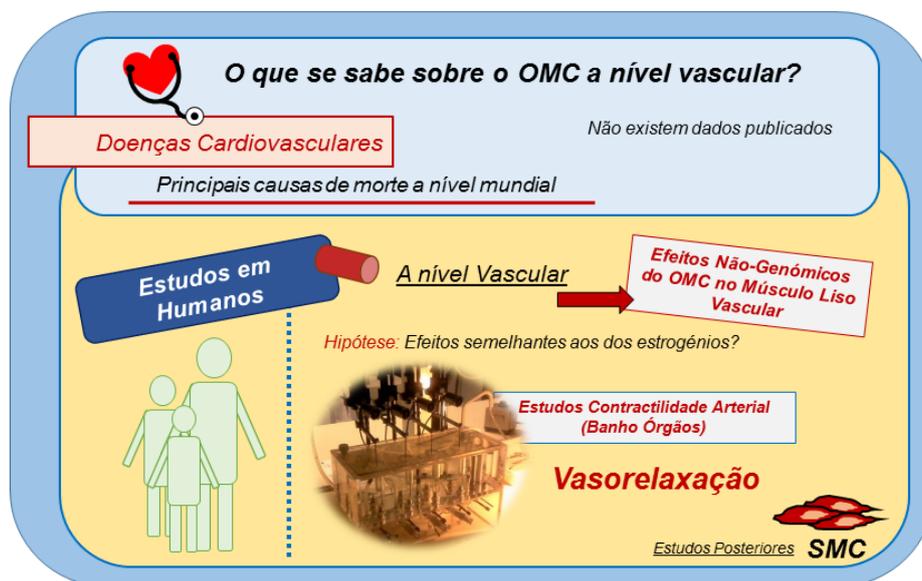


Figura 5 - Esquema-resumo do efeito do OMC a nível vascular

Estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação do OMC a nível vascular, pois os dados relativos aos seus efeitos ou sobre o seu possível envolvimento em patologias cardiovasculares continuam a ser mínimos. Uma vez que se sabe hoje que a proliferação anormal de células musculares lisas (SMC) vasculares é uma das principais causas de CVDs, ⁽⁹¹⁾ a utilização deste tipo de células poderá ser útil para estudos com o OMC.

1.11 Células musculares lisas (SMC)

As células musculares lisas (SMC) vasculares são as células responsáveis pelo tónus vascular, ⁽⁹³⁾ respondendo a vários estímulos hormonais e hemodinâmicos. ⁽⁹⁴⁾ Constituindo a maior parte da parede de um vaso sanguíneo, as SMC estão hoje identificadas com um papel importante na patogénese de doenças cardiovasculares. ⁽⁹¹⁾ Sabe-se que quando um vaso sanguíneo é exposto a uma alta pressão, como o estiramento mecânico, essas forças prejudiciais levam a expressão diferencial de genes que, de seguida, induzem hipertrofia e hiperplasia das SMC, bem como alterações ao nível das proteínas da matriz e a nível fenotípico: as SMC passam de um fenótipo contráctil a um fenótipo sintético. ⁽⁹¹⁾

A este tipo de transição entre fenótipos diferentes dá-se o nome de "modulação fenotípica" ou "remodelação vascular". Neste caso, o que acontece é que as SMC, que no seu fenótipo contráctil se apresentam como células alongadas e fusiformes, mudam para um fenótipo sintético apresentando-se como menos alongadas e com uma morfologia de paralelepípedos,

⁽⁹¹⁾ assemelhando-se a células endoteliais. ^(95, 96) Muitos estudos sugerem que a lesão vascular desencadeia este fenómeno nas SMC, no entanto, os mecanismos moleculares subjacentes não são ainda claros. ⁽⁹¹⁾ A utilização das SMC é por isso essencial para o estudo dos vários processos de sinalização envolvidos no controlo do tónus vascular, tais como o metabolismo do cálcio (Ca^{2+}) e diferentes vias envolvidas na modulação da reatividade vascular. ^(94, 97, 98)

Contudo, a obtenção deste tipo de células é limitada pela dificuldade de obtenção de um tecido humano, para isolamento e cultura das mesmas. É neste sentido, que o cordão umbilical humano se apresenta como uma solução muito importante. Rico em SMC humanas, e frequentemente descartado, é uma amostra que facilmente é obtida após o nascimento, e por não acarretar quaisquer perigos para a mãe, ou para a saúde do recém-nascido, constitui por isso uma boa amostra a ser usada para este tipo de estudos.

1.11.1 Cordão Umbilical Humano (HUC)

O cordão umbilical humano é um canal desenvolvido a partir do saco vitelino e alantoide, que assume a função de permitir a comunicação entre o embrião em desenvolvimento (feto) e a placenta. ⁽⁹⁹⁾ Provavelmente é o único órgão que morre quando a vida começa, mas é uma das partes mais importantes na unidade feto-placentária, pois desempenha o papel fundamental de determinar a forma como começará a vida extrauterina. ⁽¹⁰⁰⁾

No término da gestação, este anexo embrionário possui aproximadamente 1 a 2 cm de diâmetro e 30 a 90 cm de comprimento, mas pode acontecer, muito raramente, que seja mais comprido ou mais curto. Sabe-se, por um lado, que cordões muito longos têm tendência ao prolapso, a enrolarem-se em torno do feto e a formarem nós; e por outro, que cordões curtos podem levar à separação prematura da placenta da parede do útero durante o parto, por isso é importante, e necessário, fazer um controlo rigoroso para que não hajam consequências para o feto, como uma possível hipoxia fetal ou anoxia. ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾

O cordão umbilical caracteriza-se por ser bastante flexível e apresentar geralmente um aspeto esbranquiçado e brilhante, uma vez que está revestido por um epitélio simples, derivado do âmnio. ^(104, 105) Apresenta também uma forma helicoidal, devido ao típico enrolamento em espiral dos vasos sanguíneos que o constituem. ^(104, 106) É de acrescentar que, os vasos umbilicais diferem em estrutura e função comparativamente aos principais vasos do corpo humano ⁽¹⁰⁶⁾ e, como são mais compridos do que o próprio cordão, pode acontecer a sua torção ou flexão. ^(101, 102)

Este órgão fetal é composto por um tecido conjuntivo mucoso - designado de geleia de *Wharton* - sendo esta o seu componente maioritário e, a responsável pelo seu aspeto gelatinoso. ^(99, 106, 107) Esta geleia é constituída por células do tecido conjuntivo dispersas numa matriz de superfície amorfa de glicosaminoglicanos (como ácido hialurónico e sulfato de condroitina) e diferentes tipos de colagénio; e apresenta a particularidade de não possuir *vasa vasorum*. É

esta substância gelatinosa que rodeia os vasos umbilicais, e assume a função de os proteger da aglomeração e conferir-lhes flexibilidade. E tem ainda a responsabilidade de dar ao cordão uma certa firmeza (de modo a deixá-lo intacto), graças ao seu conteúdo fibroso e poroso feito de fibras de colagénio e elastina. (99, 106, 107)

Habitualmente, o cordão umbilical (**Figura 6**) é constituído por duas artérias e uma única veia que estão, como referido em cima, rodeadas pela geleia de *Wharton*, e uma única camada celular externa de âmnio. (99, 104, 106-108) Pode acontecer, em 1% dos casos, que o cordão apenas contenha uma única artéria, mas com muita frequência essa anomalia vem associada a complicações vasculares para o recém-nascido. (103) Na circulação feto-placentária, a veia umbilical é o grande vaso responsável pelo transporte de sangue rico em oxigénio para o feto, enquanto as artérias umbilicais são as responsáveis pelo transporte de sangue pobre em oxigénio do feto para a placenta. Normalmente, não ocorre mistura do sangue fetal com o sangue materno, mas pode acontecer que quantidades ínfimas de sangue fetal penetrem na circulação materna através de minúsculas falhas que, algumas vezes, se formam na membrana placentária. A veia umbilical (**Figura 7**) tem em comum com as artérias, o facto de ambas possuírem uma estrutura similar, contudo, as suas paredes são um pouco mais finas do que as arteriais. Acrescentar, está ainda que as artérias umbilicais são mais facilmente identificáveis, uma vez que têm um calibre mais pequeno (3 mm), comparativamente às veias (6 mm). (101-105)



Figura 6 -Secção transversal de um cordão umbilical humano, onde se pode observar as duas artérias umbilicais humanas (na parte superior) e a veia umbilical (no centro).

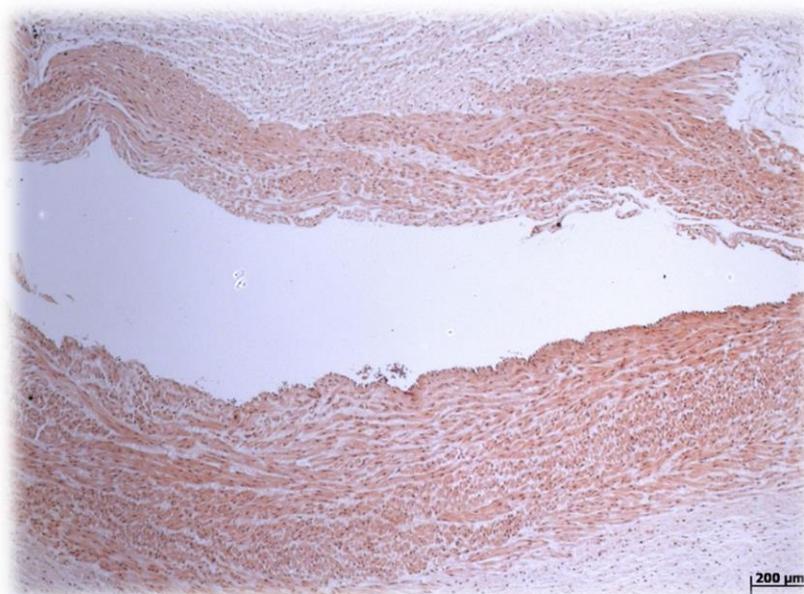


Figura 7 -Secção transversal de uma veia umbilical humana

1.11.2 Artéria Umbilical Humana (HUA)

A artéria umbilical humana (HUA) é um dos vasos presentes no cordão umbilical, e está envolvida na circulação feto-placentária. ⁽¹⁰⁵⁾ Para além do seu fácil acesso, através do cordão umbilical, esta artéria é considerada de elevada importância, pois constitui hoje uma fonte única e muito útil para diversos estudos. ⁽¹⁰⁹⁻¹¹¹⁾

Do ponto de vista fisiológico, a HUA apresenta-se como sendo uma artéria muscular de calibre médio (1 e 10mm), e cujas paredes são predominantemente constituídas por fibras musculares. No geral, esta artéria é constituída por três túnicas concêntricas, que diferem entre si ao nível da morfologia. ^(112, 113) Do interior, para o exterior essas túnicas são: a íntima, a média e a adventícia.

A túnica interna ou íntima (endotélio), formada por uma única camada de células endoteliais, apresenta-se como sendo uma camada simples de endotélio que não apresenta nenhuma camada sub-endotelial ou lâmina elástica interna adjacente. Deste modo, o endotélio fica assim em contacto direto com a camada muscular. ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾ Devido a não possuírem essa tal membrana elástica interna, as HUA têm muito menos elasticidade relativamente às outras artérias. ⁽¹⁰⁶⁾ Esta camada tem como principais funções, o controlo da permeabilidade vascular e a regulação do tónus vascular. O endotélio funciona como um sensor de alterações hemodinâmicas e de sinais ou estímulos químicos da corrente sanguínea, transmitindo-os posteriormente às células do músculo liso (SMC) vasculares. ^(114, 116, 117)

Já no que diz respeito à túnica média ou própria, as artérias umbilicais voltam novamente a destacar-se comparativamente às restantes. Desta vez, e ao contrário das demais, as artérias umbilicais humanas possuem uma camada muscular média formada não por uma, mas por duas

diferentes camadas de SMC (**Figura 8**): uma por dentro dos feixes musculares (interna) e outra por fora dos mesmos (externa). ^(108, 113)

A camada média mais externa é menos definida que a interna, e apresenta um aspeto estrutural típico caracterizado por uma disposição circular. Mais especificamente, as células musculares lisas desta camada estão dispostas circularmente, conferindo à mesma, esta característica tão particular. Esta camada é ainda de extrema importância, pois é nela que têm origem as contrações que levam ao fecho fisiológico das artérias umbilicais. ^(108, 113) Em contraste, encontra-se a camada média mais interna, cujo aspeto é mais enrugado. A grande maioria das células musculares lisas nesta camada encontram-se dispostas linear ou longitudinalmente (em relação ao eixo da artéria) e de uma forma desordenada/dispersa numa substância fundamental amorfa que é pobre em fibras elásticas, mas muito plásticas. Esta plasticidade parece ser o modo de cooperação entre ambas as camadas, onde o processo de encerramento das artérias umbilicais consegue ficar completo: a contração das células musculares, dispostas circularmente, empurra a substância amorfa para dentro do lúmen da artéria, ocluindo-a. Deste modo essa plasticidade da camada muscular mais interna parece ser a responsável pela oclusão fisiológica da HUA no pós-parto. ⁽¹⁰⁸⁾

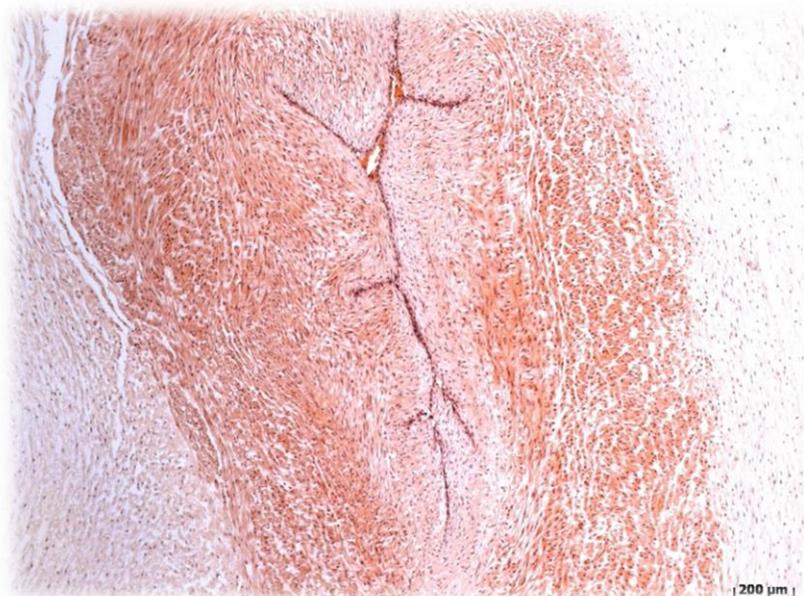


Figura 8 -Secção transversal de uma HUA com endotélio, onde se pode observar a disposição das duas camadas de células musculares lisas vasculares, sendo a longitudinal mais interna e a outra circular.

Finalmente, encontra-se a túnica mais externa ou adventícia. Tal como já mencionado, as HUA não possuem *vasa vasorum*, e de igual modo, são também desprovidas de uma túnica externa. A função desta túnica é exercida pela geleia de *Wharton*. ^(105, 106)

Uma vez que os vasos sanguíneos não são assim inervados, ^(106, 108, 118, 119) o controlo do fluxo sanguíneo umbilical depende inteiramente de substâncias vasoativas libertadas localmente ou existentes na circulação, como a serotonina (5-HT), a histamina (His) ⁽¹¹⁹⁾ e o tromboxano, e de

alguns iões como o cálcio (Ca^{2+}) e o potássio (K^+).^(120, 121) De igual modo, o tónus da HUA - essencial ao crescimento e desenvolvimento fetal⁽¹²²⁾ - é modulado por mecanismos endócrinos e parácrinos que regulam o fenótipo contrátil das SMC na artéria umbilical humana, sendo essa regulação extremamente importante para a troca ótima de gás e nutrientes entre o feto e a placenta.^(123, 124)

As células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC) parecem, deste modo, desempenhar um papel importante no controlo do fluxo sanguíneo feto placentário,^(94, 105) pelo que é importante realizar culturas das mesmas, a fim de investigar questões moleculares e genéticas relacionadas com a sua contratilidade e saber também quais os fatores que regulam o fluxo sanguíneo na circulação umbilical. Deste modo, consegue-se mais facilmente caracterizar os mecanismos celulares que regulam o tónus dos vasos umbilicais, constituindo a compreensão de tais mecanismos uma ferramenta útil na terapêutica de algumas patologias cardiovasculares.

1.11.3 Cultura de células musculares lisas (SMC)

As células musculares lisas (SMC) vasculares podem ser isoladas da artéria umbilical humana, a partir do cordão umbilical humano conforme descrito por vários autores. Uma das primeiras dificuldades, aquando da realização de culturas de SMC é a obtenção de culturas puras, isto é, sem contaminações por células endoteliais, provenientes da túnica íntima, e/ou fibroblastos, da túnica adventícia. A eliminação da túnica íntima não foi realizada por alguns autores em artérias umbilicais humanas,⁽¹²⁵⁾ artérias omentais humanas⁽¹²⁶⁾ ou artérias placentárias humanas,⁽¹²⁷⁾ aumentando assim a possibilidade de contaminação das culturas de SMC vasculares com células endoteliais. Neste sentido, para evitar a contaminação com este tipo de células, alguns autores procedem à remoção mecânica do endotélio.^(94, 128, 129) A remoção da camada adventícia é prática corrente no isolamento de artérias,⁽¹²⁸⁻¹³²⁾ contudo não garante a remoção total dos fibroblastos, uma vez que a túnica média apresenta algumas porções estritamente associadas à adventícia. Para resolver este problema, alguns autores removem a porção da camada média mais interna, evitando a utilização das partes que estão em contacto com a adventícia.^(94, 129)

Na literatura encontram-se descritos diferentes métodos para obter culturas primárias de SMC vasculares.^(128, 130, 131) Alguns destes autores realizaram dissociações enzimáticas para isolar estas células, como por exemplo Cairrão e os seus colaboradores que utilizaram a dissociação enzimática com uma mistura de proteases, de forma a isolar HUASMC da camada média.⁽⁹⁴⁾ Outros autores também utilizaram este método na HUA, no entanto tempo de digestão utilizado foi superior, de 25 minutos⁽¹³³⁾ ou 150 minutos⁽¹²⁵⁾, uma vez que não removeram a adventícia e/ou endotélio. Várias misturas de enzimas foram utilizadas por diferentes investigadores para quebrar o tecido conectivo e libertar as SMC vasculares de distintas artérias.^(98, 130-132) A maioria destes autores utilizaram uma combinação de colagenase e elastase, no entanto alguns também

utilizaram papaína. Outros autores utilizaram explantes da artéria umbilical para a obtenção de culturas, assim colocaram pedaços intactos do músculo liso vascular em placas com meio de cultura, onde as células migram do tecido para a superfície da placa de cultura. ^(128, 134)

Uma outra dificuldade para a obtenção de culturas de SMC é a multiplicidade de fenótipos que pode ser encontrada numa cultura celular de SMC, que é bastante grande pois podem encontrar-se SMC no fenótipo contráctil, no fenótipo sintético ou num fenótipo intermédio entre ambos. Sendo que cada um está associado e caracterizado por alterações na morfologia, proliferação e expressão de diferentes proteínas, o que auxilia na identificação e definição dos mesmos. As células com fenótipo sintético são caracterizadas por apresentarem uma grande capacidade proliferativa e migratória e uma grande atividade de síntese de componentes da matriz extracelular. ^(93, 96, 135) Mas pelo contrário, as células com fenótipo contráctil, quando atingem o seu fenótipo completamente diferenciado e maduro, exibem uma baixa taxa de proliferação e pouca atividade sintética e proliferativa; apresentam-se como sendo células altamente especializadas que expressam um repertório específico de proteínas contrácteis, assim como diferentes tipos de canais iónicos, enzimas, e recetores de membrana, que regulam a função contráctil. ⁽¹³⁶⁾ Acontece que, em cultura, as SMC podem diferenciar-se num padrão fenotípico sintético, devido à presença de fatores de crescimento nos meios de cultura, o que constitui um problema, pois o padrão fenotípico sintético representa o espectro oposto das SMC contrácteis - as responsáveis pelo tónus dos vasos sanguíneos. ^(93, 96, 135) Deste modo, é extremamente importante ter a certeza que se está perante SMC que se encontram num fenótipo contráctil.

Neste sentido, a morfologia celular constitui um parâmetro importante a ter em conta. O seu estudo pode ser feito através da análise de marcadores de expressão, do seu potencial proliferativo ou das suas propriedades migratórias. Sendo, que entre essas estas estratégias, a análise de marcadores de expressão é a mais utilizada e aceite. ⁽¹³⁷⁾ Três dos marcadores de expressão mais utilizados são a α -actina do músculo liso (α -SMA, do inglês *a-smooth muscle actin*); as cadeias pesadas de miosina do músculo liso (SM-MHC, do inglês *smooth muscle - myosin heavy chain*) e os canais de cálcio operados por voltagem do tipo L (LTCC) ^(93, 135, 137, 138) uma vez que já foi demonstrado o seu envolvimento na contração destas células, como componentes estruturais do aparelho contráctil ou como reguladoras da contração.

Vários autores tentaram encontrar um marcador específico do fenótipo contráctil das células, uma vez que é este fenótipo que está envolvido na regulação do tónus vascular, contudo este marcador ainda não existe. ⁽⁹⁷⁾ Mazza e os seus colaboradores conseguiram obter culturas primárias de HUASMC e sugeriram a análise de marcadores endoteliais e do marcador mesenquimal CD10 para a caracterização das HUASMC. ⁽¹³²⁾ Outros autores conseguiram obter com sucesso culturas puras de SMC, sem contaminações por células endoteliais e/ou fibroblastos (**Figura 9**), e demonstraram que a cultura era pura através da análise de alguns marcadores de expressão, por real-time PCR e imunofluorescência. ^(94, 128, 139) Para além disso, estudos de eletrofisiologia usando a técnica de Patch-Clamp na configuração Whole-Cell,

permitiram demonstrar que estas células podiam também ser utilizadas em estudos de eletrofisiologia, uma vez que apresentavam canais de cálcio e de potássio funcionais. ⁽⁹⁴⁾ Por último, nesse estudo e num estudo realizado por *Rensen* e os seus colaboradores foi demonstrado que depois de atingirem a confluência plena, as células foram deixadas durante 24 horas em meio sem soro e apresentavam o fenótipo contráctil. ^(94, 137) Mais recentemente foi apontado o *transforming growth factor* (TGF)- β como fator diferenciador deste tipo de células. ⁽⁹⁶⁾

Deste modo, culturas primárias de células musculares lisas (SMC) podem ser realizadas, conforme descrito por estes autores, para diversos estudos posteriores, nomeadamente, para estudar aspetos celulares e moleculares sobre a regulação da função vascular exercidos pelo OMC.

