



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Toxicidade Reprodutiva em Compostos Cosméticos

**Potencial toxicidade do Octocrileno segundo o teste de
Maturação *In Vitro* de Oócitos de Bovino**

Patrícia Cordeiro Pires de Figueiredo Gomes Crisóstomo Ruivo

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

Orientador: Prof.^a Doutora Ana Palmeira de Oliveira
Co-orientador: Prof. Doutor José Martinez de Oliveira

Covilhã, Outubro de 2014

Dedicatória

A todos os que permitiram a realização deste trabalho.

Agradecimentos

Felizmente, o caminho percorrido nos últimos anos não foi de todo solitário, tendo sido várias as pessoas que, de uma maneira ou de outra, demonstraram o seu carinho, amizade e sabedoria, ajudando-me a superar todos os obstáculos e a tornar possível estar hoje a escrever esta dissertação, fruto desse trabalho em equipa. Não posso, por isso, deixar de registar o meu profundo obrigado a todas elas.

Agradeço, em primeiro lugar, à Professora Doutora Ana Palmeira de Oliveira, minha orientadora, pela forma como através do seu conhecimento me fez evoluir, pelo seu dinamismo, por me ter ajudado a estar sempre motivada, por acreditar em mim, pela paciência, simpatia, receptividade, pelo carinho e, sobretudo, pela amizade.

Agradeço também ao Professor Doutor José Martinez de Oliveira, meu co-orientador, pelas suas ideias e conselhos, por toda a sabedoria transmitida, pela calma e tranquilidade que me proporcionou para que eu conseguisse realizar este trabalho.

Este trabalho também não teria evoluído sem a colaboração com a Oviger, matadouro de Alcains. Agradeço à sua direcção por me ter permitido a aquisição de amostras, essenciais para a realização do trabalho, e a todos os colaboradores, em especial à Engenheira Sofia pela total disponibilidade e simpatia que sempre demonstraram.

Ao Centro Hospitalar Cova da Beira, Conselho de Administração, Departamento de Saúde da Criança e da Mulher e Unidade de Medicina da Reprodução, onde trabalho, por terem apoiado a minha decisão de ingressar no Mestrado e me terem sempre proporcionado todas as condições para o concluir.

Aos meus amigos da Faculdade de Ciências da Saúde, à Rita Palmeira de Oliveira, ao Carlos, à Rita Machado e à Catarina por estarem sempre disponíveis para me ajudar mesmo quando estavam com tempo limitado. Agradeço-vos sinceramente a forma como me acolheram.

Aos meus colegas da Unidade de Medicina da Reprodução por toda a paciência e carinho, pelas palavras de força quando eu achava que era melhor desistir.

À Dr.^a Catarina Ferreira pelo que me ensinou e às técnicas do Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), Margarida Carrilho, Dr.^a Sofia Duarte, Dr.^a Maria João pela a disponibilidade e ajuda que sempre me deram.

A todos os meus amigos fora do âmbito profissional que, aqui perto ou à distância me deram todo o apoio e coragem que precisava.

À minha família. Aos meus pais, à minha irmã e aos meus cunhados pelas vezes que não puderam contar comigo, por tudo o que fizeram para eu poder dedicar-me ao projecto. Em especial à minha mãe, pelo apoio e carinho e por todas as vezes que ficou com a minha filha para eu poder trabalhar.

À minha filha, Madalena, pela alegria contagiante que impede qualquer um de estar mal humorado.

Por fim, a ti, Gonçalo, seria impossível ter sequer iniciado este percurso se não fosse o teu apoio, a tua capacidade de me tranquilizar, de me ouvir, de me aconselhar, de me motivar. Por toda a compreensão e paciência. Obrigado!!