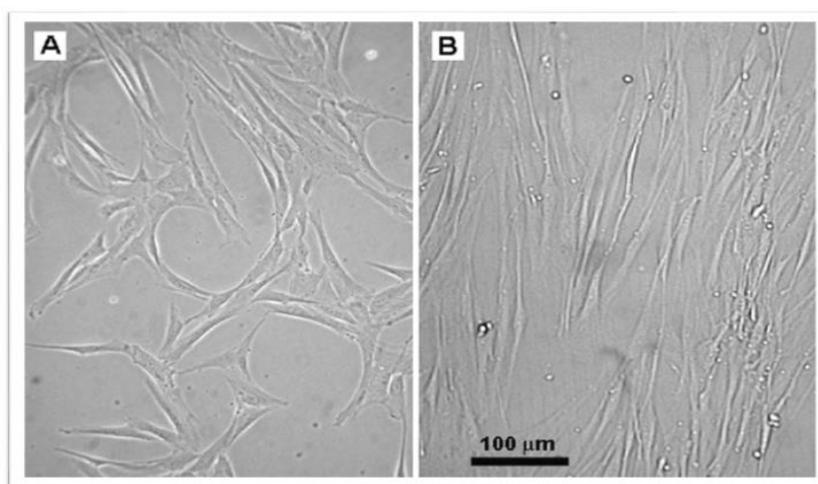


Figura 9 - Cultura de células do músculo liso da artéria umbilical humana (HUASMC), onde A: ilustra o crescimento celular após 10 dias e B: ilustra o crescimento celular após 17 dias. Adaptado de ⁽⁹⁴⁾.

1.12 Regulação da função vascular da HUA

A compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na regulação da circulação fetoplacentária, é fundamental para o esclarecimento de processos patológicos de algumas doenças cardiovasculares, como é o caso da pré-eclâmpsia ou da hipertensão.

As artérias umbilicais humanas são excelentes fontes de células musculares lisas (SMC) vasculares. A contração das SMC é controlada geralmente pelo sistema nervoso autónomo, pelo sistema hormonal e por mediadores locais de ação parácrina. O fenótipo contráctil das SMC vasculares é influenciado por numerosas substâncias vasoativas, que podem ser vasodilatadoras ou vasoconstritoras, ou por estímulos físicos. Geralmente, a regulação da contractilidade das células musculares lisas vasculares depende da modificação da concentração intracelular do ião Ca^{2+} e, normalmente, as moléculas vasoconstritoras atuam aumentando os níveis intracelulares de Ca^{2+} citosólico, enquanto que, as vasodilatadoras diminuem estes níveis.

Contudo, algumas moléculas vasoativas também podem atuar através da sensibilização ou dessensibilização do aparelho contráctil das SMC vasculares. Os níveis da concentração de Ca^{2+} citosólico são regulados através do controle das entradas e saídas de Ca^{2+} da célula e também através da sua libertação e captação pelo retículo endoplasmático, estando estas duas componentes estreitamente relacionadas.

Os aspetos celulares e moleculares sobre a regulação da função vascular exercidos pelo OMC, podem ser estudados em maior detalhe a partir de estudos de contractilidade arterial e celular, com as artérias umbilicais humanas (HUA) e com as células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC), respetivamente. Neste capítulo irão ser abordados os mecanismos atualmente descritos para a regulação fisiológica da artéria umbilical humana.

1.12.1 Contração das células musculares lisas na HUA

Tal como já mencionado, a HUA não possui terminações nervosas, pelo que a regulação do seu tónus não depende do sistema nervoso autónomo e depende inteiramente de substâncias vasoativas libertadas localmente ou existentes na circulação, como as prostaglandinas, a serotonina e a histamina, ^(119, 140) e de alguns iões como o cálcio (Ca^{2+}) e o potássio (K^+). ^(120, 121) Estudos já demonstraram que vários são os agentes capazes de induzir vasoconstrição na HUA, dos quais são exemplo a serotonina (5-HT), ^(118, 141-145) a histamina, (His) ^(118, 145-147) o tromboxano, ^(124, 145) a bradicinina, ^(145, 148, 149) a endotelina 1, ^(145, 150, 151) a prostaglandina $\text{F2}\alpha$ ($\text{PGF2}\alpha$) ⁽¹⁴⁰⁾ e o cloreto de potássio (KCl). ^(118, 120, 142, 145) Por outro lado, agentes como a noradrenalina e a angiotensina II não provocam vasoconstrição nestas artérias. ⁽¹⁴⁵⁾ É de notar que o efeito de alguns dos agentes vasoativos na HUA é dependente do endotélio, como é o caso da endotelina, que pode provocar uma vasodilatação via recetores endoteliais de endotelina (ET_B), ou uma vasoconstrição via recetores de endotelina (ET_A) do músculo liso. ⁽¹⁵⁰⁻¹⁵²⁾ A ativação do recetor ET_B e o ET_A nas células musculares lisas parece estar acoplado à proteína Gq, que ativa a fosfolipase C (PLC), resultando num aumento dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e na contração do músculo liso vascular, ⁽¹⁵³⁾ contudo estes mecanismos nunca foram demonstrados na HUA, apenas se sabe que os canais de cálcio dependentes de voltagem estão envolvidos na HUA. ⁽¹⁵⁴⁾ No referente ao outro agente vasoativo também relacionado com o endotélio, a bradicinina, este também induz contração nas HUA, sendo este efeito dependente da ativação do recetor B_2 , ⁽¹⁴⁹⁾ que parece estar relacionado com a ativação de canais de cálcio dependentes de voltagem e da Na^+/K^+ -ATPase, assim como da inativação de canais de potássio. ⁽¹⁴⁸⁾

De entre estes mediadores vasoativos referidos, a serotonina é considerada o agente vasoconstritor mais potente da HUA, sendo a responsável pelo encerramento fisiológico da artéria umbilical após o parto. ⁽¹⁴⁵⁾

Relativamente à 5-HT, foi demonstrado que em HUA sem endotélio, os seus efeitos contrácteis são devidos à ativação dos recetores 5-HT_{2A} e parcialmente devidos à ativação dos recetores 5-HT_{1B}/5-HT_{1D}, presentes no músculo liso desta artéria. ⁽¹²²⁾ O recetor 5-HT_{2A} está acoplado à proteína G_q e ativa a fosfolipase C (PLC), resultando num aumento dos níveis de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). ^(122, 155-158) Por outro lado, os recetores 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} estão acoplados à proteína G_{i/o} e inibem a adenil ciclase. A ativação de todos estes recetores leva a uma consequente contração. ^(119, 155)

No caso da His, a contração é conseguida pela ativação dos recetores H₁ presentes no músculo liso da HUA. Este recetor que está interligado a uma proteína G_q ativa a cascata de sinalização PLC/IP₃, levando a um aumento intracelular de cálcio, e consequente contração. ^(119, 122, 159)

Curiosamente, foi demonstrado que o músculo liso da HUA também exprime um outro recetor de serotonina (5-HT₇) que está associado a uma proteína G_s e, dois outros recetores de His (H₂ e H₃). A ativação destes recetores estimula a adenil ciclase, e leva, consequente a uma vasorelaxação. ^(118, 119, 122) Embora o mecanismo de vasodilatação induzido pelo recetor H₃ ainda necessite de ser estudado em maior detalhe, é notório que os efeitos contrácteis da 5-HT e da His são o resultado da ativação de diferentes tipos de recetores e vias, que medeiam uma contração ou até, um relaxamento.

Em relação à vasoconstrição provocada pelo tromboxano e pela prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), sabe-se apenas que poderá ser provocada pelos recetores TP_α e TP_β e pelos recetores FPA e FPB, respetivamente. ⁽¹⁶⁰⁾ Foi demonstrado que estes recetores estão acoplados a uma proteína G_q, que ao ativar a cascata de sinalização PLC/IP₃, leva a um aumento intracelular de cálcio, e consequente contração. Contudo, o seu exato mecanismo na HUA nunca foi analisado.

Nas SMC, o aumento da concentração de cálcio intracelular é o passo fundamental no início da contração. A entrada deste íão no citosol envolve uma diversidade de canais que podem ser divididos em dois grupos: canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem (VOCCs) (que incluem os canais de Ca²⁺ do tipo L, T e do tipo P/Q) e canais de Ca²⁺ independentes de voltagem (que incluem canais operados por recetores (ROCC), canais operados por depósitos intracelulares (SOCC) e canais ativados pelo *stress* físico (SACC)). ^(111, 161) A presença de todos estes canais já foi detetada em SMC, mas atualmente só os VOCC do tipo L e do tipo T apresentam informação coerente e esclarecedora. Foi demonstrado que os canais de cálcio do tipo L (LTCC) são determinantes para o tónus arterial, enquanto os canais de cálcio do tipo T parecem desempenhar um papel importante na proliferação celular das SMC. ^(162, 163) A inexistência de uma variedade de estudos, que elucidem o papel dos restantes canais na contractilidade do músculo liso, faz com que este tema ainda permaneça em debate, pelo que estudos posteriores são requeridos de modo a colmatar as lacunas de informação ainda existentes.

No que diz respeito ao KCl, foi demonstrado que a contração induzida por este agente deve-se principalmente ao influxo de cálcio extracelular, por via dos VOCC. ⁽¹²⁰⁾ A contração induzida

por este agente contráctil, demonstrou ser inibida por antagonistas específicos dos canais de cálcio do tipo L (LTCC), nomeadamente pela nifedipina (Nif). ⁽¹⁶⁴⁾

A **Figura 10** mostra uma representação esquemática de como todos os agentes vasoativos mencionados acima atuam sobre o músculo liso vascular da HUA, causando uma vasoconstricção. Ao longo deste trabalho apenas vão ser usados a serotonina (5-HT), a histamina (His) e o cloreto de potássio (KCl).

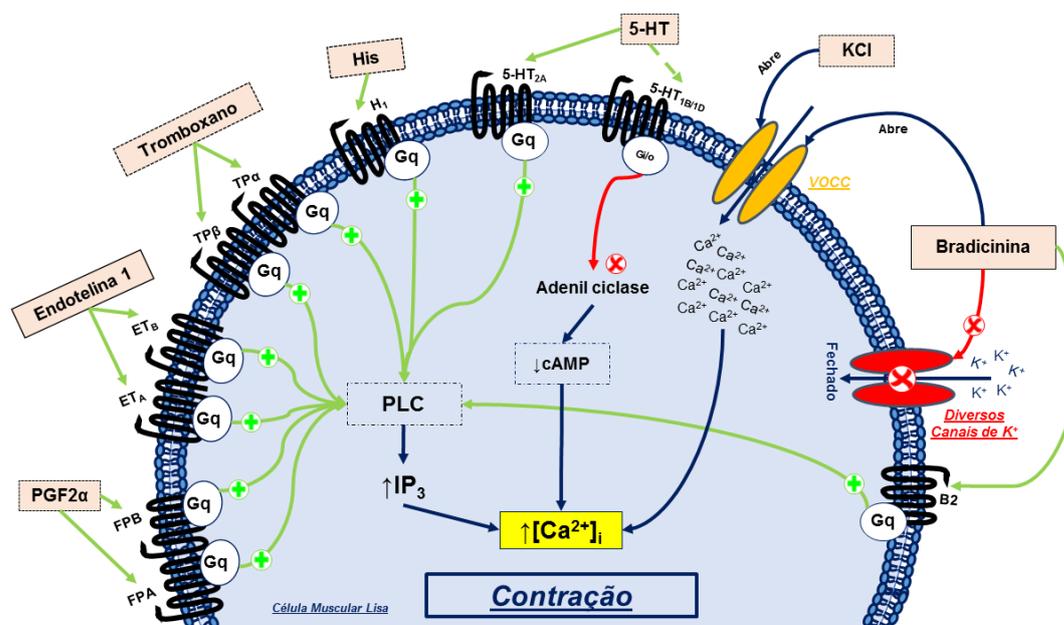


Figura 10 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na contração das células musculares lisas da artéria umbilical humana. $[Ca^{2+}]_i$ - Concentração intracelular do íon Ca^{2+} ; 5-HT - Serotonina; Ca^{2+} - Cálcio; cAMP - Monofosfato cíclico 3'5'-Adenosina; His - Histamina; IP_3 - Inositol 1,4,5-trifosfato; K^+ - Potássio; KCl - Cloreto de Potássio; $PGF2\alpha$ - Prostaglandina F 2α ; PLC - Fosfolipase C; VOCC - Canais de Ca^{2+} operados por voltagem; - Receptor acoplado à proteína G; /Setas verdes - Ativação; /Setas vermelhas - Inibição.

1.12.2 Relaxação das células musculares lisas na HUA

No geral, a relaxação do músculo é o resultado da diminuição da concentração de Ca^{2+} livre intracelular, seguida de um decréscimo ou perda do estímulo contráctil. Contudo, a relaxação muscular pode também dever-se à remoção de cálcio do citosol e à redução da sensibilidade do sistema contráctil ao cálcio. ⁽¹⁶⁵⁾ Normalmente, a diminuição do Ca^{2+} livre intracelular deve-se à remoção deste íon do meio intracelular, para os depósitos intracelulares, através da SERCA, e/ou para o meio extracelular, através da PMCA e do NCX, ⁽¹⁶⁶⁻¹⁶⁹⁾ e na HUA o NCX parece funcionar de modo reverso. ⁽¹⁷⁰⁾ Estes mecanismos operam normalmente para manter a concentração de Ca^{2+} intracelular na célula em repouso e para restabelecer os níveis após um processo de contração/excitação. A reversão do processo contráctil segue o caminho inverso do ocorrido para a contração e termina com o retorno da concentração de Ca^{2+} a valores basais. Atualmente sabe-se que as proteínas STIM localizadas predominantemente no retículo endoplasmático (ER) e os canais Orai localizados na membrana plasmática são extremamente

importante neste processo de relaxamento vascular, ^(169, 171) e também já foram identificadas na HUA. ⁽¹⁷²⁾ A relaxação do músculo liso pode também ser provocada por uma multiplicidade de compostos endógenos e exógenos. Geralmente, os exógenos reduzem o tónus do músculo liso por diversas vias, incluindo o bloqueio de recetores que, quando ativados, provocam a contração do músculo liso e a inibição ou ativação de enzimas ou canais que participam na contractilidade. Os endógenos são, geralmente, agonistas que ativam recetores e geram mensageiros intracelulares, como os nucleótidos cíclicos que, através de cascatas de eventos moleculares, provocam a relaxação arterial. ⁽¹⁶⁵⁾

Assim, na HUA a regulação precisa dos níveis intracelulares dos nucleótidos cíclicos, monofosfato cíclico 3'5'-Adenosina (cAMP) e monofosfato cíclico 3'5'-Guanosina (cGMP), desempenha um papel importante no relaxamento do músculo liso vascular. ^(119, 173) O aumento de cAMP é conseguido por ativação de um recetor acoplado a uma proteína G_s ou por inibição de um recetor acoplado a uma proteína G_{i/o}, enquanto o aumento dos níveis de cGMP, por outro lado, é conseguido por ação de vasodilatadores endógenos, como é o caso do óxido nítrico (NO). O aumento dos níveis de cAMP e cGMP provoca uma ativação das proteínas cinases A (PKA) e G (PKG) respetivamente, o que por sua vez, reduz a concentração de Ca²⁺ intracelular e a sensibilização dos miofilamentos ao Ca²⁺ nas SMC, culminando numa relaxação. ⁽¹⁷³⁾ A nível da HUA, já foi demonstrado que o aumento dos níveis de cAMP e cGMP nas HUASMC provoca vasorelaxação, ⁽¹⁷⁴⁾ e um estudo realizado pelo nosso grupo de investigação, demonstrou ainda que essa vasorelaxação ocorre também em HUA desprovidas de endotélio. ⁽¹¹⁹⁾

Neste sentido, no que diz respeito ao endotélio vascular, alguns estudos têm sugerido que também ele parece ter um papel importante na relaxação da HUA. Foi demonstrado que o endotélio da HUA expressa a sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS) e pode libertar NO, que por sua vez irá atuar sobre as SMC ativando a guanil ciclase solúvel (sGC), e deste modo, aumentar a produção de cGMP. ⁽¹⁴⁶⁾ Atualmente o papel relevante do NO na regulação do tónus vascular da HUA encontra-se bem descrito e alguns estudos, inclusive, demonstraram o seu efeito vasodilatador nesta artéria. ^(119, 152, 175) Contudo, apesar da sua relevância para a regulação do tónus vascular, o presente estudo foi realizado com HUA desprovidas de endotélio. Só assim foi possível determinar com maior clareza e exatidão os mecanismos que regulam a contractilidade nesta artéria, exercidos pelo OMC. Esta escolha em nada condicionou o estudo da função vascular exercida pelo OMC, pois a mesma pôde ser analisada através de dadores de NO, como é o caso do nitroprussiato de sódio (SNP), cuja relaxação foi também demonstrada em estudos anteriores realizados com artérias umbilicais humanas. ^(119, 175)

Ambos os nucleótidos cíclicos podem ainda ter os seus níveis aumentados, por inibição das fosfodiesterases (PDE) - as enzimas que hidrolisam os referidos nucleótidos. ^(173, 176) Santos Silva e os seus colaboradores demonstraram que nas HUASMC encontram-se expressas isoformas de quatro famílias de fosfodiesterases (PDE): PDE1, PDE3, PDE4 e PDE5. Mais especificamente, foi demonstrado que as PDE4 e PDE5 são as principais enzimas envolvidas na regulação do relaxamento associado ao cAMP e cGMP, respetivamente. ⁽¹¹⁹⁾ Alguns estudos têm sugerido que

as PDE parecem também desempenhar um papel importante na compartimentação celular, tendo sido proposto, inclusive, que são cruciais para a existência de diferentes concentrações de cAMP e/ou cGMP em locais distintos da célula. ⁽¹⁷³⁾ Neste sentido, e dando continuidade de certo modo, às investigações anteriormente desenvolvidas pelo nosso grupo de investigação, Fiteiro e os seus colaboradores analisaram o papel de dois diferentes subtipos vasculares de fosfodiesterases (PDE3 e PDE5) na compartimentação do cGMP, em células do músculo liso humano. ⁽¹⁷⁷⁾ Os resultados obtidos permitiram que estes autores fossem os primeiros a demonstrar, diretamente, que as SMC são compartimentadas e que essa compartimentação é controlada pelas PDE3 e PDE5. ⁽¹⁷⁷⁾

Numa outra perspetiva, é de salientar a relevância dos canais de potássio para a regulação do tónus da HUA. Falamos de canais, cuja importância é elevada uma vez que constituem um dos mecanismos fisiológicos capazes de controlar o tónus do músculo liso arterial. ⁽¹¹⁰⁾ Para além de serem os mais abundantes nas SMC, os canais de potássio possuem ainda o papel central na regulação do potencial de membrana - pois conseguem controlar diretamente a concentração de K^+ e indiretamente a concentração de Ca^{2+} . ⁽¹⁷⁸⁾ Mais especificamente, a abertura dos canais de K^+ nas SMC vasculares causa uma hiperpolarização da membrana celular, um encerramento dos VOCC e uma diminuição da entrada de iões de Ca^{2+} para o interior da célula, provocando assim uma vasodilatação. ⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾ Por outro lado, a atividade dos vários tipos de canais de K^+ pode ser alterada também por uma série de fatores fisiológicos, que incluem o Ca^{2+} intracelular, os nucleótidos cíclicos e diversos mecanismos de transdução de sinal. Pelo que neste sentido, apresentam-se como um alvo promissor de atuação de substâncias vasodilatadoras, como o NO, os péptidos natriuréticos (NP) e as prostaciclina. ⁽¹⁸²⁾

Ao nível da HUA, já foi demonstrado a presença de vários canais de potássio nas SMC, como os canais SKCa, K_{2P} e KIR. Enquanto, por outro lado, a presença de canais IK_{Ca} ou K_{ATP} não foi observada até à data neste vaso. Já se encontra descrito que os canais de potássio operados por voltagem (K_v) são capazes de regular o potencial de membrana em resposta à despolarização da membrana; enquanto os canais de potássio ativados por cálcio de alta condutância (BK_{Ca}), por outro lado, respondem a alterações dos níveis de Ca^{2+} intracelular a fim de regular esse potencial. No geral, a ativação dos canais de potássio parece ser a responsável pela vasodilatação verificada nas SMC da HUA. ^(110, 118, 121, 178) Deste modo, é assim notório que mais estudos são necessários de forma a chegar a conclusões definitivas a cerca do papel funcional e expressão dos vários tipos de canais de potássio na HUA, pois a informação existente até à data é escassa e inconclusiva. Note-se também que a expressão e funcionalidade destes canais pode sofrer alterações em patologias vasculares ou patologias relacionadas com a gravidez, pelo que o estudo mais aprofundado destes canais pode constituir um importante alvo de estudo farmacológico no desenvolvimento de novos tratamentos, que visam a modificação da atividade dos canais em questão. ⁽¹¹⁰⁾

A **Figura 11** apresenta um esquema resumo de como ocorre a relaxação do músculo liso da HUA.

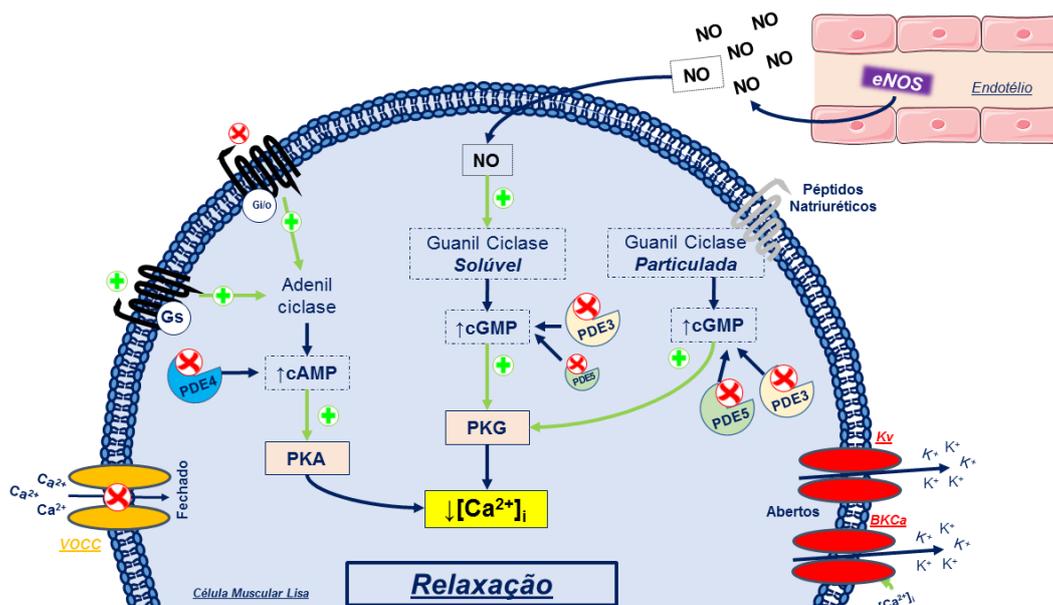


Figura 11 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos no relaxamento das células musculares lisas da artéria umbilical humana. $[Ca^{2+}]_i$ - Concentração intracelular do íon Ca^{2+} ; BK_{Ca} - Canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância; Ca^{2+} - Cálcio; cAMP - Monofosfato cíclico 3'5'-Adenosina; cGMP - Monofosfato cíclico 3'5'-Guanosina; eNOS - Sintase do Óxido Nítrico endotelial; K^+ - Potássio; K_v - Canais de K^+ operados por voltagem; NO - Óxido nítrico; PDE - Fosfodiesterases; PKA - Proteína cinase A; PKG - Proteína cinase G; VOCC - Canais de Ca^{2+} operados por voltagem; - Recetor acoplado à proteína G; - Recetor peptídico; /Setas verdes - Ativação; /Setas vermelhas - Inibição

1.13 Influência de algumas hormonas com a função vascular

Tal como referido anteriormente, estudos recentes reportaram para o OMC uma atividade estrogénica, anti-androgénica, anti-progestagénica e anti-tiroideia. No entanto, apenas os estudos referentes às atividades estrogénica e anti-tiroideia, apresentam um maior número de estudos realizados, e demonstraram dados similares nos estudos realizados com animais e humanos. Por este motivo, apenas estas duas atividades foram as escolhidas para abordar ao longo desta investigação.

Já foi demonstrado que os estrogénios e as hormonas da tiroide podem ter influência a nível vascular, pelo que este capítulo abordará esses efeitos, e a relevância destas duas classes de hormonas, a nível vascular.

1.13.1 Efeito dos estrogénios na função vascular

Os estrogénios são uma classe de hormonas sexuais esteroides. ⁽¹⁸³⁾ Diversos estudos têm sugerido que as hormonas sexuais femininas e masculinas são capazes de modular a função vascular. ^(183, 184) Contudo, os mecanismos subjacentes aos efeitos dessas hormonas continuam

ainda por esclarecer, devido não só a dados controversos, como a um reduzido número de estudos realizados até ao momento.

De acordo com a teoria clássica para explicar os efeitos das hormonas esteroides, estas moléculas de sinalização apresentam-se como moduladoras da transcrição génica por serem capazes de interagir com os recetores intracelulares. Para além desses efeitos genómicos, estas hormonas conseguem induzir também efeitos não-genómicos (rápidos), na ordem dos segundos a minutos, que são reversíveis e insensíveis à transcrição e aos inibidores de síntese proteica. ⁽¹⁸⁴⁻¹⁸⁶⁾ De entre os seus efeitos não-genómicos encontra-se a vasodilatação - uma das ações mais relevantes e promissoras das hormonas esteroides.

Diferentes vias foram já propostas para explicar a vasodilatação induzida por estas hormonas. Alguns dos mecanismos propostos sugerem a ativação de vias dependentes de endotélio, enquanto outros sugerem, pelo contrário, vias independentes de endotélio. ⁽¹⁸⁴⁾ Foram também sugeridos mecanismos que envolvem a ativação ou inativação de canais iónicos, de forma direta ou indireta. ⁽¹⁸⁷⁾

Estudos demonstraram que o estradiol (E2) pode ativar vias vasorelaxantes dependentes de endotélio, através da via do NO, prostaciclina e fatores hiperpolarizantes ^(183, 186) enquanto por outro lado, é também capaz de provocar uma relaxação no músculo liso, por modulação do fluxo iónico membranar através de um mecanismo que é independente do endotélio. ⁽¹⁸⁸⁾

No que diz respeito ao envolvimento dos canais iónicos na vasorelaxação induzida por estas hormonas, estudos têm sugerido que a inibição dos canais de cálcio (Ca^{2+}) e que a ativação dos canais de potássio (K^+) pode estar relacionada com a vasodilatação observada, de uma forma direta. ⁽¹⁸⁴⁾ O cálcio extracelular pode entrar nas SMC por diferentes tipos de canais de cálcio, como os VOCCs (que incluem os canais do tipo L e do tipo T) cuja inibição já foi associada à vasodilatação mediada por hormonas sexuais. ^(184, 187, 189) Por outro lado, foi demonstrado que os canais de K^+ no músculo liso vascular pode induzir uma repolarização da membrana plasmática, o que culmina no fecho dos VOCCs e consequente, relaxamento vascular. ^(184, 190) Numa outra vertente, de forma indireta foi demonstrado que esse efeito vasorelaxante também pode ser exercido devido a aumentos nos níveis de cAMP e cGMP. ^(191, 192)

Especificamente, a nível da HUA alguns estudos já demonstraram que os estrogénios conseguem induzir uma vasodilatação. ^(193, 194) Tal como já referido, diversos estudos reportaram uma ação estrogénica para o OMC. Deste modo, é plausível colocar a hipótese de que, atuando pelo mesmo mecanismo de ação que os estrogénios, o OMC consiga induzir os mesmos efeitos - isto é, uma vasorelaxação da HUA. Um estudo realizado pelo nosso grupo de investigação demonstrou que, de facto, o OMC consegue induzir uma vasorelaxação em HUA desprovidas de endotélio, ⁽⁹²⁾ pelo que o seu mecanismo de ação passa, portanto, por um mecanismo que é independente do endotélio. Por outro lado, a hipótese do seu mecanismo de ação ser similar ao mecanismo de ação dos estrogénios continua em aberto, pois o mesmo ainda não se encontra estudado. O envolvimento dos canais iónicos e dos nucleótidos cíclicos continua por esclarecer

pelo que, neste sentido, será necessário proceder a estudos mecanísticos capazes de esclarecer os mecanismos pelos quais o OMC exerce os seus efeitos vasorelaxantes a nível vascular.

1.13.2 Efeito das hormonas da tiroide na função vascular

As hormonas da tiroide incluem a triiodotironina (T3) e a tetraiodotironina ou tiroxina (T4). A libertação destas hormonas é estimulada por uma outra hormona, a TSH (do inglês, *thyroid-stimulating hormone*). A T3 é a hormona metabolicamente ativa, e cuja conversão a partir da T4, está ao encargo da enzima deiodinase do tipo II (ID2).⁽¹⁹⁵⁾

Diversos estudos têm reportado que as hormonas da tiroide têm efeitos na função vascular. No entanto, pouco ainda se sabe sobre os seus efeitos exatos. Os mecanismos subjacentes aos efeitos das hormonas da tiroide a nível vascular não se encontram ainda totalmente esclarecidos, e a informação atualmente disponível é escassa e incoerente.

As células musculares lisas (SMC) têm um papel fundamental na modulação do tónus vascular, e por isso são consideradas um alvo de ação das hormonas da tiroide.⁽¹⁹⁶⁾ Em 2014, foi sugerido que a TSH pode exercer um efeito vascular direto sobre as SMC,⁽¹⁹⁷⁾ e recentemente, foi demonstrado também que as SMC expressam predominantemente o recetor da tiroide alfa (TR α), desempenhando este um papel fundamental na regulação do tónus vascular.⁽¹⁹⁸⁾ Por outro lado, também a enzima ID2 já foi detetada em SMC da artéria coronária humana, fazendo destas células um local de produção intracelular de T3.⁽¹⁹⁶⁾

Estudos apontam para um efeito direto das hormonas da tiroide nas SMC, que culmina num relaxamento.^(199, 200) Especificamente, já foi reportado que esse relaxamento vascular ocorre dentro de 10 min, após a ligação da T3 a locais específicos de ligação nas SMC.⁽²⁰¹⁾ Devido ao facto de os autores não terem conseguido detetar aumentos nos níveis de cGMP nas células endoteliais após estimulação pela T3, foi sugerido que o NO não era produzido nessas células. Estes dados levantam a hipótese de que a T3 estaria a atuar por um mecanismo não-genómico, e independente de endotélio.⁽²⁰¹⁾ Essa hipótese foi mais tarde corroborada por Carrillo-Sepulveda e os seus colaboradores, em 2010, onde foi possível demonstrar que T3 em SMC é capaz de ativar a via de sinalização PI3K/Akt aumentando a produção de NO. Deste modo, dá assim origem a um relaxamento vascular rápido e independente de endotélio.⁽²⁰²⁾

Embora alguns estudos indiquem que o relaxamento vascular induzido pelas hormonas da tiroide é independente do endotélio, a vasodilatação dependente do endotélio também já foi demonstrada.^(203, 204) Foi sugerido que a vasodilatação dependente de endotélio era também o resultado dos efeitos da T3 na via PI3K/Akt que eram mediados para além de ações não genómicas, também por ações genómicas.^(205, 206) Curiosamente, um estudo realizado por Napoli e os seus colaboradores demonstrou que a TSH (a hormona responsável pela libertação das hormonas da tiroide) conseguiu promover um relaxamento vascular no endotélio, que se mostrou ser independente das concentrações das próprias hormonas tiroideas.⁽²⁰⁷⁾ A

acrescentar à discussão sobre qual o real papel das SMC no relaxamento induzido pelas hormonas da tiroide, está outro estudo realizado por Zwaveling e os seus colaboradores. ⁽²⁰⁸⁾ Dados obtidos por estes últimos autores levantam a hipótese do relaxamento induzido pelas hormonas da tiroide poder ser o resultado de um efeito combinado entre as células endoteliais e as células musculares lisas: ao atuar nas SMC as hormonas da tiroide exercem os seus efeitos diretamente, mas estas células podem também ser alvo de efeitos indiretos pelas células endoteliais (que, entretanto, também elas já foram previamente “influenciadas” pelas hormonas da tiroide). ⁽²⁰⁸⁾ Esta hipótese foi corroborada recentemente, num estudo com artérias de rato, onde foi possível comprovar que, de facto, o mecanismo subjacente aos efeitos relaxantes exercidos pelas hormonas da tiroide é uma combinação de efeitos exercidos em células endoteliais e células musculares lisas. ⁽²⁰⁹⁾

Considerados em conjunto, estes dados indicam que as hormonas da tiroide exercem efeitos vasorelaxantes a nível vascular, e mais especificamente, a T3 parece ser a hormona cujos efeitos são mais significativos. Estudos têm demonstrado que patologias tiroideas podem ser promotoras de anomalias cardíacas e cardiovasculares. E mais especificamente, pensa-se que a insuficiência da T3 pode estar relacionada com o aparecimento de doenças cardiovasculares, em pacientes com hipotiroidismo. ^(197, 210) Mizuma e os seus colaboradores demonstraram que nestes pacientes, as SMC apresentam níveis elevados da enzima ID2 ⁽²¹¹⁾, pelo que a utilização deste tipo de células e desta enzima poderá constituir um relevante alvo de estudo de patologias tiroideas, como o hipotiroidismo.

No caso do octilmetoxicinamato (OMC), e tal como já referido, diversos estudos reportaram para ele uma ação anti-tiroidea. Foi possível verificar que o OMC consegue perturbar a homeostase das hormonas da tiroide por mecanismos que não, os mecanismos clássicos de regulação dependentes de hormonas e *feedbacks*. Tendo, inclusive, sido colocada a hipótese de o OMC poder estar a interferir com a síntese, metabolismo, distribuição e ação das hormonas tiroideas, por múltiplos alvos e de formas diferentes. ^(16, 73) Inicialmente foi colocada a hipótese dos efeitos do OMC a nível tiroideo poderem estar sob influência da sua ação estrogénica, mas essa hipótese acabou por ser descartada. ^(17, 18) Atualmente pensa-se que o OMC seja capaz de exercer os seus efeitos a nível da tiroide, de uma forma não genómica. ⁽¹⁸⁾ Esta hipótese foi corroborada por um estudo realizado recentemente, onde foi possível verificar que o OMC exerce os seus efeitos a nível vascular de forma rápida, e independente de endotélio ⁽⁹²⁾. Contudo, os seus efeitos a nível genómico ainda não se encontram avaliados. De igual modo, não existe informação na literatura que descreva os efeitos - quer genómicos quer não-genómicos - exercidos pelo OMC em pacientes portadores de patologias tiroideas, nem sobre o seu envolvimento na progressão das mesmas ou de patologias cardiovasculares. Uma vez que já foi reportado para o OMC uma ação anti-tiroidea e, por outro lado, foi demonstrado também que as hormonas da tiroide exercem uma vasorelaxação a nível vascular, é plausível colocar a hipótese de que o OMC consiga exercer os seus efeitos a nível tiroideo, por mecanismos que envolvam uma contração vascular. Neste sentido, seria interessante proceder a estudos de

contractilidade capazes de esclarecer quais são, de facto, os efeitos deste disruptor endócrino a nível da tiroide, e elucidar sobre o seu possível envolvimento em patologias tiroideas e cardiovasculares. Sugere-se a utilização de artérias umbilicais humanas provenientes de grávidas desprovidas de patologias e de grávidas com hipotiroidismo para estudos de contractilidade arterial e também, para cultura de SMC para a realização posterior de estudos de contractilidade celular. Para além disso, é revelante ainda a realização de estudos genéticos. Neste caso, sugere-se a avaliação da enzima ID2 para o estudo específico de patologias como o hipotiroidismo, mas também a avaliação de canais iónicos, como o canal de potássio BK_{Ca} ou o canal de cálcio LTCC, cuja ativação está associada a um relaxamento, ou contração, respetivamente. Deste modo, será possível não só avaliar os efeitos do OMC a nível genómico e correlacioná-los com uma contração ou relaxamento, mas também fazer uma comparação dos efeitos genómicos e não-genómicos exercidos pelo OMC em pacientes saudáveis e pacientes portadores de hipotiroidismo.

2. Enquadramento e objetivo da investigação

O octilmetoxicinamato (OMC) é um dos filtros ultravioleta-B mais comumente usados na constituição dos protetores solares. Diferentes estudos demonstraram que o OMC se comporta como ED, alterando o normal funcionamento dos organismos. No entanto, poucos estudos avaliaram os possíveis efeitos hormonais. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o OMC exerce uma atividade estrogénica, anti-androgénica, anti-progestagénica e anti-tireoidea. Mas, os mecanismos ainda não foram esclarecidos. Uma questão central, permanece por esclarecer: Estarão os seres humanos “livres” de disrupção endócrina quando usam protetores solares que contêm o OMC?

A nível vascular, não existem dados publicados relativamente aos efeitos do OMC, nem sobre o seu possível papel no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e/ou tiroideas.

Neste sentido, o objetivo central deste trabalho foi o de estudar os efeitos do OMC a nível da contractilidade celular e arterial e analisar os possíveis mecanismos envolvidos nesses efeitos, de forma a elucidar se o efeito do OMC pode ou não estar associado ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares e/ou tiroideas.

Diferentes objetivos específicos foram definidos para atingir a correta resolução do objetivo central:

1. Realização com sucesso do isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC);
2. Análise do efeito directo do OMC em artérias umbilicais humanas (HUA) sem endotélio, e em HUASMC;
3. Análise dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito do OMC na HUA, principalmente o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio;

3. Metodologias e Materiais

3.1 Metodologias Não-Laboratoriais

Antes de dar início à componente laboratorial, realizou-se uma pesquisa de campo que permitiu avaliar a presença do OMC no nosso quotidiano. Para tal, foi realizado um estudo exploratório para diversos protetores solares. A recolha dos dados foi feita a partir da técnica - a observação, onde uma observação do tipo não estruturada (ou assistemática) foi realizada.

3.1.1 Estudo exploratório de protetores solares

O estudo exploratório realizado teve a duração de um mês - correspondente ao período de tempo de 15 de julho de 2016 a 15 de agosto de 2016 - e consistiu na pesquisa de 32 protetores solares. A data de realização do estudo foi escolhida tendo em conta que existe uma maior exposição ao OMC, nos meses de verão, devido ao aumento do uso de protetores solares como proteção individual. ⁽³³⁾

Para o estudo, foram recolhidos protetores solares de várias marcas que se encontraram - neste período de tempo - comercializados em hipermercados e farmácias portuguesas, de Almeirim. De modo a perceber-se se existiriam diferenças entre os protetores para adultos e para crianças, foram efetuadas pesquisas mais aprofundadas a protetores destinados a crianças, e seguidamente comparados os protetores correspondentes, ou parcialmente semelhantes, da mesma marca, para adultos. Essa comparação foi realizada apenas para algumas marcas. Foram ainda avaliados parâmetros como, quantidade e forma pela qual o protetor é vendido, fator de proteção solar (SPF), ingrediente presente em maior quantidade, e claro, presença/ausência do OMC bem como a ordem pela qual aparece na lista de ingredientes.

Todos os protetores foram escolhidos de acordo com a sua presença nos estabelecimentos comerciais visitados, neste período de tempo, sendo que toda a informação recolhida foi conseguida com o auxílio da *Internet*, mas também de folhetos publicitários e das próprias embalagens, presentes nos Hipermercados Pingo Doce, Continente, Parafarmácia *Wells* e Farmácia Local. A informação recolhida pela *Internet*, foi conseguida recorrendo aos sites das próprias marcas dos protetores, sempre que possível, e aos sites da Deco Proteste, *Skin Database* e Farmácias Portuguesas.

Os dados obtidos encontram-se representados sob a forma de uma tabela (**Tabela 4**), na secção 4.1 do capítulo “4. Resultados”.

3.2 Metodologias Laboratoriais

O presente estudo experimental foi realizado nas instalações laboratoriais do Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI). Estes laboratórios possuem todo o equipamento necessário ao desenvolvimento das metodologias que a seguir se encontram descritas. Para a realização do projeto foram utilizados cordões umbilicais humanos provenientes de partos que ocorreram no Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB).

3.2.1 Recolha de Cordões Umbilicais Humanos (HUC)

As amostras de cordão umbilical - necessários à realização deste estudo - apresentavam um tamanho de 3-7 cm e provinham de partos efetuados via vaginal, de grávidas desprovidas de patologias ou de grávidas com hipotireoidismo. Grávidas que fizessem medicações para além do ácido fólico durante as primeiras 21 semanas de gestação e de suplementos de ferro durante todo o período gestativo, foram excluídas deste estudo. Os cordões umbilicais foram cortados a partir da metade proximal ao recém-nascido (20 cm) e recolhidos no intervalo de tempo inferior a 10 minutos, após a realização do parto. Todas as amostras de cordão foram obtidas de partos que ocorreram entre as 37 e as 42 semanas (partos termo), com o consentimento informado das mães doadoras.

As amostras de cordão foram colocadas numa 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) e mantidas por 4-24h, à temperatura de 4°C. À solução de PSS foram adicionados alguns antibióticos (penicilina (5 U/ml), estreptomicina (5 µg/ml) e anfotericina B (12.5 ng/ml)), e algumas antiproteases (leupeptina 0.45 mg/l, benzamidina 26 mg/l, e inibidor de tripsina 10 mg/l), de forma a evitar possíveis contaminações e degradação tecidual, respetivamente.

Os pedaços de cordão utilizados para o estudo foram recolhidos no bloco de Obstetrícia e Ginecologia do Centro Hospitalar da Cova da Beira (CHCB). No total foram recolhidas e utilizadas para este estudo, 20 amostras normais e 2 amostras com hipotireoidismo. Todos os procedimentos realizados com os cordões umbilicais foram aprovados pelo Comitê de ética do "Centro Hospitalar da Cova da Beira E.P.E." (Covilhã, Portugal) e estão em conformidade com os princípios da Declaração de Helsínquia.

3.2.2 Isolamento das Artérias Umbilicais Humanas (HUA)

Para a obtenção de culturas de células musculares lisas (SMC), o primeiro passo consiste no isolamento das artérias umbilicais humanas (HUA). Por ser um procedimento que necessita de uma série de condições de esterilidade, o mesmo foi realizado na sala das culturas primárias

humanas, dentro de uma câmara de fluxo laminar. Todo o procedimento foi realizado utilizando materiais, soluções e instrumentos estéreis.

Resumidamente, o cordão umbilical foi colocado numa caixa de Petri, contendo cerca de 35 mL de PSS e 350 µL de antibióticos, a 4°C, e a geleia de *Wharton*, que envolve as artérias e a veia umbilical, foi cuidadosamente removida por corte com uma tesoura e auxílio de uma pinça. A parede mais espessa das artérias ao facilitar a remoção do tecido conjuntivo circundante, permitiu um melhor e correto isolamento das mesmas.

3.2.3 Cultura de Células Musculares Lisas da Artéria Umbilical Humana (HUASMC)

Após o isolamento das HUA procedeu-se à extração de camadas vasculares de músculo liso, da parte interior da túnica média, conforme descrito anteriormente por Cairrão e os seus colaboradores, ⁽⁹⁴⁾ para subsequente dissociação celular e cultura.