Resumo

A implementação de novas legislações com vista a regulamentar a introdução de novos compostos nos produtos para consumo como os desenvolvidos na indústria cosmética, introduziu a necessidade de se desenvolverem testes *in vitro* que substituíssem os clássicos testes *in vivo* de modo a ser possível aumentar o número de testes toxicológicos e, ao mesmo tempo, diminuir o uso de animais em laboratório. Pretende-se construir uma base de dados acerca dos compostos usados o mais detalhadamente possível, de modo a maximizar a segurança dos mesmos, abrangendo testes nas mais diferentes áreas da toxicologia. Neste âmbito, surge em 2004 o projecto ReProTect que pretende desenvolver métodos alternativos para o estudo da toxicidade reprodutiva. A complexidade do ciclo reprodutivo torna necessário dividir o seu estudo em partes, desenvolvendo diversos testes alternativos com *endpoints* diferentes. Nos últimos anos tem-se colocado em questão a segurança imputada aos diferentes filtros UV presentes nos protectores solares. O octocrileno é um filtro UV relativamente recente sendo a informação disponível acerca deste composto, em mamíferos, muito escassa. O presente trabalho tem como principal objectivo testar o potencial tóxico desta substância utilizando para isso um dos testes desenvolvidos durante o projecto ReProTect. O teste de maturação *in vitro* de oócitos de bovino (bIVM) permite analisar a influência que o octocrileno pode ter durante o processo de maturação dos oócitos nomeadamente na conclusão do processo de meiose. O *endpoint* deste teste reflecte a concentração de composto a partir da qual 50% dos oócitos são inibidos de concluir a meiose (EC_{50}) sendo os resultados apresentados em percentagem de oócitos em MII. Foram testadas cinco concentrações de octocrileno entre 0,195 μ M-1,560 μ M. Os resultados obtidos demonstram uma tendência decrescente de oócitos em MII à medida que se aumenta a concentração. Apesar de se observar valores de percentagem de MII inferiores a 50% (valor mínimo obtido:37%), a determinação do valor de EC_{50} do octocrileno não pôde ser confirmada devido ao reduzido valor de amostragem. O facto de não existir informações prévias acerca da potencial toxicidade reprodutiva do octocrileno faz com que se considere que este trabalho representa um importante contributo na medida em que se identifica a gama onde provavelmente se situa o valor de EC_{50} do octocrileno valor que, a confirmar-se, encontra-se abaixo dos 50 μ M definidos como concentração de EC_{50} , abaixo da qual todos os compostos são considerados como positivos no que se refere ao estudo da toxicidade reprodutiva.

Palavras-chave

Testes alternativos *in vitro*; ReProTect; Toxicidade Reprodutiva; bIVM; Oócitos de bovino, Octocrileno; EC_{50} .

Abstract

The implementation of new legislation to regulate the introduction of new compounds in consumer products such as those developed in the cosmetics industry, has introduced a need to develop *in vitro* assays that replace the *in vivo* tests traditionally used in order to be able to increase the number of toxicological test at the same time that reducing the use of laboratory animals. It's intended to build a database on the compounds used in as much detail as possible in order to maximize data security, comprising testing in different areas of toxicology. In this context, in 2004 was developed the ReProTect project that aims to develop alternative approaches to the study of reproductive toxicity methods. The complexity of the reproductive cycle does not allow the study of their sensitivity to potentially toxic compounds in a global manner, it is necessary divide into parts, and develop several alternative tests with different endpoints. In the last years, several publications had questioned the imputed safety of UV filters present in sunscreens. Octocrylene is a relatively new UV filter witch have very few data reported. There is no information about, among the others, his potential reproductive toxicity. This study aims to test the potential toxicity of this substance using one of the tests developed during the ReProTect project. The *in vitro* maturation of bovine oocytes test (bIVM) allows to analyze the influence that the octocrylene may have during the process of oocyte maturation particularly at the conclusion of the process of meiosis. The endpoint of the test compound reflects the concentration from which 50% of the oocytes are inhibited from completing meiosis (EC₅₀). The results are presented in % of oocytes that concluded meiosis. Five concentrations of octocrylene between the range of 0,195µM-1,560µM were incorporated during *in vitro* maturation of bovine oocytes were. The results were observed in visible inverted microscope (400x) and fluorescence (400x). The results showed a downward trend in the % of MII oocytes as the concentration increased. It was possible to observe values under the EC₅₀. A minimum of 37% of MII oocytes was reached. Despite that, the determination of the EC₅₀ value of octocrylene could not be confirmed. It is necessary a larger sample and a greater number of replicates to do it. This study can be an important contribution doing an initial screening of octocrylene concentrations, identifying the possible range of the EC₅₀ value. This takes more importance if we consider that for EC₅₀ under 50µM, the compounds are considered positive to toxicity reproduction. The values tested in this study are far below of 50µM.