Resumidamente, as artérias isoladas anteriormente, foram cortadas em pedaços retangulares de 3-5 mm (anéis) usando novamente uma tesoura e uma pinça. A túnica íntima (endotélio vascular) foi removida mecanicamente pela fricção gentil com um cotonete introduzido através do lúmen arterial, e as camadas foram extraídas usando pinças cirúrgicas. O restante tecido da artéria, contendo porções de adventícia e algumas porções estreitamente associadas à camada média, foi descartado. De seguida, as camadas da túnica média extraídas foram lavadas 4 vezes, utilizando 3 mL de PSS e 30 µL de antibióticos em cada lavagem. Posteriormente as camadas foram transferidas o mais esticadas possível, para frascos de cultura T25 previamente revestidos com colagénio (20 µg/cm²). Os frascos foram colocados a 37° C numa atmosfera de ar de 95% e 5% de CO₂, onde cerca de 15 minutos depois de permanecerem nestas condições, adicionou-se 2 ml de meio de cultura completo (MCC). 24 horas depois, após as camadas já estarem estabilizadas, foram adicionados mais 2 ml de MCC. A cada 2/3 dias, o meio de cultura foi mudado, até se conseguirem obter culturas primárias confluentes. Estas foram obtidas, geralmente, entre 20-30 dias e quando as células apresentaram uma confluência entre 90-95% na superfície do frasco de cultura, foram sujeitas a sucessivas tripsinizações. Subculturas destas células foram obtidas até o máximo de 6 passagens. As células das diferentes passagens foram usadas para realizar as experiências de *Planar Cell Surface Area* (PCSA).

3.2.5 Estudos de contractilidade arterial usando a técnica de Banho de Órgãos

Estudos de reatividade vascular em artérias do cordão umbilical foram realizados num sistema experimental *in vitro*, designado de banho de órgãos (*organ chamber*). Esta é uma técnica que

envolve a realização de dois procedimentos prévios: o isolamento das artérias umbilicais humanas (HUA) e a remoção do endotélio vascular das mesmas.

O isolamento das HUA (para esta técnica) é realizado no nosso laboratório, pois não necessita de condições de esterilidade. Semelhantemente ao que se faz na realização de culturas de HUASMC, o cordão umbilical é colocado numa caixa de *Petri*, contendo PSS, a 4°C, e a geleia de *Wharton*, que envolve as artérias e a veia umbilical, é cuidadosamente removida por corte com uma tesoura e auxílio de uma pinça. A parede mais espessa das artérias ao facilitar a remoção do tecido conjuntivo circundante, permite um melhor e correto isolamento das mesmas. As artérias isoladas são colocadas em 10 mL de PSS, à temperatura de 0-4°C, para 3-12 horas depois proceder-se ao passo seguinte: a remoção do endotélio vascular.

As artérias isoladas anteriormente, são então cortadas em pedaços retangulares de 3-5 mm (anéis) usando novamente uma tesoura e uma pinça. A túnica íntima (endotélio vascular) é removida mecanicamente pela fricção gentil com uma linha de algodão introduzida através do lúmen arterial. Os anéis são colocados em 10 mL de meio DMEM-F12 (*Dulbecco's modified Eagle medium*), à temperatura de 0-4°C, onde permanecem durante 24h, para serem posteriormente utilizados.

Passadas as 24h, os anéis das HUA são colocados no banho de órgãos (LE01.004, Leticia) (**Figura 12**) contendo solução de bicarbonato de Krebs (composição em mM: NaCl 119, KCl 5.0, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 0.5, MgSO₄ 1.2, EDTA 0.03, glucose 11) a uma temperatura de 37°C, e continuamente em contacto com carbogénio (95% O₂ e 5% CO₂). Os anéis são suspensos entre dois ganchos paralelos de aço inoxidável e a medição da tensão isométrica é realizada utilizando transdutores de força (TRI201, Panlab SA, Espanha), um amplificador (ML118/D Quad Bridge, ADInstruments) e uma interface PowerLab/4SP (ML750, ADInstruments) ligada a um sistema computadorizado com o programa "PowerLab Chart5". A tensão isométrica medida é expressa em gramas (g) de força induzida pela artéria na presença dos agentes contrácteis. Para analisar os efeitos do relaxamento, utilizou-se a percentagem de redução na contração máxima induzida por esses agentes.

Inicialmente, os anéis arteriais foram submetidos a uma pré-tensão (1,5-2,0 g) e equilibrados durante aproximadamente 60 min, com o objetivo de se obter uma tensão de repouso compreendida entre 1,5-2,0 g. A cada 15-20 min (correspondente aos períodos de repouso) a solução fisiológica no banho de órgãos foi trocada. Depois disso, os anéis foram submetidos a serotonina (5-HT; 1 µM) para testar a sua viabilidade. Anéis que induziram uma contração menor que 1g, quando submetidos a 5-HT, foram excluídos do estudo.

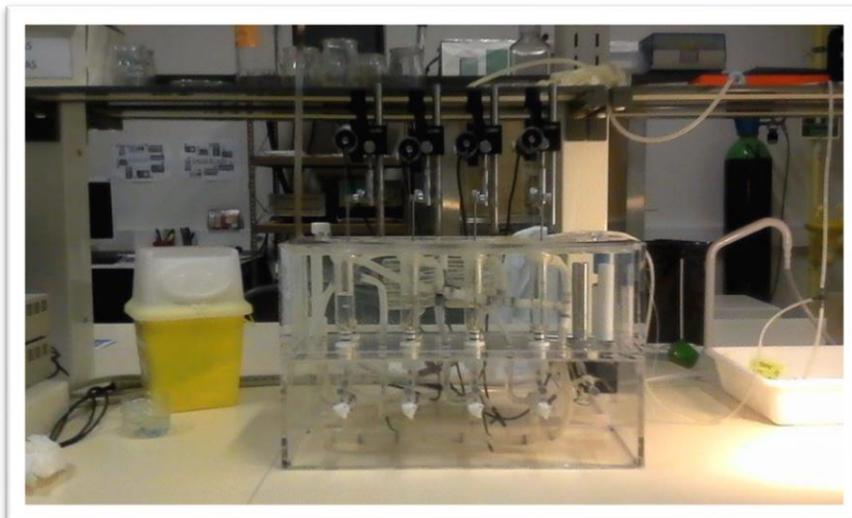


Figura 12 - Sistema experimental *in vitro* - Banho de Órgãos

O primeiro objectivo deste estudo, foi conhecer os efeitos vasculares directos do OMC na contractilidade das HUA, desprovidas de endotélio. Para isso:

Anéis de HUA foram contraídos com serotonina (5-HT, 1 μM), histamina (His, 10 μM) ou cloreto de potássio (KCl, 60 mM) e, após estabilização da resposta contráctil induzida pelo agente contráctil, o efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC; 1-100 nM e 1-50 μM) nestas contrações foi avaliado. As diferentes concentrações de OMC foram adicionadas de forma crescente, e de 5 em 5 minutos, e controlos com etanol - o veículo usado para dissolver o OMC - foram sempre realizados. A escolha das referidas concentrações de OMC teve como base o trabalho anteriormente desenvolvido pelo nosso grupo de investigação. ⁽⁹²⁾

Os dados obtidos levantaram a necessidade de proceder a estudos mecanísticos, de modo a perceber qual o mecanismo de ação do OMC. Por essa razão, o envolvimento dos nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio, na vasorelaxação induzida pelo OMC, foi analisado:

Anéis de HUA foram contraídos utilizando três diferentes agentes contrácteis: serotonina (5-HT; 1 μM), histamina (His; 10 μM) ou cloreto de potássio (KCl; 60 mM). Para determinar o envolvimento de nucleótidos cíclicos e dos canais de cálcio, na vasorelaxação induzida pelo OMC, utilizou-se o nitroprussiato de sódio (SNP, 10 μM) - um estimulador da guanil ciclase solúvel - e a nifedipina (NIF; 1 μM) - um inibidor específico dos LTCC. Quer o SNP quer a NIF foram adicionados, após estabilização da resposta contráctil, induzida pelos agentes contracteis. De seguida, e após estabilização da resposta induzida pelo SNP e/ou pela NIF, a vasorelaxação induzida pelo octilmetoxicinamato (OMC; 1-100 nM e 1-50 μM) foi analisada. As diferentes concentrações de OMC foram novamente adicionadas de forma crescente, e de 5 em 5 minutos, e controlos com etanol foram sempre realizados. Devido ao facto do SNP e da NIF

serem agentes foto-degradáveis, todo o material que os envolvia foi rodeado de prata e foi evitada a exposição a ambientes luminosos.

Todo o procedimento anteriormente descrito foi realizado na ausência de luz. Os dados obtidos encontram-se na secção 4.2 do capítulo “4. Resultados”.

3.2.6 Estudos de contractilidade das HUAMSC por PCSA (*Planar Cell Surface Area*)

Estudos de contractilidade celular das HUAMSC foram realizados utilizando a técnica de PCSA, conforme descrito anteriormente por Mariana e os seus colaboradores, ⁽¹⁸⁷⁾ em 2015.

O PCSA - ou *Planar Cell Surface Area* - é uma técnica que permite estudar alterações nas áreas de superfície celular através da aquisição de imagens de células. Essa aquisição permite analisar uma diminuição ou um aumento nas referidas áreas, que correspondem a uma contração, ou a um relaxamento celular, respetivamente. ⁽¹⁸⁷⁾

Resumidamente, as HUAMSC foram plaqueadas em *multiwells* de 6 poços, contendo 1mL de meio de cultura completo em cada poço. Quando as células se encontravam em confluência plena, o meio de cultura completo foi substituído por meio sem soro, ficando cada poço com 2 ml deste último meio. Posteriormente, as células foram incubadas numa atmosfera de 95% de ar e 5% de oxigénio, durante 24h. Passado esse período de tempo, as células foram tripsinizadas e plaqueadas (500µL) em caixas de *Petri* específicas previamente revestidas com colagénio (5 mg/cm²). Na sua base, essas caixas continham um vidro específico para a fluorescência. Realizada a tripsinização e plaqueamento, as caixas foram novamente colocadas na incubadora, sob as mesmas condições de incubação anteriormente referidas, onde permaneceram durante 2 horas. Após este período de incubação, o meio sem soro onde as células foram deixadas foi removido, e foram realizadas 4 lavagens com PBS (500 µL), sendo que a última lavagem manteve-se como meio para levar as células até ao ensaio microscópico.

Todos os passos a partir daqui foram realizados na ausência de luz.

As células foram observadas utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Zeiss Axio Observer Z1, Jena, Alemanha) (**Figura 13**). Este é um microscópio totalmente motorizado, equipado com uma câmara digital monocromática de alta velocidade *Axio Cam Hsm* (Zeiss, Jena, Alemanha) que possui um sistema de incubação incorporado, capaz de controlar a temperatura - um fator determinante para a manutenção da viabilidade celular.



Figura 13 - Microscópio invertido de fluorescência da marca Zeiss Axio Observer Z1.

O objectivo desta parte do trabalho consistiu em conhecer os efeitos vasculares directos do OMC na contractilidade das células musculares lisas de HUA (HUASMC), após contração com serotonina (5-HT; $1\mu\text{M}$) e histamina (His; $10\mu\text{M}$).

As HUASMC foram inicialmente observadas ao microscópio. Após a primeira observação das células tirou-se uma fotografia (foto 0) que serviu de controlo, e adicionou-se $5\mu\text{L}$ do agente contráctil (5-HT $1\mu\text{M}$; His $10\mu\text{M}$). Passados 20 minutos, tirou-se uma segunda fotografia. Este tempo de espera (~ 20 minutos) é o tempo necessário para se obter uma resposta máxima na qual a fase platô do efeito é conseguida. Após esses 20 minutos e tirada a 2ª fotografia, adicionou-se $5\mu\text{L}$ do octilmetoxicinamato (OMC; $50\mu\text{M}$). Passados novamente 20 minutos, foi tirada a última fotografia, que revelava o efeito que o OMC tinha sobre a pré-contração celular. A escolha da referida concentração de OMC foi baseada nos dados obtidos pelo banho de órgãos, no qual o relaxamento máximo a nível arterial foi conseguido para uma concentração de $50\mu\text{M}$ de OMC.

A análise e o tratamento das imagens foram posteriormente realizados num computador (HP Z800 Workstation) usando o suplemento *Automatic measurement programs* do programa *Axionvision 4.8 software* (Zeiss, Jena, Alemanha). Conseguiu-se deste modo medir a diferença de áreas das células após a adição do agente contráctil e do OMC, e assim analisar o efeito do OMC na contractilidade das HUASMC.

Os dados obtidos encontram-se na secção 4.3 do capítulo “4. Resultados”.

3.2.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos em função da média \pm erro padrão (S.E.M.) de n células, nas experiências de PCSA, ou n anéis, nas experiências de Banho de Órgãos. A análise estatística dos mesmos foi conseguida com auxílio do programa estatístico *SigmaStat Statistical Analysis System*, versão 3.5 (2006) e o design gráfico foi realizado com o *Software Origin 8.5.1*. A significância estatística entre dois grupos foi conseguida a partir do teste *t-Student*. Para determinar as diferenças significativas entre as médias, a comparação entre mais do que dois grupos foi analisada segundo o método *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey. Foram consideradas diferenças significativas, quando os níveis de probabilidade foram inferiores a 5% ($P < 0,05$).

3.3 Soluções e Materiais

3.3.1 Soluções

Para a realização desta investigação foram utilizadas diversas soluções. Na Tabela 2 estão mencionadas as várias soluções utilizadas, e discriminadas as suas respetivas composições.

Tabela 2 - Soluções utilizadas no decorrer desta investigação, e respetivas composições.

Solução	Composição
Solução <i>sterile physiological saline</i> (PSS) ou solução salina fisiológica estéril diluído	NaCl 110 mM; CaCl ₂ 0.16 mM; KCl 5 mM; MgCl ₂ 2 mM; HEPES 10 mM; NaHCO ₃ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 0.5 mM; NaH ₂ PO ₄ 0.5 mM; Glicose 10 mM e EDTA 0.5 mM (<i>pH</i> =7.4)
Solução antibiótico-antimicótico (SAA)	Mistura de penicilina (10000 U); estreptomicina (10 mg) e anfotericina (25 mg)
Solução de <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> /F12 (DMEM-F12)	DMEM-F12 liofilizado sigma, NaHCO ₃ (1.2 g/L) e ácido L-ascórbico (20 mg/L) (<i>pH</i> =7.4)
Meio de cultura completo (MCC)	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS-5%); Albumina de soro bovino (BSA-0.5%); fator de crescimento epidérmico (EGF, 5µg/ml); fator de crescimento fibroblástico (FGF, 0.5ng/ml); heparina (2µg/ml), insulina (5µg/ml) e solução antibiótico- antimicótico (SAA) (<i>pH</i> =7.4)
Meio de cultura 20% soro	DMEM-F12 suplementado com soro fetal bovino (FBS-20%); albumina de soro bovino (BSA-0.5%) e solução antibiótico-antimicótico (SAA) (<i>pH</i> =7.4)
Meio de cultura sem soro	DMEM-F12; Albumina de soro (BSA-0.5%) (<i>pH</i> =7.4)
Solução <i>phosphate buffered saline</i> (PBS) ou solução fosfato-salino diluído	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ e 20 mM KH ₂ PO ₄ (<i>pH</i> =7.4)
Solução de Tripsina - EDTA	0.5 g de tripsina de porco e 0.2 g de EDTA
Krebs Básico Concentrado	KCl 5.0 mM; EDTA 0.03 mM; MgSO ₄ ·7H ₂ O 1.2 mM; KH ₂ PO ₄ 1.2 mM e ácido L-ascórbico 0.6 mM
Krebs diluído	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0.5 mM; NaCl 119 mM; NaHCO ₃ 25 mM e glicose 11 mM (<i>pH</i> =7.4)
Krebs despolarizante (KCl 60 mM)	Krebs Básico Concentrado; CaCl ₂ 0.5 mM; NaCl 64 mM; KCl 60.0 mM; NaHCO ₃ 25 mM e glicose 11 mM (<i>pH</i> =7.4)

3.3.2 Químicos

Para a realização desta investigação foram utilizados diversos compostos químicos (fármacos) e drogas, nomeadamente o octilmetoxicinamato (OMC), a serotonina (5-HT), a histamina (His), o nitroprussiato de sódio (SNP), a nifedipina (Nif) e o etanol (EtOH). Todos eles foram adquiridos por Sigma-Aldrich Química (Sintra, Portugal).

Inicialmente a serotonina, a histamina e o SNP foram dissolvidos em água destilada, enquanto o OMC e a Nif foram dissolvidos em etanol. Para as diversas metodologias realizadas foi necessário preparar diluições de OMC e EtOH. Nos estudos de contractilidade arterial as diluições foram realizadas em Krebs diluído, enquanto nos estudos de contractilidade celular as diluições foram em meio sem soro. Todas as diluições necessárias foram sempre realizadas no próprio dia da experiência, e respeitando todas as normais laboratoriais necessárias para o efeito. De modo a não influenciar os resultados, a concentração final de EtOH nunca excedeu os 0,1%.

3.3.3 Materiais

Para a realização desta investigação foram utilizados diversos equipamentos e materiais. Na **Tabela 3** apenas estão descritos os que foram mais relevantes.

Tabela 3 - Materiais/Equipamentos utilizadas no decorrer desta investigação.

<i>Isolamento e Cultura de HUASMC</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Frascos de Cultura e Multiwells (6 poços)	Orange Scientific
Material Específico de Laboratório	-
Sistema de Incubação	Pecon
Câmara de Fluxo Laminar	NuAire
<i>Banho de Órgãos</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Material Cirúrgico Específico	Tekno; FST; Dumostar; Stainless
Material Específico de Laboratório	-
Câmara de Banho de Órgãos	Letica
Transdutor de força	PanLab
Amplificador	ADInstruments
Interface PowerLab/4SP	ADInstruments
Software específico do banho de órgãos	ADInstruments
<i>PCSA</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Material Específico de Laboratório	-
Caixas de Petri Específicas para o Microscópio de Fluorescência	Sarstedt
Microscópio de Fluorescência	Zeiss Axio Observer Z1
Software Específico do Microscópio de Fluorescência	Axio Vision program 4.8
<i>Preparação de Soluções</i>	
Materiais/Equipamentos	Marca
Balança Digital	Sartorius
Medidor de pH	Metrohm

4. Resultados

4.1 Estudo exploratório: presença do OMC em protectores solares

A Tabela 4 ilustra os dados obtidos no estudo exploratório realizado a protetores solares.

Tabela 4 - Estudo exploratório de protetores solares, realizado no período de 15 julho - 15 agosto 2016.

	Data Pesquisa	Nome	Fabricado em	Marca	Destinado a	Vendido sob a forma de	SPF	Quantidade	Ingrediente presente em maior quantidade	Contem o OMC na sua constituição? (Sim/Não)	Ordem pela qual o OMC aparece na lista de ingredientes
1	15 julho de 2016	Kids Moisturising Sun Lotion	Alemanha	Nívea	Crianças	Loção	50+	200 ml	Água	Não	-
2	16 julho de 2016	Protect & Moisture Moisturising Sun Lotion	Alemanha	Nívea	Adultos	Loção	50+	200 ml	Água	Sim	14º
3	17 julho de 2016	Kids Moisturising Sun Spray	Alemanha	Nívea	Crianças	Spray	50+	200 ml	Água	Não	-
4	18 julho de 2016	Protect & Moisture Moisturising Sun Spray	Alemanha	Nívea	Adultos	Spray	50+	200 ml	Água	Sim	15º
5	19 julho de 2016	Spray Hidratante Crianças 50 150 ml	França	Corine de Farme	Crianças	Spray	50	150 ml	Água	Sim	6º

Efeitos genômicos do octilmetoxicinamato (OMC) a nível vascular

6	20 julho de 2016	Spray Protetor Crianças 50+ 150 ml	França	Corine de Farme	Crianças	Spray	50+	150 ml	Água	Sim	5°
7	21 julho de 2016	Spray Protetor Peles Sensíveis 150 ml	França	Corine de Farme	Adultos	Spray	50+	150 ml	Água	Sim	4°
8	22 julho de 2016	Leite Hidratante Protetor SPF 50 300 ml	França	Corine de Farme	Adultos	Leite	50	300 ml	Água	Sim	5°
9	23 julho de 2016	Healthy Skin® Anti-Wrinkle Cream SPF 15	Noruega	Neutrogena	Adultos	Creme	15	40 ml	OMC	Sim	1° (Ingr. Ativos - 6%)
10	24 julho de 2016	Healthy Skin® Face Sunscreen SPF 15	Noruega	Neutrogena	Adultos	Creme	15	73 ml	OMC	Sim	1° (Ingr. ativos -7,5%)
11	25 julho de 2016	Sensitive Advanced Protection Lotion SPF50 50ml	França	Garnier Ambre Solaire	Adultos	Loção	50	50 ml	Água	Não	-
12	26 julho de 2016	Kids Sensitive Advanced Protection Lotion SPF50 200ml	França	Garnier Ambre Solaire	Crianças	Loção	50	200 ml	Água	Não	-
13	27 julho de 2016	Kids Sun Milk SPF 50+ 200ml	França	Garnier Ambre Solaire	Crianças	Leite	50+	200 ml	Água	Não	-
14	28 julho de 2016	Sun Milk SPF 30 200ml	França	Garnier Ambre Solaire	Adultos	Leite	30	200 ml	Água	Não	-
15	29 julho de 2016	Avène Spray Criança SPF 50+	França	Eau Thermale Avène	Crianças	Spray	50+	200 ml	Avène Thermal Spring Water	Não	-
16	30 julho de 2016	Avène Spray SPF 50+	França	Eau Thermale Avène	Adultos	Spray	50+	200 ml	Avène Thermal Spring Water	Não	-
17	31 julho de 2016	Eau Thermale Avène Moderate Protection Broad Spectrum SPF20	França	Eau Thermale Avène	Adultos	Spray	20	200 ml	Octocrileno	Sim	2° (Ingr.ativos -7,5%)
18	1 agosto de 2016	Bariésun Spray SPF 50+	França	Uriage	Adultos	Spray	50+	200 ml	Água	Sim	3°