Keywords

In vitro alternative tests; ReProTect; Reproductive Toxicity; bIVM; bovine oocytes; Octocrylene; EC₅₀.

Índice

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE	XI
INTRODUÇÃO.....	1
TOXICIDADE REPRODUTIVA	3
A TOXICIDADE PRÉ-IMPLANTATÓRIA.....	6
IMPORTÂNCIA DOS TESTES DE TOXICIDADE REPRODUTIVA NA INDÚSTRIA COSMÉTICA....	11
O OCTOCRILENO: EXEMPLO DE FOTOPROTECTOR DE RISCO TOXICOLÓGICO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS	17
TESTE DE MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS DE BOVINO	17
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL COM AZUL TRIPANO.....	22
TESTE DE PERMEABILIDADE.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OÓCITOS DE BOVINO - AVALIAÇÃO	25
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GERAL COM AZUL TRIPANO.....	30
TESTE DE PERMEABILIDADE.....	33
CONCLUSÃO	34
LIMITAÇÕES CONCEPTUAIS E OPERACIONAIS.....	35
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Lista de Figuras

- Figura 1 Relação entre os diferentes modelos de teste desenvolvidos segundo cada fase do ciclo reprodutivo.
- Figura 2 Abordagem modular da aplicação dos princípios da ECVAM para a validação de testes alternativos.
- Figura 3 Estrutura e fórmula química do Octocrileno.
- Figura 4 Representação esquemática dos principais passos do procedimento de maturação *in vitro* de oócitos de bovino.
- Figura 5 Representação dos diferentes elementos que compõe as células de *Franz*.
- Figura 6 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de DMSO (controlo negativo), durante as observações com e sem fluorescência.
- Figura 7 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Ciclohexamida (controlo positivo), durante as observações com e sem fluorescência.
- Figura 8 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste) durante a primeira observação, sem fluorescência.
- Figura 9 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste) durante a segunda observação, com fluorescência.
- Figura 10 Comparação de resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste), com e sem fluorescência.
- Figura 11 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos viáveis para os controlos positivo e negativo.
- Figura 12 Resultados obtidos para a percentagem de oócitos viáveis para as diferentes concentrações de octocrileno.

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Principais propriedades do Octocrileno.
- Tabela 2 Classificação do estadio nuclear de oócitos maturados *in vitro* durante 24h.
- Tabela 3 Apresentação dos valores que representam a relevância estatística da perda de oócitos entre as duas observações efectuadas.

Lista de Acrónimos

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
bIVM	<i>Bovine In Vitro Maturation,</i>
bIVP	<i>Bovine In Vitro Production,</i>
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
COCs	Complexos <i>Cumulus</i> -corona-oócito
EURL-ECVAM	<i>European Union Reference Laboratory - European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
CP	Corpúsculo Polar
DB-ALM	DataBase - Alternative Methods
EC50	<i>Median Effective Concentration</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ESF	<i>European Science Foundation</i>
FPS	Factor de Protecção Solar
FP6-UE	<i>6th Framework Program of European Union</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GVBD	<i>Germinal Vesicle BreackDown</i>
H-SOF	<i>Hepes-buffered Synthetic Oviductal Fluid</i>
ICATM	<i>International Cooperation on Alternative Test Methods</i>
ICCR	<i>International Cooperation on Cosmetic Regulation</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
MEA	<i>Mouse Embryo Assay</i>

mFBA	<i>Follicle Culture Bioassay</i>
MI	Metafase I
MII	Metafase II
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
PARERE	<i>Preliminary Assesment of Regulatory Relevance</i>
PFA	Paraformaldeído
PVA	Álcool Polivinílico
REACH	<i>Registration and Authorization of Chemicals</i>
RP-HPLC	<i>Reversed-phase - High Performance Liquid Chromatography</i>
SCCNFP	<i>Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers</i>
SCCS	<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>
SEURAT	<i>Safety Ultimately Replacing Animal Testing</i>
UBI	Universidade da Beira Interior
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
VG	Vesícula Germinativa
WEC	<i>Whole Embryo Culture</i>
ZEBET	<i>Centre for Documentation and Evaluation of Alternatives to Animal Experiments</i>

Introdução

O ciclo reprodutivo é constituído por diversos órgãos e tecidos que desempenham um complexo conjunto de processos e mecanismos de elevada importância, tanto para a obtenção de gâmetas funcionais e fertilizáveis, como para o desenvolvimento normal do ser humano ao longo da vida. A complexidade deste ciclo é tão elevada como a sua sensibilidade a alterações do meio em que se desenvolve, podendo essas alterações culminar em malformações de elevada gravidade ou mesmo morte. A necessidade de proteger o ser humano contra agentes agressivos que destabilizam o normal funcionamento do ciclo reprodutivo, fez com que, durante décadas decorressem estudos toxicológicos nas mais diversas áreas de modo a compreender o mecanismo de acção das diferentes moléculas que compõe o ambiente e os produtos consumidos pelo Homem [1].

A evidenciação do potencial tóxico de um produto ou composto químico, bem como a demonstração do seu mecanismo de toxicidade requer a execução de uma bateria de testes toxicológicos que incluem ensaios *in vitro* e ensaios em animais [2]. Um relatório publicado em 2005 evidenciou o recurso ao uso de elevado número de animais para efeitos de investigação, na Europa, apontando para valores que rondariam os 10,7 milhões, dos quais cerca de 10% terão sido utilizados em estudos toxicológicos e de avaliação de risco [3,4].

A publicação de uma nova legislação pela União Europeia para o registo e autorização de uso de químicos com o objectivo de assegurar um elevado nível de protecção da saúde humana e do ambiente (REACH - *Registration and authorization of Chemicals*) viria a ter como consequência um aumento dramático do número de animais sacrificados em investigação cujo único objectivo seria a análise e detecção de efeitos potencialmente tóxicos dos diferentes químicos [5,6]. Por outro lado, a União Europeia pretendia que o uso de animais fosse visto como último recurso, sendo por isso necessário o desenvolvimento e validação de métodos alternativos [7,8]. Estes esforços foram realizados com o intuito de encontrar e validar métodos alternativos de modo a não só corresponder ao princípio dos 3Rs [9] mas também aumentar a segurança do consumo humano de produtos constituídos por substâncias cujo mecanismo de acção e riscos de utilização sejam parcamente conhecidos [10,11]. Efectivamente o princípio dos 3Rs - *Reduce, Replacement, Refinement* - foi desenvolvido por Russel e Burch, em 1959, na sua obra "*The Principles of Humane Experimental Technique*" e tem por objectivo principal a redução do número de animais utilizados em experiências, bem como o *stress* infligido nos mesmos. O termo genérico "*Replacement*" engloba as medidas que levam à substituição destes animais utilizando métodos alternativos como culturas celulares ou simuladores [12,13]. A palavra "*Refinement*" refere-se às abordagens experimentais com vista a minimizar o sofrimento dos animais de laboratório e, por fim, o termo "*Reduction*" baseia-se na redução do número de animais utilizados através de optimizações estatísticas e experiências bem desenhadas [14]. Por exemplo, a realização de testes sequenciais com

amostras de menor dimensão permite reduzir o número de animais utilizados na medida em que vão sendo feitas optimizações ao longo da experiência não sendo necessário sujeitar logo desde início amostras de grandes dimensões a uma só dose [15].