Efeitos genómicos do octilmetoxicinamato (OMC) a nível vascular

19	2 agosto de 2016	Bariésun Spray Enfants SPF 50+	França	Uriage	Crianças	Spray	50+	200 ml	Água	Sim	3°
20	3 agosto de 2016	Bariésun Lait Enfants SPF50+	França	Uriage	Crianças	Leite	50+	100 ml	Água	Não	-
21	4 agosto de 2016	Vichy Idéal Soleil Spray Suave Crianças 50+	França	Vichy Laboratoires	Crianças	Spray	50+	200 ml	Água	Não	-
22	5 agosto de 2016	Vichy ProEVEN Mineral BB Cream	França	Vichy Laboratoires	Adultos	Creme	20	40 ml	OMC	Sim	1° (Ingr. ativos -5%)
23	6 agosto de 2016	Photoderm MAX Bruma SPF50+	França	Bioderma	Adultos e Crianças	Aerosol	50+	150 ml	Alcohol Denat	Sim	5°
24	7 agosto de 2016	Photoderm BRONZ Bruma	França	Bioderma	Adultos	Spray	50	200 ml	C12-15 Alkyl Benzoate	Sim	5°
25	8 agosto de 2016	ANTHELIOS XL SPF 50+ ULTRA-LIGHT SPRAY	França	La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE	Adultos	Spray	50+	200 ml	Ecamsule	Não	-
26	9 agosto de 2016	ANTHELIOS DERMO-PEDIATRICS SPF 50+ SPRAY	França	La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE	Crianças	Spray	50+	200 ml	Octyl Salicylate	Não	-
27	10 agosto de 2016	UVIDEA XL SPF 30 EXTREME FLUID	França	La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE	Adultos	Loção	30	40 ml	OMC	Sim	1°
28	12 agosto de 2016	Eucerin Sun Spray SPF 50+	Alemanha	Eucerin	Adultos	Spray	50+	200 ml	Água	Sim	17°
29	11 agosto de 2016	Episol infantil SPF30	Alemanha	Eucerin	Crianças	Loção	30	120 ml	Octyl Salicylate	Sim	2° (Ingr. ativos -7,5%)
30	13 agosto de 2016	Eucerin Kids Sun Spray SPF 50+	Alemanha	Eucerin	Crianças	Spray	50+	200 ml	Água	Não	-
31	14 agosto de 2016	Fusion Fluid Mineral Baby Pediatrics SPF 50+	Espanha	ISDIN	Crianças	Loção	50+	50 ml	Água	Não	-
32	15 agosto de 2016	Fusion Fluid FPS 50+	Espanha	ISDIN	Adultos	Loção	50+	50 ml	Água	Não	-

Em relação aos dados observados na Tabela 4, é possível verificar que a grande maioria dos protetores analisados são de origem francesa (n=21) ou alemã (n=7). Verifica-se também a presença também de protetores da Noruega (n=2) e Espanha (n=2). Relativamente às marcas dos protetores observa-se a presença, na tabela 4, de 11 marcas distintas: *Nívea*, *Corine de Farme*, *Neutrogena*, *Garnier Ambre Solaire*; *Eau Thermale Avène*, *Uriage*, *Vichy Laboratoires*, *Bioderma*; *La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE*, *Eucerin* e *ISDIN*. Cada marca encontra-se representada por 4 protetores solares (*Nívea*, *Corine de Farme* e *Garnier Ambre Solaire*), 3 protetores solares (*Eau Thermale Avène*, *Uriage*, *La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE* e *Eucerin*) ou apenas 2 protetores solares (*Neutrogena*, *Vichy Laboratoires*, *Bioderma* e *ISDIN*). De referir que todas as marcas apresentam uma comparação entre protetores para crianças *versus* protetores para adultos, com exceção da marca *Neutrogena* que apenas se apresenta representada com 2 protetores solares destinados a adultos.

Na tabela encontram-se ainda outros parâmetros a ter em conta: a quem se destina o protetor; forma pela qual o protetor é vendido, o fator de proteção solar (abreviado por SPF) e a quantidade. Comparando os 32 protetores presentes na tabela observamos que 14 se destinam a crianças e 17 se destinam a adultos. Apenas um protetor referido na tabela (nº23) é destinado simultaneamente a crianças e adultos. Relativamente à forma pela qual é vendida, observa-se que a maioria dos protetores é vendida sob a forma de spray (n=16) e loção (n=8). Também se encontram protetores sob a forma de creme e leite (n=3 e n=4, respetivamente) e uma pequena minoria sob a forma de aerossol (n=1). Quanto ao SPF observa-se que a grande maioria dos protetores apresenta um SPF de 50 ou 50+, num total de 25 protetores. Observam-se ainda protetores com SPF 30 (n=3), 20 (n=2) e 15 (n=2). Já no que diz respeito à quantidade, observa-se que a maioria dos protetores se apresenta com quantidades de 200 ml (n=18) ou 150 ml (n=4). Uma minoria encontra-se com quantidades de 300 ml (n=1), 120 ml (n=1) 100 ml (n=1), 73 ml (n=1), 50 ml (n=3) e 40 ml (n=3). Se observarmos agora a coluna respeitante ao “ingrediente presente em maior quantidade” é notório que a água se destaca, num total de 20 protetores. Observam-se ainda protetores cujos ingredientes mais predominantes são outros, que não a água: *Avene Thermal Spring Water* (nºs 15 e 16), *Octocrileno* (nº 17), *Alcohol Denat* (nº 23), *C12-15 Alkyl Benzoate* (nº 24), *Ecamsule* (nº 25), *Octyl Salicylate* (nºs 26 e 29) e *OMC* (nºs 9,10, 22 e 27).

Focando agora em duas colunas importantes da tabela, a que indica a presença/ausência do OMC e a da ordem pela qual aparece na lista de ingredientes, observa-se que o OMC está presente em 17 protetores, dando um total de outros 15 protetores solares sem o OMC na sua constituição. Dos 17 protetores que contêm o OMC, este aparece na lista de ingredientes na sua maioria em 1º ou 5º lugar (n=4, cada). Também se pode encontrar o OMC na lista de ingredientes, em 2º (n=2), 3º (n=2) ou 4º, 6º, 14º, 15º e 17º lugares (n=1, cada).

Fazendo uma análise mais detalhada, observa-se que para as marcas:

- Nívea: 2/4 protetores solares contêm o OMC na sua constituição em 14º/15º lugar, sendo que esses dois protetores são destinados a adultos. Os protetores Nívea destinados a crianças não contêm o OMC;
- Corine de Farme: verifica-se que todos os 4 protetores apresentam o OMC, em 4º,5º ou 6º lugar, inclusive os protetores destinados a crianças;
- Neutrogena: a situação anterior repete-se, observando-se o OMC (em 1º lugar) em todos os dois protetores solares desta marca, destinados a adultos;
- Garnier Ambre Solaire: contrariamente às duas marcas anteriores, não se observa a presença do OMC em nenhum dos 4 protetores referidos, quer para adultos ou crianças.
- Eau Thermale Avène: o protetor solar para criança não continha o OMC, e apenas 1 de 2 protetores destinados a adultos continha o OMC, em 2º lugar. De notar que contrariamente aos outros dois protetores desta marca, o protetor que continha o OMC não apresentava a “Avene Thermal Spring Water” como ingrediente maioritário, mas sim o octocrileno;
- Uriage: observa-se que, contrariamente à marca anterior, são os protetores destinados a crianças que contêm o OMC na sua constituição, e não os protetores destinados a adultos. Em ambos os protetores destinados a crianças, o OMC apresenta-se em 3º lugar na lista de ingredientes;
- Vichy Laboratoires: volta a observar-se a presença do OMC apenas para o protetor destinado a adultos.
- Bioderma: observa-se a presença do OMC nos dois protetores, em 5º lugar.
- La Roche-Posay LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE: volta a observar-se o mesmo que para a marca “Eau Thermale Avène”, onde o protetor para crianças não contém o OMC, e ½ destinados a adultos já contém o OMC, e em 1º Lugar. Esta marca contitui assim, juntamente com as marcas “Neutrogena” e “Vichy Laboratoires”, as três únicas marcas (presentes na tabela) a conter o OMC como o ingrediente mais predominante.
- Eucerin: aqui, curiosamente, o OMC estava presente no protetor para adultos, e demonstrou estar presente apenas num, de dois, protectores para crianças. Contudo, encontrava-se representado como o 2º ingrediente mais predominante.
- ISDIN: Não se observou o OMC em nenhum dos protectores.

Todos estes resultados tomados em conjunto, apesar de representados numa pequena escala, demonstram a grande presença do octilmetoxicinamato no nosso dia-a-dia.

Terminada a componente não-laboratorial, demos início ao trabalho no laboratório.

4.2 Estudos de contractilidade arterial

Os estudos de contractilidade arterial de artérias umbilicais humanas (HUA) foram realizados utilizando a técnica de Banho de Órgãos.

4.2.1 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pela serotonina (5-HT)

Anéis vasculares de artérias umbilicais humanas (HUA) foram contraídos por serotonina (5-HT, 1 μ M) e contrações estáveis foram atingidas após 5-10 minutos (1633 ± 191 mg, n=9). O efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μ M) sobre esta contração foi analisado. O gráfico 1 resume os resultados obtidos nas experiências realizadas.

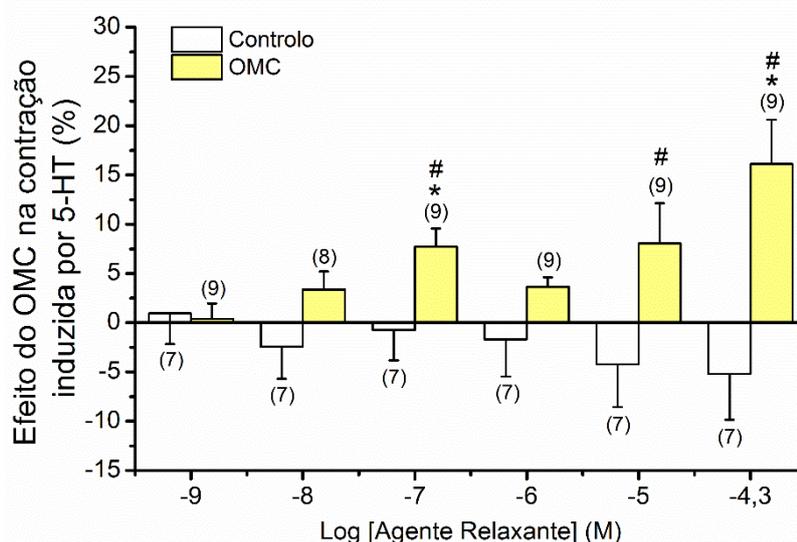


Gráfico 1 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) sobre as contrações induzidas por serotonina (5-HT, 1 μ M) em HUA. Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre a contração provocada pela 5-HT. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * $P < 0,05$ versus o controlo e pelo teste *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey, onde # $P < 0,05$ versus concentrações de OMC.

Conforme evidenciado no gráfico 1, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o grupo de controlo (EtOH) e o grupo de teste (OMC), para as concentrações de OMC de 100 nM e 50 μ M ($p < 0,05$, teste *t-student*). O OMC provocou um efeito vasorelaxante para as concentrações 100 nM, 10 e 50 μ M ($p < 0,05$, *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey), sendo a concentração de OMC 50 μ M aquela onde foi verificado um maior relaxamento vascular ($16,13 \pm 4,47\%$).

4.2.2 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pela histamina (His)

Anéis vasculares de artérias umbilicais humanas (HUA) foram contraídos por histamina (His, 10 μM) e contrações estáveis foram atingidas após 5-10 minutos (878 ± 137 mg, $n=8$). O efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC (1-100 nM e 1-50 μM) sobre esta contração foi analisado. O gráfico 2 resume os resultados obtidos nas experiências realizadas.

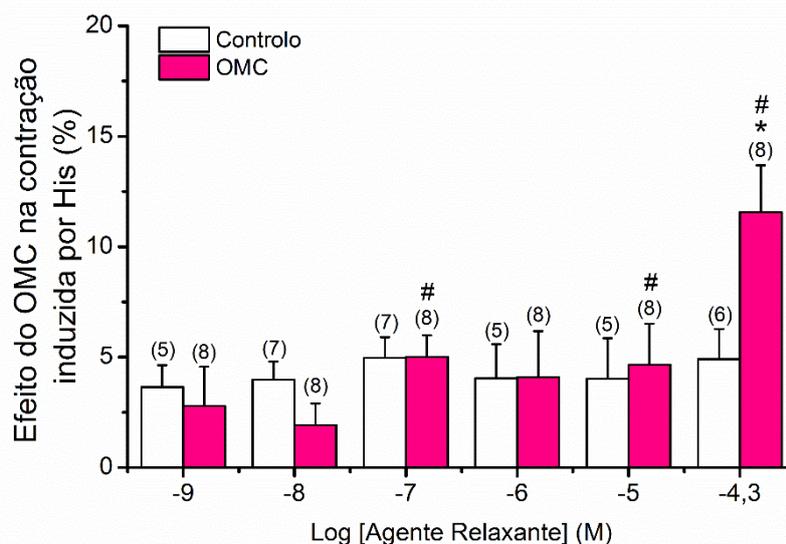


Gráfico 2 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μM) sobre as contrações induzidas por histamina (His, 10 μM) em HUA. Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre a contração provocada pela His. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * $P < 0,05$ versus o controle e pelo teste *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey, onde # $P < 0,05$ versus concentrações de OMC.

Conforme evidenciado no gráfico 2, diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o grupo de controle (EtOH) e o OMC 50 μM ($p < 0,05$, teste *t-student*). O OMC de 100 nM, 10 e 50 μM provocou um efeito vasorelaxante ($p < 0,05$, *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey), sendo a concentração de OMC 50 μM aquela onde foi verificado um maior relaxamento vascular ($11,56 \pm 2,12\%$).

4.2.3 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUA induzida pelo cloreto de potássio (KCl)

Anéis vasculares de artérias umbilicais humanas (HUA) foram contraídos por cloreto de potássio (KCl, 60 mM) e contrações estáveis foram atingidas após 5-10 minutos (1724 ± 277 mg, $n=7$). O efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC (1-100 nM e 1-50 μM) sobre esta contração foi analisado. O gráfico 3 resume os resultados obtidos das várias experiências realizadas.

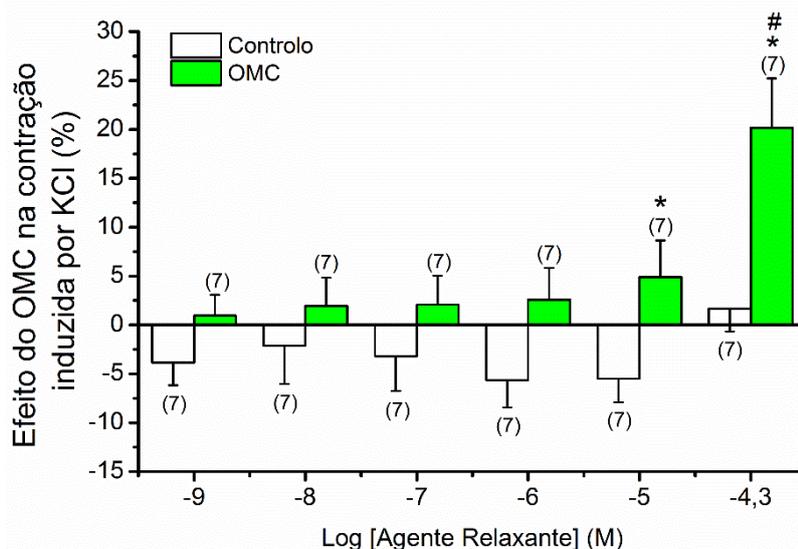


Gráfico 3 - Efeito do OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) sobre as contrações induzidas pelo cloreto de potássio (KCl, 60mM) em HUA. Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre a contração provocada pelo KCl. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * $P < 0,05$ versus o controlo e pelo teste *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey, onde # $P < 0,05$ versus concentrações de OMC.

Conforme podemos observar no **gráfico 3**, o grupo de controlo (EtOH) foi significativamente diferente do OMC de 10 μ M e 50 μ M ($p < 0,05$, teste *t-student*). Verifica-se, deste modo, que apenas estas duas concentrações induzem relaxamento vascular significativo. O efeito vasorelaxante do OMC para a concentração 50 μ M ($20,18 \pm 5,04\%$) foi significativamente diferente do efeito das demais concentrações ($p < 0,05$, *one-way ANOVA* com teste post hoc Tukey).

4.2.4 Comparação do vasorelaxamento entre os três agentes contrácteis

Os dados obtidos (mostrados anteriormente) evidenciam que o OMC foi capaz de induzir um efeito vasorelaxante em HUA, quando estas se encontravam previamente contraídas por diferentes agentes contracteis, a serotonina (5-HT, 1 μ M), a histamina (His, 10 μ M) e o cloreto de potássio (KCl, 60 mM). O relaxamento máximo foi conseguido a uma concentração de 50 μ M de OMC, para os três agentes contrácteis. A **Tabela 5** resume os valores correspondentes às médias das respostas máximas induzida pelo OMC, em percentagem (%), sobre a contração induzida pelos vários agentes contrácteis.

Tabela 5 - Respostas máximas induzidas pelo OMC (50 μ M), expressas em percentagem (%), sobre as contrações induzidas por serotonina (5-HT), histamina (His) e cloreto de potássio (KCl). Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (SEM), do número (n) de anéis indicado entre parêntesis. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA.

Agente Contráctil	OMC (50 μ M)
Serotonina (5-HT, 1 μ M)	16,13 \pm 4,47% (9)
Histamina (His, 10 μ M)	11,56 \pm 2,12% (8)
Cloreto de Potássio (KCl, 60 mM)	20,18 \pm 5,04% (7)

Conforme evidenciado na Tabela 5, os dados de relaxação obtidos foram similares para os três agentes contrácteis, apesar de todos eles partilharem modos de atuação diferentes ($p > 0,05$, teste *one-way* ANOVA).

Em suma, os dados obtidos evidenciam que o OMC induz um vasorelaxamento em artérias contraídas por 5-HT, His e KCl, e sugerem que esse efeito relaxante pode ocorrer por uma via de sinalização que é, de algum modo, partilhada pelos três agentes contrácteis. Estes dados levantam a necessidade de proceder a estudos mecanísticos, de modo a perceber qual o mecanismo de ação do OMC.

4.2.5 Análise do envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo OMC

Anéis vasculares de artérias umbilicais humanas (HUA), foram contraídos utilizando três agentes contrácteis: serotonina (5-HT; 1 μ M), histamina (His; 10 μ M) e cloreto de potássio (KCl; 60 mM). De forma a analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos, na vasorelaxação induzida pelo OMC, utilizou-se o nitroprussiato de sódio (SNP), um estimulador da guanil ciclase solúvel. De seguida, a vasorelaxação induzida pelo OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) foi analisada. Procedimentos de controlo com etanol (EtOH) - o veículo usado para dissolver inicialmente o OMC - foram sempre realizados. Os gráficos 4, 5 e 6 resumem os resultados obtidos das várias experiências realizadas, para a 5-HT, His e KCl, respetivamente.

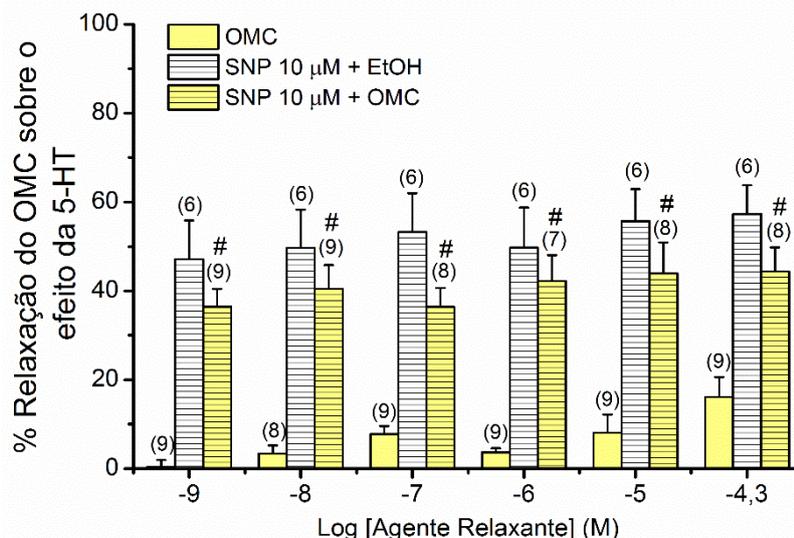


Gráfico 4 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 10 μM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μM) em anéis de HUA contraídos com serotonina (5-HT, 1 μM). Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pela 5-HT. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com testes post hoc Tukey, onde * P < 0,05 SNP+EtOH versus SNP+OMC e # P < 0,05 OMC versus SNP+OMC.

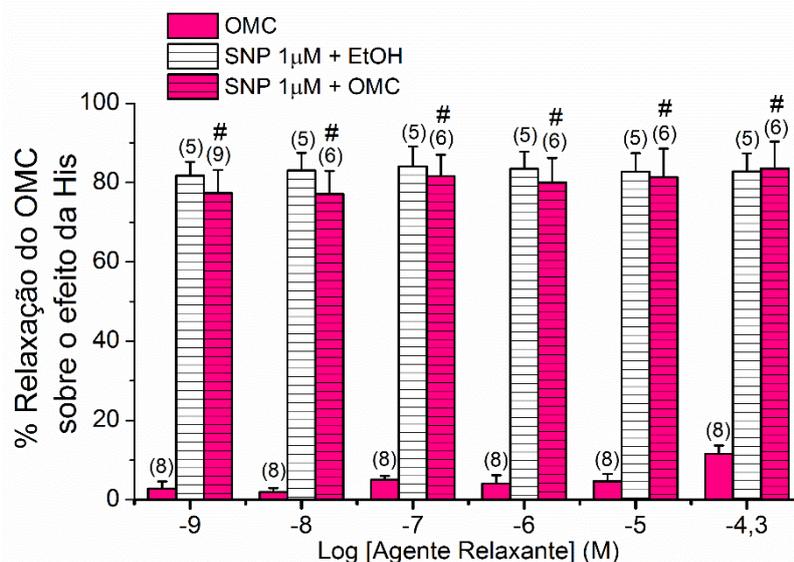


Gráfico 5 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 1 μM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 μM), em anéis de HUA contraídos com histamina (His, 10 μM). Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pela His. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA, onde * P < 0,05 SNP+EtOH versus SNP+OMC e # P < 0,05 OMC versus SNP+OMC.

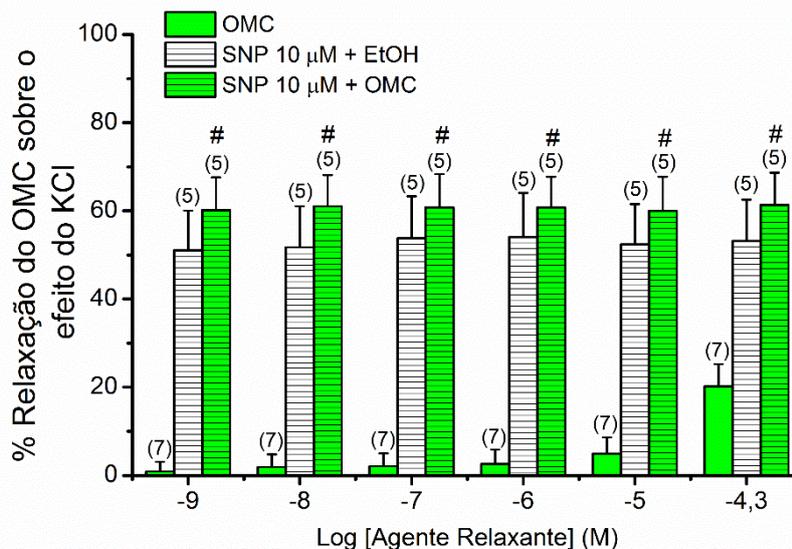


Gráfico 6 - Efeitos do nitroprussiato de sódio (SNP, 10 µM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 µM), em anéis de HUA contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pelo KCl. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey, onde * $P < 0,05$ SNP+EtOH versus SNP+OMC e # $P < 0,05$ OMC versus SNP+OMC.

Conforme evidenciado nos gráficos 4, 5 e 6 (referentes à 5-HT, His e KCl respetivamente), diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre os grupos OMC e SNP+OMC, para todas as concentrações de OMC utilizadas ($p < 0,05$). Pelo contrário, o efeito do SNP e o do SNP+OMC foram similares ($p > 0,05$).

Em suma, os dados obtidos referentes ao envolvimento dos nucleótidos cíclicos na vasorelaxação induzida pelo OMC, demonstraram que o efeito do SNP mais OMC é semelhante ao efeito do SNP sozinho, para todos os agentes contráteis utilizados (5-HT, His e KCl).

4.2.6 Análise do envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação induzida pelo OMC

Anéis vasculares de artérias umbilicais humanas (HUA), foram contraídos utilizando três agentes contráteis: serotonina (5-HT; 1 µM), histamina (His; 10 µM) e cloreto de potássio (KCl; 60 mM). De forma a analisar o envolvimento dos canais de cálcio, na vasorelaxação induzida pelo OMC, utilizou-se a nifedipina (Nif), um inibidor específico dos canais de cálcio do tipo L (LTCC). De seguida, a vasorelaxação induzida pelo OMC (1-100 nM e 1-50 µM) foi analisada. Procedimentos de controlo com etanol (EtOH) - o veículo usado para dissolver inicialmente o OMC - foram sempre realizados. Os gráficos 7, 8 e 9 resumem os resultados obtidos das várias experiências realizadas, para a 5-HT, His e KCl, respetivamente.

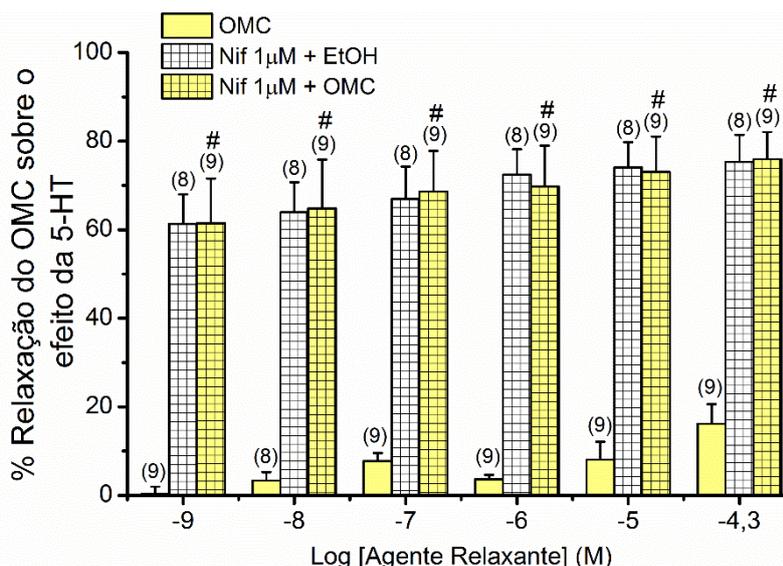


Gráfico 7 - Efeitos da nifedipina (Nif, 1 µM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 µM), em anéis de HUA contraídos com serotonina (5-HT, 1 µM). Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pela 5-HT. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com testes post hoc Tukey, onde * P < 0,05 Nif+EtOH versus Nif+OMC e # P < 0,05 OMC versus Nif+OMC.

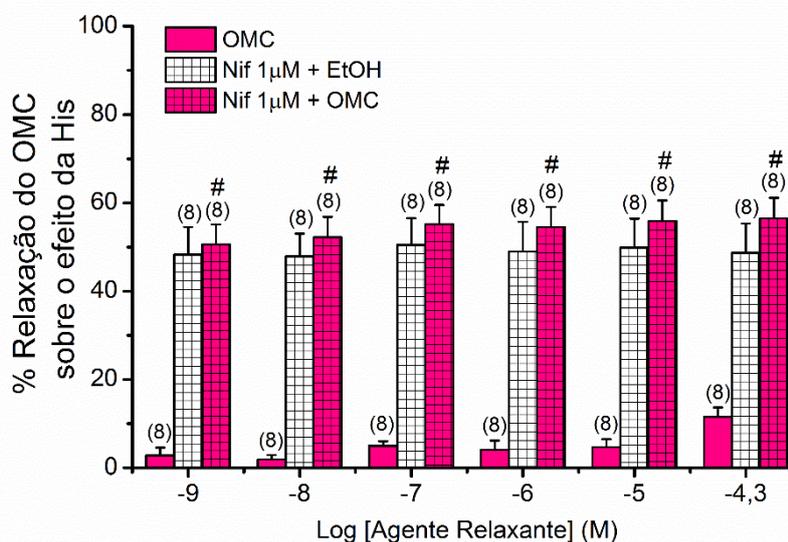


Gráfico 8 - Efeitos da nifedipina (Nif, 1 µM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 µM), em anéis de HUA contraídos com histamina (His, 10 µM). Os dados foram expressos em percentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pela His. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey, onde * P < 0,05 Nif+EtOH versus Nif+OMC e # P < 0,05 OMC versus Nif+OMC.

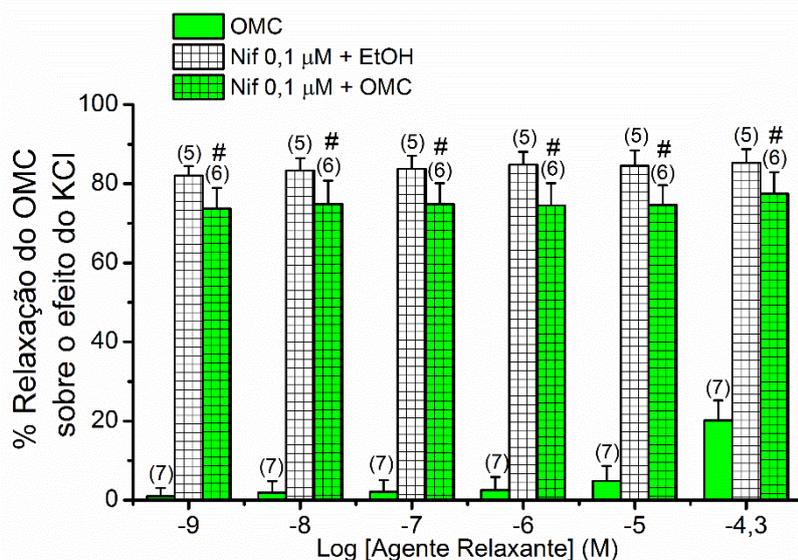


Gráfico 9 - Efeitos da nifedipina (Nif, 0,1 µM) sobre o efeito vasorelaxante do octilmetoxicinamato (OMC, 1-100 nM e 1-50 µM), em anéis de HUA contraídos com cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Os dados foram expressos em porcentagem (%) de relaxação sobre artérias contraídas pelo KCl. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de anéis (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *one-way* ANOVA com teste post hoc Tukey, onde * P < 0,05 Nif+EtOH versus Nif+OMC e # P < 0,05 OMC versus Nif+OMC.

Conforme evidenciado nos **gráficos 7, 8 e 9** (referentes à 5-HT, His e KCl respetivamente), diferenças estatisticamente significativas (# p < 0,05) foram encontradas entre os grupos OMC e Nif+OMC, para todas as concentrações de OMC utilizadas. Pelo contrário, o efeito vasorelaxante da Nif foi similar ao observado com Nif+OMC (p > 0,05).

Em suma, os dados obtidos referentes ao envolvimento dos canais de cálcio na vasorelaxação induzida pelo OMC, demonstraram que o efeito da Nif+OMC é semelhante ao efeito da Nif sozinha, para todos os agentes contráteis utilizados (5-HT, His e KCl).

4.3 Estudos de contractilidade celular

Estudos de contractilidade celular das células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC) foram realizados utilizando a técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA).

4.3.1 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUASMC induzida pela seronina (5-HT)

As HUASMC foram contraídas com serotonina (5-HT, 1 μM) e o efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC, 50 μM) nessa contração foi analisado. O gráfico 10 resume os resultados obtidos das várias experiências realizadas.

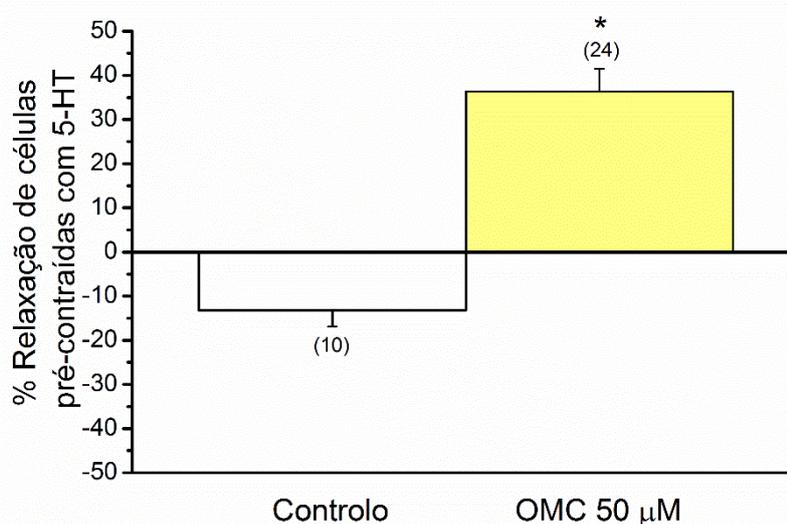


Gráfico 10 - Efeito do OMC (50 μM) sobre as contrações induzidas pela serotonina (5-HT, 1 μM) em HUASMC. Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação da área celular. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de células (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * P < 0,05 versus o controlo.

Conforme evidenciado no gráfico 10, o OMC na concentração de 50 μM , induziu um efeito relaxante nas HUASMC pré-contraídas com 5-HT (36,37 \pm 5,16 %). O grupo de controlo não evidenciou um efeito relaxante. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o grupo de controlo (EtOH) e o OMC (p < 0,05, teste *t-student*).

4.3.2 Efeitos vasculares diretos do OMC na contractilidade das HUASMC induzida pela histamina (His)

As HUASMC foram também contraídas com histamina (His, 10 μM) e o efeito vascular do octilmetoxicinamato (OMC, 50 μM) nessa contração foi analisado. O gráfico 11 resume os resultados obtidos das várias experiências realizadas.

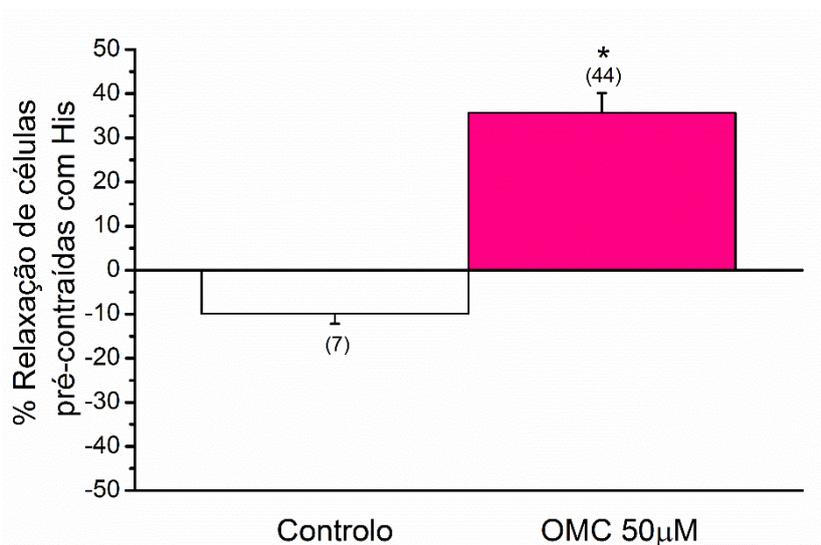


Gráfico 11 - Efeito do OMC (50 μM) sobre as contrações induzidas pela histamina (His, 10 μM) em HUASMC. Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação da área celular. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de células (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * P < 0,05 versus o controlo.

Conforme evidenciado no gráfico 11, o OMC na concentração de 50 μM , induziu um efeito relaxante nas HUASMC pré-contraídas com His (35,66 \pm 4,54%). O grupo de controlo não evidenciou um efeito relaxante. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre o grupo de controlo (EtOH) e o OMC 50 μM (p < 0,05, teste *t-student*).

4.3.3 Comparação do relaxamento entre os dois agentes contrácteis

O gráfico 12 resume os resultados obtidos de várias experiências em que o octilmetoxicinamato (OMC) na concentração de 50 μM , induziu um efeito relaxante em células previamente contraídas por serotonina (5-HT, 1 μM) ou por histamina (His, 10 μM).

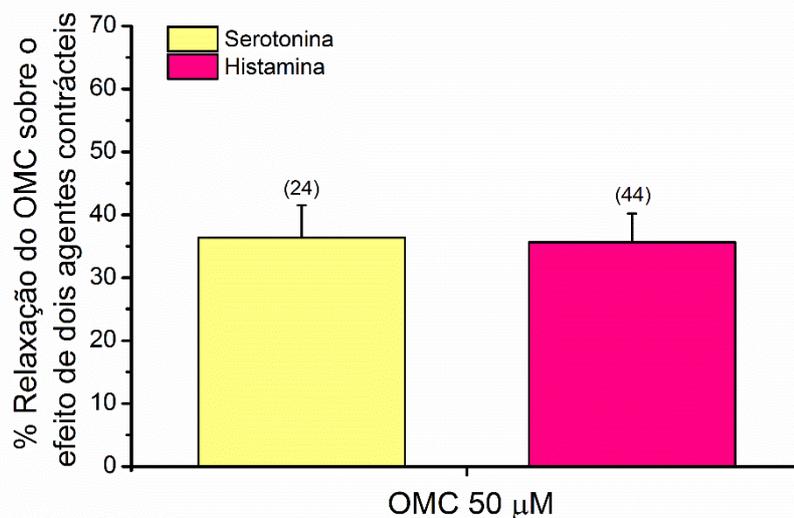


Gráfico 12 - Efeito relaxante do OMC (50µM) sobre as contrações induzidas pela serotonina (5-HT, 1µM) e pela histamina (His, 10µM) em HUASMC. Os dados foram expressos em percentagem (%) de variação da área celular. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM), do número de células (n) indicado entre parêntesis em cada barra. A análise estatística foi realizada pelo teste *t-student*, onde * P <0,05 contração por 5-HT versus contração por His.

Conforme evidenciado no gráfico 12, o OMC induziu um relaxamento em HUASMC contraídas por 5-HT (36,37 ± 5,16 %) e por His (35,66 ± 4,54%). Os dados de relaxação obtidos são similares para ambos os agentes contrácteis (p >0,05, teste *t-student*)

Em suma, os dados obtidos estão concordantes com os previamente obtidos no banho de órgãos, onde se observou que o OMC induz um relaxamento vascular.

5. Discussão Geral

O octilmetoxicinamato (OMC) é um dos filtros ultravioleta mais utilizado a nível mundial em produtos de cuidados pessoais, nomeadamente protetores solares ^(18, 27)

Antes de dar início à componente laboratorial, realizou-se uma pesquisa de campo que permitiu avaliar a presença do OMC no nosso quotidiano. Para tal, foi realizado um estudo exploratório para diversos protetores solares. A recolha dos dados foi feita a partir da técnica - a observação, onde uma observação do tipo não estruturada (ou assistemática) foi realizada.

Os dados obtidos na avaliação da presença do OMC no nosso quotidiano mostraram que as marcas “*Corine de Farme*”, “*Neutrogena*” e “*Bioderma*” são as que apresentam maior concentração de OMC na sua constituição. As marcas onde se verificou uma menor concentração de OMC foram a “*Garnier Ambre Solaire*” e a “*ISDIN*”. Curiosamente, verificou-se que alguns protetores como o “*Eau Thermale Avène Moderate Protection Broad Spectrum*” e o “*Episol Infantil*”, apresentam também outros filtros UV como o octocrileno ou o octil salicilato, respectivamente. Estudos recentes têm atribuído a estes filtros, também, o papel de ED. ^(72, 212) Os nossos dados sugerem assim, que a nossa exposição a ED pode vir acrescida, aumentando a incidência e/ou prevalência de problemas de saúde associados à perturbação endócrina.

O primeiro objetivo estabelecido, para este projeto, foi concretizar com sucesso o isolamento e cultura de células musculares lisas da artéria umbilical humana (HUASMC).

Tal como já referido no Capítulo 1, o cordão umbilical humano é uma excelente amostra para a obtenção de células musculares lisas (SMC) humanas, as quais irão permitir o estudo de diferentes mecanismos celulares e das suas funções. Neste trabalho, o isolamento das SMC foi realizado conforme descrito anteriormente por Cairrão et al. (2009). ⁽⁹⁴⁾ O protocolo estabelecido permitiu que fosse possível obter com sucesso culturas de HUASMC sem contaminações por células endoteliais e/ou fibroblastos, que em cultura expressavam o fenótipo contráctil. Tal como referido também no capítulo 1, a obtenção de culturas puras era uma das grandes limitações na realização de culturas de SMC, mas que no presente trabalho conseguiu ser ultrapassada. Deste modo, as SMC da HUA puderam ser usadas para os estudos seguintes, a nível celular, sobre o efeito do OMC em artérias umbilicais humanas.

De seguida, o passo seguinte foi determinar qual o efeito vascular direto do OMC na HUA.

Para isso, estudos de contractilidade arterial de HUA, foram realizados utilizando a técnica de Banho de Órgãos. Inicialmente, o efeito de diferentes concentrações de OMC (1-100nM e 1-50µM) foi analisado, após contração das HUA por serotonina (5-HT, 1 µM), histamina (His, 10

μM) e cloreto de potássio (KCl, 60 mM). Contrações estáveis foram obtidas após 5-10 minutos para todos os agentes contrácteis, tendo-se obtido respostas contrácteis máximas para a 5-HT, His e KCl de (1633 ± 191 mg, $n=9$), (878 ± 137 mg, $n=8$) e (1724 ± 277 mg, $n=7$), respetivamente. As contrações provocadas pelo KCl (60mM) e pela 5-HT na HUA foram similares, estando estes resultados de acordo com os obtidos anteriormente por Leung et al. (2006).⁽¹⁴²⁾ Por outro lado, outros estudos em HUA demonstraram que as contrações provocadas pela 5-HT podem ser superiores às provocadas pelo KCl (60mM)⁽¹²⁰⁾, contudo no nosso estudo isso não se verificou. A tensão produzida pela histamina foi menor que a provocada pela 5-HT, dados que também estão de acordo com estudos anteriores.⁽¹⁴⁵⁾

Estes resultados podem ser explicados com base nos diferentes mecanismos implicados nos efeitos contrácteis de cada um desses agentes. No que diz respeito ao KCl, foi demonstrado que a contração induzida por este agente se deve principalmente ao influxo de cálcio extracelular, como resultado da despolarização e abertura de canais dependentes de voltagem, como os VOCC.⁽¹²⁰⁾ Relativamente à 5-HT, foi demonstrado que em HUA sem endotélio, os seus efeitos contrácteis são devidos à ativação dos recetores 5-HT_{2A} (que acoplam à proteína G_q) e parcialmente devidos à ativação dos recetores 5-HT_{1B}/5-HT_{1D} (acoplados à proteína G_{i/o}) presentes no músculo liso desta artéria. A ativação destes recetores leva a uma contração.^(119, 155) O recetor 5-HT₇, que está acoplado a uma proteína G_s, e encontra-se envolvido na vasorelaxação independente de endotélio em vários vasos sanguíneos,^(158, 213) também foi demonstrado estar expresso na HUA. Contudo, parece não ter muita relevância na regulação da sua contractilidade. No caso da His, a contração é conseguida pela ativação dos recetores H₁ presentes no músculo liso da HUA. Este recetor que está interligado a uma proteína G_q ativa a cascata de sinalização PLC/IP₃, levando a um aumento intracelular de Ca²⁺, e consequente contração.^(119, 122, 159) A expressão do recetor H₂ também foi demonstrada no músculo liso da HUA.⁽²¹⁴⁾ Este recetor que associado a uma proteína G_s, estimula a adenil ciclase, aumentando os níveis de cAMP, e provocando uma consequente relaxação. Assim, a máxima contração provocada pela histamina, que foi inferior às provocadas pela 5-HT e pelo KCl, pode ser explicada com base na diferente expressão e ativação dos recetores existentes na HUA. Isto porque, embora o efeito provocado pela ativação do recetor H₁ pareça predominante, o efeito da histamina pode também estar a ser influenciado pela ativação do recetor H₂, provocando contrações menos potentes do que as do KCl e da 5-HT.

Relativamente ao efeito vascular direto do OMC, os nossos resultados demonstraram que ele foi capaz de induzir uma vasorelaxação em HUA previamente contraídas por serotonina (5-HT, 1 μM), histamina (His, 10 μM) ou cloreto de potássio (KCl, 60mM). O relaxamento máximo foi conseguido para uma concentração de 50 μM de OMC, para os três agentes contrácteis utilizados. Estes dados demonstram assim, que o OMC provoca efeitos vasodilatadores diretos em artérias humanas, o que indicia a existência de um efeito não genómico exercido por este ED. Estes resultados estão de acordo com dados obtidos anteriormente, num estudo realizado pelo nosso grupo de investigação (dados não publicados).⁽⁹²⁾ No que diz respeito à participação

do endotélio no efeito do OMC a nível vascular, não existem estudos suficientes que denotem a sua real importância a este nível. Apenas um estudo foi realizado até à data, tendo sido demonstrado que o OMC provoca uma vasorelação em HUA sem endotélio. ⁽⁹²⁾ Nenhum estudo demonstrou o efeito vasodilatador do OMC em artérias, na presença de endotélio. Os dados obtidos no presente trabalho demonstraram que o OMC provoca um efeito vasorelaxante na HUA que é independente do endotélio estando estes dados, assim, de acordo com os obtidos anteriormente por Filipe et al. (2016). ⁽⁹²⁾ Por outro lado, o efeito relaxante do OMC em HUA contraídas por 5-HT, His e KCl foi similar para os três agentes contrácteis, apesar de todos eles terem modos de atuação diferentes. Estes resultados similares e independentes dos agentes contrácteis utilizados, são sugestivos de que a eficiência do mecanismo vasodilatador do OMC não varia em função do estímulo contráctil dos agentes utilizados, podendo o mesmo estar assim a ocorrer por uma via de sinalização que é, de algum modo, partilhada pelos três agentes contrácteis, ou por nenhum deles.

O efeito vascular direto do OMC em HUA também foi avaliado a nível celular, recorrendo à técnica de *Planar Cell Surface Area* (PCSA). As HUASMC anteriormente obtidas, foram usadas para estes estudos.

Inicialmente, as HUASMC foram contraídas por serotonina (5-HT, 1 μ M) ou histamina (His, 10 μ M). E, de seguida, o efeito do OMC (50 μ M) nestas contrações, foi analisado. O tempo de estabilização da resposta contráctil para a 5-HT assim como para a His foi de 20 minutos, igual ao tempo de estabilização do OMC. Este tempo de espera (~20 minutos) é o tempo necessário para se obter uma resposta máxima na qual a fase platô do efeito é conseguida. ⁽¹⁸⁷⁾ Os dados mostraram que as contrações provocadas pela 5-HT e pela His foram similares: (24,738 \pm 2,401%, n= 24) e (26,283 \pm 2,476%, n=44), respetivamente. O que não está totalmente de acordo com dados obtidos anteriormente, uma vez que a contração por His deveria ser menor do que a verificada para a 5-HT. ⁽¹⁴⁵⁾

Relativamente ao efeito vascular do OMC, os resultados demonstraram que ele foi capaz de induzir um relaxamento em HUASMC contraídas tanto por 5-HT (36,37 \pm 5,16%) como por His (35,66 \pm 4,54%). Os efeitos relaxantes do OMC foram similares para ambos os agentes contrácteis. Estes dados de contractilidade celular são concordantes com os obtidos no banho de órgãos. Note-se que as % de relaxação do OMC em HUASMC contraídas por 5-HT e por His mostraram ser maiores que em HUA, quando contraídas pelos mesmos agentes contrácteis. Estes dados estão de acordo com dados obtidos anteriormente por outros autores, onde foi também verificado um efeito maior em células musculares lisas, do que em artérias. ^(184, 187)

Em suma, foi demonstrado usando as técnicas de Banho de Órgãos e PCSA, que o OMC induz um relaxamento vascular direto em HUA, quer a nível arterial quer a nível celular. Os nossos dados são sugestivos de que o efeito relaxante do OMC na HUA não varia em função do estímulo contráctil.

Estes dados levantaram a necessidade de se proceder a estudos mecanísticos, de modo a perceber qual o mecanismo pelo qual o OMC provoca o seu efeito vasorelaxante.

Diversos estudos reportaram para o OMC uma atividade estrogénica ^(13-15, 17, 21, 50, 66, 67, 69) e atualmente, está bem claro que estas hormonas são capazes de provocar uma vasodilatação a nível arterial. ^(183, 184, 186, 188, 189, 192) Na HUA, a vasorelaxação provocada pelos estrogénios já foi anteriormente demonstrada. ^(193, 194) Neste sentido, será o OMC capaz de induzir os seus efeitos vasorelaxantes na HUA, atuando por um mesmo mecanismo de ação partilhado com os estrogénios?

Ora, sendo o OMC um composto lipofílico ⁽³⁰⁾, uma via privilegiada para este ED atuar seria através de uma interação direta com um determinado recetor nuclear, ⁽²⁴⁾ neste caso o recetor de estrogénios (ER). Contudo, os resultados obtidos demonstraram que o efeito vasorelaxante do OMC na HUA foi devido a um efeito não-genómico, como já tinha sido observado por Filipe et al. (2016). ⁽⁹²⁾ Além disso, Cairrao et al. (2012) propuseram que os estrogénios provocam uma vasodilatação que é independente de endotélio. ⁽¹⁸⁴⁾ Os nossos dados concordam com os dados obtidos por estes autores, na medida em que o OMC foi capaz de provocar uma vasorelaxação em artérias desprovidas de endotélio, sugerindo que o OMC pode partilhar uma via de sinalização partilhada com estas hormonas.

No caso dos estrogénios, outros estudos reportaram que o seu efeito vasorelaxante, pode ser devido a aumentos nos níveis intracelulares de cAMP e cGMP. ^(191, 192) De facto, como já foi referido no Capítulo 1., os nucleótidos cíclicos são os principais mensageiros ligados à relaxação vascular e à vasodilatação, através da ação das cinases dependentes dos nucleótidos cíclicos. O aumento dos níveis intracelulares dos nucleótidos cíclicos provoca relaxamento em HUA desprovidas de endotélio e dois tipos de fosfodiesterases (PDE), a PDE4 e a PDE5 foram identificadas como enzimas chave na regulação da vasodilatação associada ao cAMP e ao cGMP. ⁽¹¹⁹⁾

Neste sentido, fomos analisar o envolvimento dos nucleótidos cíclicos, na vasorelaxação induzida pelo OMC, de modo a tentar perceber o mecanismo pelo qual ele atua.

Para isso, utilizou-se o nitroprussiato de sódio (SNP) - um estimulador da guanil ciclase solúvel (sGC) e, de seguida, a vasorelaxação induzida pelo OMC (1-100 nM e 1-50 µM) foi analisada. Os resultados obtidos mostram que o SNP relaxa as HUA contraídas tanto por 5-HT, His ou KCl, como já foi demonstrado em estudos anteriores realizados com HUA. ^(119, 175) Quanto às artérias contraídas com histamina, o SNP (10 µM) relaxou cerca de 100%, pelo que tivemos que usar uma concentração mais baixa deste fármaco (1 µM), de modo a analisar um possível efeito aditivo do uso conjunto do OMC com o SNP. Ainda assim, os efeitos do SNP sobre o efeito vasorelaxante do OMC continuaram a ser ligeiramente maiores para as artérias contraídas com His. Os resultados mostraram que o efeito do SNP (ativador da sGC) nas artérias contraídas por 5-HT, His ou KCl, foi similar aos efeitos relaxantes obtidos para o SNP+OMC. Tomados em conjunto,

estes dados são sugestivos que o OMC e o SNP parecem partilhar o mesmo mecanismo de ação ou agir por uma via de sinalização interligada, que inclui o envolvimento da sGC.

Por outro lado, a modulação dos canais iónicos também é um dos principais efeitos das ações não genómicas dos estrogénios. Já foi descrito que a vasodilatação induzida pelos estrogénios pode ser devida a uma inibição dos canais de Ca^{2+} .⁽¹⁸⁴⁾ O cálcio extracelular pode entrar nas SMC por diferentes tipos de canais de cálcio, como os LTCC, cuja inibição já foi associada à vasodilatação mediada pelos estrogénios.^(184, 189)

Assim, o passo seguinte foi tentar perceber, se o efeito vasorelaxante do OMC também pode ocorrer devido a uma ação do OMC nos canais de cálcio.

Para isso, a nifedipina (Nif) - um inibidor específico dos canais de cálcio do tipo L (LTCC) - foi usada e, de seguida, a vasorelaxação induzida pelo OMC (1-100 nM e 1-50 μ M) foi analisada. Os dados obtidos mostram que a Nif relaxou as HUA contraídas tanto por 5-HT, His ou KCl. A relaxação induzida pela Nif foi também demonstrada em estudos anteriores realizados com HUA.⁽²¹⁵⁾ Quanto às artérias contraídas com cloreto de potássio, a Nif (1 μ M) relaxou cerca 100%, pelo que tivemos que usar uma concentração mais baixa deste fármaco (0,1 μ M), de modo a analisar um possível efeito aditivo do uso conjunto do OMC com a Nif. Os nossos dados mostraram que o efeito da Nif (inibidor específico dos LTCC) nas artérias contraídas por 5-HT, His ou KCl, foi similar aos efeitos relaxantes obtidos para a Nif+OMC. Tomados em conjunto, estes dados são sugestivos que o OMC e o Nif parecem partilhar o mesmo mecanismo de ação ou agir por uma via de sinalização interligada, que exclui o envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, LTCC.

Em suma, este estudo demonstrou que o OMC provoca uma vasorelaxação em artérias umbilicais humanas. O mecanismo de ação do OMC na HUA pode ser, em parte, semelhante ao dos estrogénios, na medida em que se verificou um efeito rápido (não-genómico) e independente de endotélio. Os nossos dados sugerem que esse efeito vasorelaxante pode ser parcialmente devido à ativação da sGC e à inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem, LTCC. Estes dados são coerentes, uma vez que está descrito na literatura que, quer os níveis elevados de cGMP, quer a inativação dos LTCC, estão associados a uma vasorelaxação na HUA.^(184, 191)

6. Conclusões

Este trabalho analisou pela primeira vez o mecanismo de ação do octilmetoxicinamato (OMC). Foi demonstrado que o OMC exerce um efeito relaxante arterial rápido (não-genómico) e independente de endotélio. Demonstrou-se também, pela primeira vez, que esse efeito também se verifica a nível das HUASMC. O mecanismo de ação do OMC pode ser, em parte, semelhante ao dos estrogénios, envolvendo a ativação da guanil ciclase solúvel e inativação dos canais de cálcio do tipo L. Estudos adicionais são necessários para compreender melhor o mecanismo de ação do OMC a nível vascular.

7. Referências Bibliográficas

1. Mancebo SE, Wang SQ. Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. *Reviews on environmental health*. 2014;**29**(3):265-73.
2. Maipas S, Nicolopoulou-Stamati P. Sun lotion chemicals as endocrine disruptors. *Horm-Int J Endocrino*. 2015;**14**(1):32-46.
3. Mancebo SE, Hu JY, Wang SQ. Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. *Dermatologic clinics*. 2014;**32**(3):427-38, x.
4. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and applied pharmacology*. 2004;**195**(3):298-308.
5. Skotarczak K O-MA, Lodyga M, Polańska A, Mazur M, Adamski Z. Photoprotection: facts and controversies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015;**19**(1):98-112.
6. Touitou E, Godin B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinics in dermatology*. 2008;**26**(4):375-9.
7. Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. *Seminars in oncology nursing*. 2016;**32**(3):241-54.
8. Burnett ME, Hu JY, Wang SQ. Sunscreens: obtaining adequate photoprotection. *Dermatologic therapy*. 2012;**25**(3):244-51.
9. 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.
10. Fent K, Kunz PY, Zenker A, Rapp M. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Marine environmental research*. 2010;**69** Suppl:S4-6.
11. Wang J, Pan L, Wu S, Lu L, Xu Y, Zhu Y, et al. Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. *International journal of environmental research and public health*. 2016;**13**(8).
12. Miranda MS, da Silva LP, da Silva JCGE. UV filter 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate: a structure, energetic and UV-vis spectral analysis based on density functional theory. *Journal of Physical Organic Chemistry*. 2014;**27**(1):47-56.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Schlumpf M, Kypke K, Vot CC, Birchler M, Durrer S, Faass O, et al. Endocrine active UV filters: Developmental toxicity and exposure through breast milk. *Chimia*. 2008a;**62**(5):345-51.
20. 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*. 2006b;**79**(4):305-24.
21. 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*. 2004b;**205**(1-2):113-22.
22. Szwarcfarb B, Carbone S, Reynoso R, Bollero G, Ponzo O, Moguevsky 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.
23. De Coster S, van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*. 2012;**2012**:713696.
24. Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*. 2011;**73**:135-62.
25. Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)*. 2010;**9**(1):9-15.
26. Tapia-Orozco N, Santiago-Toledo G, Barron V, Espinosa-Garcia AM, Garcia-Garcia JA, Garcia-Arrazola R. Environmental epigenomics: Current approaches to assess epigenetic effects of endocrine disrupting compounds (EDC's) on human health. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2017;**51**:94-9.
27. Sharma A, Banyiova K, Babica P, El Yamani N, Collins AR, Cupr P. Different DNA damage response of cis and trans isomers of commonly used UV filter after the exposure on adult human liver stem cells and human lymphoblastoid cells. *The Science of the total environment*. 2017;**593-594**:18-26.
28. Manova E, von Goetz N, Hungerbuehler K. Aggregate consumer exposure to UV filter ethylhexyl methoxycinnamate via personal care products. *Environment international*. 2015;**74**:249-57.
29. Manova E, von Goetz N, Hauri U, Bogdal C, Hungerbuehler K. Organic UV filters in personal care products in Switzerland: a survey of occurrence and concentrations. *International journal of hygiene and environmental health*. 2013;**216**(4):508-14.

30. Schneider S, Deckardt K, Hellwig J, Kuttler K, Mellert W, Schulte S, et al. Octyl methoxycinnamate: two generation reproduction toxicity in Wistar rats by dietary administration. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2005;43(7):1083-92.
31. Montes-Grajales D, Olivero-Verbel J. EDCs DataBank: 3D-Structure database of endocrine disrupting chemicals. *Toxicology*. 2015;327:87-94.
32. Stein HV, Berg CJ, Maung JN, O'Connor LE, Pagano AE, MacManus-Spencer LA, et al. Photolysis and cellular toxicities of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate and its photoproducts. *Environmental science Processes & impacts*. 2017;19(6):851-60.
33. Markogiannaki E, Andrianou XD, Kalyvas C, Andra SS, Makris KC. The association between use of sunscreens and cosmetics and urinary concentrations of the UV filter ethylhexyl-methoxy cinnamate: A pilot biomonitoring study. *Biomonitoring*. 2014;1(1).
34. Pangnakorn P, Nonthabenjawan R, Ekgasit S, Thammacharoen C, Pattanaargson Wanichwecharungruang S. Monitoring 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate photoisomerization on skin using attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc*. 2007;61(2):193-8.
35. Pegoraro CN, Chiappero MS, Montejano HA. Measurements of octanol-air partition coefficients, vapor pressures and vaporization enthalpies of the (E) and (Z) isomers of the 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate as parameters of environmental impact assessment. *Chemosphere*. 2015;138:546-52.
36. Pattanaargson S, Munhapol T, Hirunsupachot N, Luangthongaram P. Photoisomerization of octyl methoxycinnamate. *J Photoch Photobio A*. 2004;161(2-3):269-74.
37. MacManus-Spencer LA, Tse ML, Klein JL, Kracunas AE. Aqueous photolysis of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate. *Environ Sci Technol*. 2011;45(9):3931-7.
38. 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.
39. 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.
40. Hanson KM, Gratton E, Bardeen CJ. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free radical biology & medicine*. 2006;41(8):1205-12.
41. Vettor M, Perugini P, Scalia S, Conti B, Genta I, Modena T, et al. Poly(D,L-lactide) nanoencapsulation to reduce photoinactivation of a sunscreen agent. *International journal of cosmetic science*. 2008;30(3):219-27.
42. Darvay A, White IR, Rycroft RJG, Jones AB, Hawk JL, McFadden JP. Photoallergic contact dermatitis is uncommon. *Brit J Dermatol*. 2001;145(4):597-601.
43. Benevenuto CG, Guerra LO, Gaspar LR. Combination of retinyl palmitate and UV-filters: phototoxic risk assessment based on photostability and in vitro and in vivo phototoxicity assays. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2015;68:127-36.

44. Puglia C, Damiani E, Offerta A, Rizza L, Tirendi GG, Tarico MS, et al. Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: characterization, in vitro penetration and photostability studies. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2014;**51**:211-7.
45. Huong SP, Andrieu V, Reynier JP, Rocher E, Fourneron JD. The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor. *J Photoch Photobio A*. 2007;**186**(1):65-70.
46. Meijer J, Lodén M. Stability Analysis of Three UV-Filters Using HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 1995;**18**(9):1821-32.
47. Benson HA, Sarveiya V, Risk S, Roberts MS. Influence of anatomical site and topical formulation on skin penetration of sunscreens. *Ther Clin Risk Manag*. 2005;**1**(3):209-18.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. Zwiener C, Richardson SD, DeMarini DM, Grummt T, Glauner T, Frimmel FH. Drowning in disinfection byproducts? Assessing swimming pool water. *Environ Sci Technol*. 2007;**41**(2):363-72.
53. Nakajima M, Kawakami T, Niino T, Takahashi Y, Onodera S. Aquatic Fate of Sunscreen Agents Octyl-4-methoxycinnamate and Octyl-4-dimethylaminobenzoate in Model Swimming Pools and the Mutagenic Assays of Their Chlorination Byproducts. *Journal of Health Science*. 2009;**55**(3):363-72.
54. Gackowska A, Przybylek M, Studzinski W, Gaca J. Formation of chlorinated breakdown products during degradation of sunscreen agent, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate in the presence of sodium hypochlorite. *Environmental science and pollution research international*. 2016;**23**(2):1886-97.
55. Sharifan H, Klein D, Morse AN. UV filters interaction in the chlorinated swimming pool, a new challenge for urbanization, a need for community scale investigations. *Environmental research*. 2016;**148**:273-6.
56. 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.
57. Loraine GA, Pettigrove ME. Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environmental Science & Technology*. 2006;**40**(3):687-95.

58. Nguyen KT, Scapolla C, Di Carro M, Magi E. Rapid and selective determination of UV filters in seawater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with stir bar sorptive extraction. *Talanta*. 2011;**85**(5):2375-84.
59. Gago-Ferrero P, Diaz-Cruz MS, Barcelo D. Occurrence of multiclass UV filters in treated sewage sludge from wastewater treatment plants. *Chemosphere*. 2011;**84**(8):1158-65.
60. Poiger T, Buser HR, Balmer ME, Bergqvist PA, Muller MD. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere*. 2004;**55**(7):951-63.
61. Balmer ME, Buser HR, Muller MD, Poiger T. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science & Technology*. 2005;**39**(4):953-62.
62. Fent K, Zenker A, Rapp M. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental pollution*. 2010;**158**(5):1817-24.
63. Straub JO. Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data. *Toxicology letters*. 2002:29-37.
64. Plagellat C, Kupper T, Furrer R, de Alencastro LF, Grandjean D, Tarradellas J. Concentrations and specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere*. 2006;**62**(6):915-25.
65. Zenker A, Schmutz H, Fent K. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of chromatography A*. 2008;**1202**(1):64-74.
66. 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.
67. 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.
68. Kunz PY, Galicia HF, Fent K. Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;**90**(2):349-61.
69. 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.
70. Ozaez I, Morcillo G, Martinez-Guitarte JL. The effects of binary UV filter mixtures on the midge *Chironomus riparius*. *The Science of the total environment*. 2016;**556**:154-62.
71. Ozaez I, Morcillo G, Martinez-Guitarte JL. Ultraviolet filters differentially impact the expression of key endocrine and stress genes in embryos and larvae of *Chironomus riparius*. *The Science of the total environment*. 2016;**557-558**:240-7.
72. Ozaez I, Martinez-Guitarte JL, Morcillo G. Effects of in vivo exposure to UV filters (4-MBC, OMC, BP-3, 4-HB, OC, OD-PABA) on endocrine signaling genes in the insect *Chironomus riparius*. *The Science of the total environment*. 2013;**456-457**:120-6.

73. 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*. 2007b;**115** Suppl 1:77-83.
74. Axelstad M, Boberg J, Hougaard KS, Christiansen S, Jacobsen PR, Mandrup KR, et al. Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and applied pharmacology*. 2011;**250**(3):278-90.
75. 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.
76. 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.
77. Isling LK, Boberg J, Jacobsen PR, Mandrup KR, Axelstad M, Christiansen S, et al. Late-life effects on rat reproductive system after developmental exposure to mixtures of endocrine disruptors. *Reproduction*. 2014;**147**(4):465-76.
78. Carbone S, Szwarcfarb B, Reynoso R, Ponzio 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.
79. Lichtensteiger W, Bassetti-Gaille C, Faass O, Axelstad M, Boberg J, Christiansen S, et al. Differential gene expression patterns in developing sexually dimorphic rat brain regions exposed to antiandrogenic, estrogenic, or complex endocrine disruptor mixtures: glutamatergic synapses as target. *Endocrinology*. 2015;**156**(4):1477-93.
80. 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.
81. Bagamasbad P, Denver RJ. Mechanisms and significance of nuclear receptor auto- and cross-regulation. *General and comparative endocrinology*. 2011;**170**(1):3-17.
82. Bonin AM, Arlauskas AP, Angus DS, Baker RSU, Gallagher CH, Greenoak G, et al. UV-absorbing and other sun-protecting substances: genotoxicity of 2-ethylhexyl P-methoxycinnamate. *Mutation Research Letters*. 1982;**105**(5):303-8.
83. Broniowska Z, Pomierny B, Smaga I, Filip M, Budziszewska B. The effect of UV-filters on the viability of neuroblastoma (SH-SY5Y) cell line. *Neurotoxicology*. 2016;**54**:44-52.
84. 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.
85. Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, et al. Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *The Journal of investigative dermatology*. 2004;**123**(1):57-61.

86. Li X, Hu J, Chen L, Zhang W. The adsorption behaviour and photoprotection effect of UV filter absorbed on the surface of human hair. *International journal of cosmetic science*. 2016;**38**(1):52-9.
87. Strajhar P, Tonoli D, Jeanneret F, Imhof RM, Malagnino V, Patt M, et al. Steroid profiling in H295R cells to identify chemicals potentially disrupting the production of adrenal steroids. *Toxicology*. 2017;**381**:51-63.
88. O'Keefe SJ, Feltis BN, Piva TJ, Turney TW, Wright PF. ZnO nanoparticles and organic chemical UV-filters are equally well tolerated by human immune cells. *Nanotoxicology*. 2016;**10**(9):1287-96.
89. Necasova A, Banyiova K, Literak J, Cupr P. New probabilistic risk assessment of ethylhexyl methoxycinnamate: Comparing the genotoxic effects of trans- and cis-EHMC. *Environmental toxicology*. 2016.
90. Song M, Song MK, Choi HS, Ryu JC. Monitoring of deiodinase deficiency based on transcriptomic responses in SH-SY5Y cells. *Archives of toxicology*. 2013;**87**(6):1103-13.
91. Huang CH, Ciou JS, Chen ST, Kok VC, Chung Y, Tsai JJ, et al. Identify potential drugs for cardiovascular diseases caused by stress-induced genes in vascular smooth muscle cells. *PeerJ*. 2016;**4**:e2478.
92. Filipe J. Estudo do efeito do Octilmetoxicinamato (OMC) em artérias umbilicais humanas. Universidade da Beira Interior: Universidade da Beira Interior; 2016.
93. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. 2004;**84**(3):767-801.
94. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Alvarez E, Correia I, Verde I. Isolation and culture of human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 2009;**45**(3-4):175-84.
95. Cairrão E. Estudo do mecanismo vasodilatador da testosterona a nível arterial. Universidade da Beira Interior: Universidade da Beira Interior; 2009.
96. Shi N, Chen SY. Mechanisms simultaneously regulate smooth muscle proliferation and differentiation. *Journal of biomedical research*. 2014;**28**(1):40-6.
97. Xie C, Ritchie RP, Huang H, Zhang J, Chen YE. Smooth muscle cell differentiation in vitro: models and underlying molecular mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;**31**(7):1485-94.
98. Murray TR, Marshall BE, Macarak EJ. Contraction of vascular smooth muscle in cell culture. *J Cell Physiol*. 1990;**143**(1):26-38.
99. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem cells international*. 2016.
100. Di Naro E, Ghezzi F, Raio L, Franchi M, D'Addario V. Umbilical cord morphology and pregnancy outcome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2001;**96**(2):150-7.
101. Moore KL. Embriologia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 543 p.
102. Moshiri M, Zaidi SF, Robinson TJ, Bhargava P, Siebert JR, Dubinsky TJ, et al. Comprehensive imaging review of abnormalities of the umbilical cord. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. 2014;**34**(1):179-96.

103. Bosselmann S, Mielke G. Sonographic Assessment of the Umbilical Cord. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2015;**75**(8):808-18.
104. Benirschke K. Remarkable placenta. *Clinical anatomy*. 1998;**11**(3):194-205.
105. Kellow ZS, Feldstein VA. Ultrasound of the placenta and umbilical cord: a review. *Ultrasound quarterly*. 2011;**27**(3):187-97.
106. Ferguson VL, Dodson RB. Bioengineering aspects of the umbilical cord. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2009;**144** Suppl 1:S108-13.
107. Nanaev AK, Kohnen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta*. 1997;**18**(1):53-64.
108. Meyer WW, Rumpelt HJ, Yao AC, Lind J. Structure and closure mechanism of the human umbilical artery. *European Journal of Pediatrics*. 1978;**128**(4):247-59.
109. Roffino S, Lamy E, Foucault-Bertaud A, Risso F, Reboul R, Tellier E, et al. Premature birth is associated with not fully differentiated contractile smooth muscle cells in human umbilical artery. *Placenta*. 2012;**33**(6):511-7.
110. Martin P, Rebolledo A, Palomo AR, Moncada M, Piccinini L, Milesi V. Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: a review of their roles in human umbilical artery contraction. *Reproductive sciences*. 2014;**21**(4):432-41.
111. Salemme S, Rebolledo A, Speroni F, Petrucci S, Milesi V. L, P-/Q- and T-type Ca²⁺ channels in smooth muscle cells from human umbilical artery. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2007;**20**(1-4):55-64.
112. Esperança Pina JAR. Anatomia humana do coração e vasos. Lisboa: Lidel; 2007. 560 p.
113. Rockelein G, Schneider R. Three-dimensional analysis of the tunica media of umbilical arteries. Scanning electron microscopy study. *Z Geburtshilfe Perinatol*. 1992;**196**(6):266-72.
114. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension*. 1989;**13**:658-67.
115. Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent responses in human blood vessels. *Trends Pharmacol Sci*. 1988;**9**:181-4.
116. Nakas-Icindic E, Zaciragic A, Hadzovic A, Avdagic N. Endothelin in health and disease. *Bosn J Basic Med Sci*. 2004;**4**(3):31-4.
117. Vanhoutte PM. Endothelium and the control of vascular smooth muscle. In: Wilkins RH, editor. Cerebral Vasospasm. New York: Raven Press; 1988. p. 119-28.
118. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2008;**376**(5):375-83.
119. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Morgado M, Alvarez E, Verde I. PDE4 and PDE5 regulate cyclic nucleotides relaxing effects in human umbilical arteries. *European journal of pharmacology*. 2008;**582**(1-3):102-9.

120. Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Unal M, Polat G, Kayhan Z, Ogus E. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life sciences*. 2003;**72**(12):1321-9.
121. Milesi V, Raingo J, Rebolledo A, Grassi de Gende AO. Potassium channels in human umbilical artery cells. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;**10**(6):339-46.
122. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Marques B, Verde I. Regulation of human umbilical artery contractility by different serotonin and histamine receptors. *Reproductive sciences*. 2009;**16**(12):1175-85.
123. Santos-Silva AJ, Cairrao E, Verde I. Study of the mechanisms regulating human umbilical artery contractility. *Health*. 2010;**2**(4):321-31.
124. Okatani Y, Watanabe K, Sagara Y. Effect of nitric oxide, prostacyclin, and thromboxane on the vasospastic action of hydrogen peroxide on human umbilical artery. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 1997;**76**(6):515-20.
125. Okker-Reitsma GH, Dziadkowiec IJ, Groot CG. Isolation and culture of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1985;**21**(1):22-5.
126. Hughes AD, Wijetunge S, Parkinson NA. Isolation of single vascular smooth muscle cells from human omental resistance arteries. *J Hum Hypertens*. 1994;**8**(8):615-8.
127. Leik CE, Willey A, Graham MF, Walsh SW. Isolation and culture of arterial smooth muscle cells from human placenta. *Hypertension*. 2004;**43**(4):837-40.
128. Martin de Llano JJ, Fuertes G, Garcia-Vicent C, Torro I, Fayos JL, Lurbe E. Procedure to consistently obtain endothelial and smooth muscle cell cultures from umbilical cord vessels. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2007;**149**(1):1-9.
129. Ribeiro MP, Relvas R, Chiquita S, Correia IJ. Isolation of human umbilical arterial smooth muscle cells (HUASMC). *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010(41).
130. Campbell JH, Campbell GR. Culture techniques and their applications to studies of vascular smooth muscle. *Clin Sci (Lond)*. 1993;**85**(5):501-13.
131. Pauly RR, Bilato C, Cheng L, Monticone R, Crow MT. Vascular smooth muscle cell cultures. *Methods in Cell Biology*. 1997;**52**:133-54.
132. Mazza G, Rossmannith E, Lang-Olip I, Pfeiffer D. Marker profile for the evaluation of human umbilical artery smooth muscle cell quality obtained by different isolation and culture methods. *Cytotechnology*. 2016;**68**(4):701-11.
133. Heimli H, Kahler H, Endresen MJ, Henriksen T, Lyberg T. A new method for isolation of smooth muscle cells from human umbilical cord arteries. *Scand J Clin Lab Invest*. 1997;**57**(1):21-9.
134. Bygglin H, Laaksamo E, Myllarniemi M, Tulamo R, Hernesniemi J, Niemela M, et al. Isolation, culture, and characterization of smooth muscle cells from human intracranial aneurysms. *Acta neurochirurgica*. 2011;**153**(2):311-8.
135. Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation research*. 2005;**96**(3):280-91.
136. Kudryavtseva O, Aalkjaer C, Matchkov VV. Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca²⁺-dependent transcription factors. *The FEBS journal*. 2013;**280**(21):5488-99.

137. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation*. 2007;**15**(3):100-8.
138. Li S, Fan YS, Chow LH, Van Den Diepstraten C, van Der Veer E, Sims SM, et al. Innate diversity of adult human arterial smooth muscle cells: cloning of distinct subtypes from the internal thoracic artery. *Circulation research*. 2001;**89**(6):517-25.
139. Olafsson IH, Vilhjalmsson DT, Thormodsson FR. Preparation of cultured human vascular cells. *Methods in molecular biology*. 2012;**849**:245-59.
140. Boersma JI, Janzen KM, Oliveira L, Crankshaw DJ. Characterization of excitatory prostanoid receptors in the human umbilical artery in vitro. *British journal of pharmacology*. 1999;**128**(7):1505-12.
141. Perusquia M, Navarrete E, Gonzalez L, Villalon CM. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life sciences*. 2007;**81**(12):993-1002.
142. Leung SW, Quan A, Lao TT, Man RY. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early human development*. 2006;**82**(7):457-62.
143. Tiritilli A. 5-hydroxytryptamine induces vasoconstriction of the human umbilical artery: effects of hypoxia and nicorandil. *Gynecol Obstet Invest*. 2000;**50**(2):77-83.
144. MacLennan SJ, Whittle MJ, McGrath JC. 5-HT₁-like receptors requiring functional cyclo-oxygenase and 5-HT₂ receptors independent of cyclo-oxygenase mediate contraction of the human umbilical artery. *British journal of pharmacology*. 1989;**97**(3):921-33.
145. Quan A, Leung SWS, Lao TT, Man RYK. 5-Hydroxytryptamine and Thromboxane A₂ as Physiologic Mediators of Human Umbilical Artery Closure. *Reproductive sciences*. 2003;**10**(8):490-5.
146. Izumi H, Makino Y, Shirakawa K, Garfield RE. Role of nitric oxide on vasorelaxation in human umbilical artery. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;**172**(5):1477-84.
147. Izumi H, Makino Y, Mohtai H, Shirakawa K, Garfield RE. Comparison of nitric oxide and prostacyclin in endothelium-dependent vasorelaxation of human umbilical artery at midgestation. *Am J Obstet Gynecol*. 1996;**175**(2):375-81.
148. Radenkovic M, Grbovic L, Radunovic N, Momcilov P. Pharmacological evaluation of bradykinin effect on human umbilical artery in normal, hypertensive and diabetic pregnancy. *Pharmacol Rep*. 2007;**59**(1):64-73.
149. Tiritilli A, El Habach T, Haury L, Duret JF. BK₂ but not BK₁ receptors mediating contractile response in human umbilical arteries: role of thromboxane A₂. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*. 2004;**26**(4):247-52.
150. Bodelsson G, Stjernquist M. Characterization of endothelin receptors and localization of 125I-endothelin-1 binding sites in human umbilical artery. *European journal of pharmacology*. 1993;**249**(3):299-305.
151. Rizzi A, Calo G, Battistini B, Regoli D. Contractile activity of endothelins and their precursors in human umbilical artery and vein: identification of distinct endothelin-converting enzyme activities. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1998;**31** Suppl 1:S58-61.

152. Bogoni G, Rizzi A, Calo G, Campobasso C, D'Orleans-Juste P, Regoli D. Characterization of endothelin receptors in the human umbilical artery and vein. *British journal of pharmacology*. 1996;**119**(8):1600-4.
153. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, et al. Endothelins -- clinical perspectives. *Biochemia medica*. 2011;**21**(3):231-42.
154. Stjernquist M, Bodelsson G, Poulsen H. Vasoactive peptides and uterine vessels. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 1995;**9**(2):165-76.
155. Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *British journal of pharmacology*. 1999;**127**(5):1247-55.
156. Karlsson C, Bodelsson G, Bodelsson M, Stjernquist M. Characterization of 5-hydroxytryptamine receptors mediating circular smooth muscle contraction in the human umbilical artery. *Gynecol Obstet Invest*. 1999;**47**(2):102-7.
157. Gupta S, Hanff LM, Visser W, Steegers EA, Saxena PR, Vulto AG, et al. Functional reactivity of 5-HT receptors in human umbilical cord and maternal subcutaneous fat arteries after normotensive or pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens*. 2006;**24**(7):1345-53.
158. Jahnichen S, Glusa E, Pertz HH. Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2005;**371**(1):89-98.
159. Hawley J, Rubin PC, Hill SJ. Distribution of receptors mediating phosphoinositide hydrolysis in cultured human umbilical artery smooth muscle and endothelial cells. *Biochemical pharmacology*. 1995;**49**(7):1005-11.
160. Zhang J, Gong Y, Yu Y. PG F(2alpha) Receptor: A Promising Therapeutic Target for Cardiovascular Disease. *Frontiers in pharmacology*. 2010;**1**:116.
161. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2008;**98**(1):10-23.
162. Cribbs LL. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: Multiple functions. *Cell Calcium*. 2006;**40**(2):221-30.
163. Godfraind T. Calcium-channel modulators for cardiovascular disease. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2006;**11**(1):49-73.
164. Sato N, Tanaka KA, Szlam F, Tsuda A, Arias ME, Levy JH. The vasodilatory effects of hydralazine, nicardipine, nitroglycerin, and fenoldopam in the human umbilical artery. *Anesthesia and analgesia*. 2003;**96**(2):539-44, table of contents.
165. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 2000;**184**(3):409-20.
166. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;**1**(1):11-21.
167. Philipson KD, Nicoll DA. Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annual review of physiology*. 2000;**62**:111-33.
168. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling -an overview. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;**12**(1):3-10.

169. Derler I, Jardin I, Romanin C. Molecular mechanisms of STIM/Orai communication. *American journal of physiology Cell physiology*. 2016;**310**(8):C643-62.
170. Rebolledo A, Speroni F, Raingo J, Salemme SV, Tanzi F, Munin V, et al. The Na⁺/Ca²⁺ exchanger is active and working in the reverse mode in human umbilical artery smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;**339**(3):840-5.
171. Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;**13**(9):549-65.
172. Roldan Palomo AR, Martin P, Rebolledo A, Enrique N, Flores LE, Milesi V. Human umbilical artery smooth muscle exhibits a 2-APB-sensitive capacitative contractile response evoked by vasoactive substances and expresses mRNAs for STIM, Orai and TRPC channels. *Biocell : official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al*. 2012;**36**(2):73-81.
173. Morgado M, Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;**69**(2):247-66.
174. Clyman RI, Sandler JA, Manganiello VC, Vaughan M. Guanosine 3',5'-monophosphate and adenosine 3',5'-monophosphate content of human umbilical artery. *The Journal of clinical investigation*. 1975;**55**(5):1020-5.
175. Lovren F, Triggle C. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *British journal of pharmacology*. 2000;**131**(3):521-9.
176. Bobin P, Belacel-Ouari M, Bedioune I, Zhang L, Leroy J, Leblais V, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Archives of cardiovascular diseases*. 2016;**109**(6-7):431-43.
177. Feiteiro J, Verde I, Cairrao E. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in human vascular smooth muscle cells. *Cellular signalling*. 2016;**28**(3):109-16.
178. Ko EA, Han J, Jung ID, Park WS. Physiological roles of K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2008;**44**(2):65-81.
179. Jackson WF. Potassium channels in the peripheral microcirculation. *Microcirculation*. 2005;**12**(1):113-27.
180. Burg ED, Remillard CV, Yuan JX. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *British journal of pharmacology*. 2008;**153** Suppl 1:S99-S111.
181. Jackson WF. Potassium Channels and Regulation of the Microcirculation. *Microcirculation*. 1998;**5**(2-3):85-90.
182. Brayden JE. Potassium Channels in Vascular Smooth Muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 1996;**23**(12):1069-76.
183. Khalil DASaRA. Estrogenic Compounds, Estrogen Receptors and Vascular Cell Signaling in the Aging Blood Vessels.pdf>. *Curr Med Chem*. 2009;**16**(15):1863-87.
184. 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.
185. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2004;**286**(2):R233-49.

186. Miller VM. Sex-based differences in vascular function. *Women's health*. 2010;**6**(5):737-52.
187. Mariana M, Feiteiro J, Cairrao E, Verde I. Mifepristone is a Vasodilator Due to the Inhibition of Smooth Muscle Cells L-Type Ca²⁺ Channels. *Reproductive sciences*. 2016;**23**(6):723-30.
188. Crews JK, Khalil RA. Antagonistic Effects of 17 β -Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Ca²⁺ Entry Mechanisms of Coronary Vasoconstriction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999;**19**(4):1034-40.
189. Okabe K, Inoue Y, Soeda H. Estradiol inhibits Ca²⁺ and K⁺ channels in smooth muscle cells from pregnant rat myometrium. *European journal of pharmacology*. 1999;**376**(1-2):101-8.
190. De Wet H, Allen M, Holmes C, Stobbart M, Lippiat JD, Callaghan R. Modulation of the BK channel by estrogens: examination at single channel level. *Molecular membrane biology*. 2006;**23**(5):420-9.
191. Cairrao E, Santos-Silva AJ, Verde I. PKG is involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *European journal of pharmacology*. 2010;**640**(1-3):94-101.
192. Deenadayalu V, Puttabyatappa Y, Liu AT, Stallone JN, White RE. Testosterone-induced relaxation of coronary arteries: activation of BKCa channels via the cGMP-dependent protein kinase. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2012;**302**(1):H115-23.
193. Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. The Effects of Sex Steroids on Human Umbilical Artery and Vein. *Reproductive sciences*. 1999;**6**(1):27-31.
194. Silva de Sá MF, Meirelles RS. Vasodilating Effect of Estrogen on the Human Umbilical Artery. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 1977;**8**(5-6):307-13.
195. Jabbar A, Pingitore A, Pearce SH, Zaman A, Iervasi G, Razvi S. Thyroid hormones and cardiovascular disease. *Nature reviews Cardiology*. 2017;**14**(1):39-55.
196. Barreto-Chaves ML, de Souza Monteiro P, Furstenau CR. Acute actions of thyroid hormone on blood vessel biochemistry and physiology. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2011;**18**(5):300-3.
197. Tian L, Ni J, Guo T, Liu J, Dang Y, Guo Q, et al. TSH stimulates the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Endocrine*. 2014;**46**(3):651-8.
198. Makino A, Wang H, Scott BT, Yuan JX, Dillmann WH. Thyroid hormone receptor-alpha and vascular function. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;**302**(9):C1346-52.
199. Grais IM, Sowers JR. Thyroid and the heart. *The American journal of medicine*. 2014;**127**(8):691-8.
200. Kasahara T, Tsunekawa K, Seki K, Mori M, Murakami M. Regulation of iodothyronine deiodinase and roles of thyroid hormones in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2006;**186**(1):207-14.
201. Ojamaa K, Klemperer JD, Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1996;**6**(5):505-12.

202. Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Carvalho MH, Tostes RC, Laurindo FR, et al. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovascular research*. 2010;**85**(3):560-70.
203. McAllister RM, Grossenburg VD, Delp MD, Laughlin MH. Effects of hyperthyroidism on vascular contractile and relaxation responses. *The American journal of physiology*. 1998;**274**(5 Pt 1):E946-53.
204. Napoli R, Biondi B, Guardasole V, Matarazzo M, Pardo F, Angelini V, et al. Impact of Hyperthyroidism and Its Correction on Vascular Reactivity in Humans. *Circulation*. 2001;**104**(25):3076-80.
205. Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, et al. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;**103**(38):14104-9.
206. Kuzman JA, Gerdes AM, Kobayashi S, Liang Q. Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2005;**39**(5):841-4.
207. Napoli R, Apuzzi V, Bosso G, D'Anna C, De Sena A, Pirozzi C, et al. Recombinant human thyrotropin enhances endothelial-mediated vasodilation of conduit arteries. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;**94**(3):1012-6.
208. Zwaveling J, Pfaffendorf M, Zwieter PA. The direct effects of thyroid hormones on rat mesenteric resistance arteries. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. 1997;**11**(1):41-6.
209. Cai Y, Manio MM, Leung GP, Xu A, Tang EH, Vanhoutte PM. Thyroid hormone affects both endothelial and vascular smooth muscle cells in rat arteries. *European journal of pharmacology*. 2015;**747**:18-28.
210. Danzi S, Klein I. Thyroid disease and the cardiovascular system. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2014;**43**(2):517-28.
211. Mizuma H, Murakami M, Mori M. Thyroid Hormone Activation in Human Vascular Smooth Muscle Cells : Expression of Type II Iodothyronine Deiodinase. *Circulation research*. 2001;**88**(3):313-8.
212. Jimenez-Diaz I, Molina-Molina JM, Zafra-Gomez A, Ballesteros O, Navalon A, Real M, et al. Simultaneous determination of the UV-filters benzyl salicylate, phenyl salicylate, octyl salicylate, homosalate, 3-(4-methylbenzylidene) camphor and 3-benzylidene camphor in human placental tissue by LC-MS/MS. Assessment of their in vitro endocrine activity. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2013;**936**:80-7.
213. Terron JA, Falcon-Neri A. Pharmacological evidence for the 5-HT₇ receptor mediating smooth muscle relaxation in canine cerebral arteries. *British journal of pharmacology*. 1999;**127**(3):609-16.
214. Schneider A, Riess P, Elbers A, Neugebauer E, Schaefer U. Polyclonal anti-histamine H₂ receptor antibodies detect differential expression of H₂ receptor protein in primary vascular cell types. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2004;**53**(6):223-9.
215. Saldanha PA, Cairrao E, Maia CJ, Verde I. Long- and short-term effects of androgens in human umbilical artery smooth muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2013;**40**(3):181-9.