Instituições internacionais de apoio à investigação, nomeadamente a ESF - *European Science Foundation*, a ZEBET (*Centre for documentation and evaluation of alternatives to animal experiments*) ou a ECVAM (*European Centre for the validation of Alternative Methods*), assumiram como prioritário o princípio dos 3Rs na validação de métodos alternativos ao uso de animais. As associações industriais e a Comissão Europeia, adoptaram em 2005 este princípio, de modo a promover o desenvolvimento e implementação dos métodos alternativos e estabelecer parcerias de cooperação [3]. A estratégia SEURAT (*Safety Ultimately Replacing Animal Testing*) constituída pela União Europeia FP7 e a *Safe Cosmetics* em 2009, converge este desejo comum, apoiando a investigação, através de um fundo de 50 milhões de euros disponíveis para apoiar projectos cujo principal objectivo incide em cobrir áreas em que o conhecimento científico ainda esteja por desenvolver e, ao mesmo tempo, acelerar o desenvolvimento de métodos alternativos [16]. Também neste sentido a regulamentação Europeia REACH juntamente com a 7ª emenda da directiva dos cosméticos regulamentaram o uso de métodos alternativos como obrigatório a partir de Março de 2013, reduzindo brutalmente o número de animais utilizados em testes de segurança destes produtos [17 - 19] Segundo o último relatório da União europeia, em 2009, ano em que foi proibida a utilização de animais em laboratório (11 de Março de 2009) foram utilizados cerca de 344 animais em ensaios relacionados com a segurança dos ingredientes cosméticos entre Janeiro e Março, tendo-se verificando-se nos anos anteriores em que não existia tal proibição um valor global anual de 1818 animais em 2007 e 1510 em 2008 [1].

Toxicidade Reprodutiva

A toxicidade reprodutiva descreve um conjunto de efeitos adversos induzidos por um químico na reprodução dos mamíferos. No seu estudo, todas as fases do ciclo reprodutivo são abrangidas incluindo alterações nas funções reprodutivas femininas e masculinas bem como a indução de efeitos adversos não hereditários na descendência, nomeadamente, morte, atraso de crescimento, efeitos estruturais e funcionais [20]. Deste modo, a toxicidade reprodutiva refere-se a uma grande variedade de efeitos adversos que podem ocorrer em diferentes fases do ciclo reprodutivo como consequência de uma ou mais exposições a uma substância potencialmente tóxica, incluindo efeitos na fertilidade, comportamento sexual, implantação embrionária, desenvolvimento embrionário, adaptação pós-natal e subsequente crescimento e desenvolvimento da maturidade sexual. O desenvolvimento embrionário/fetal é considerado um dos passos mais críticos entre todos os passos do ciclo reprodutivo [21]. A complexidade da reprodução nos mamíferos requer estratégias de testes integrados que permitam preencher todas as necessidades para a identificação do perigo e avaliação de risco [22].

Em 2004 foi criado o projecto ReProTect, tutelado pelo programa FP6 da União Europeia (*6th Framework Programme of European Union*), o qual inclui 33 parceiros com experiência complementar na área da toxicidade reprodutiva, e cujo objetivo é avaliação de efeitos adversos em células-alvo ou mecanismos que influenciam e conduzem a um efeito tóxico ao nível reprodutor. O projecto foi subdividido em diferentes áreas de investigação de forma a abordar a complexidade geral do ciclo reprodutivo (Figura 1) [23 - 25].

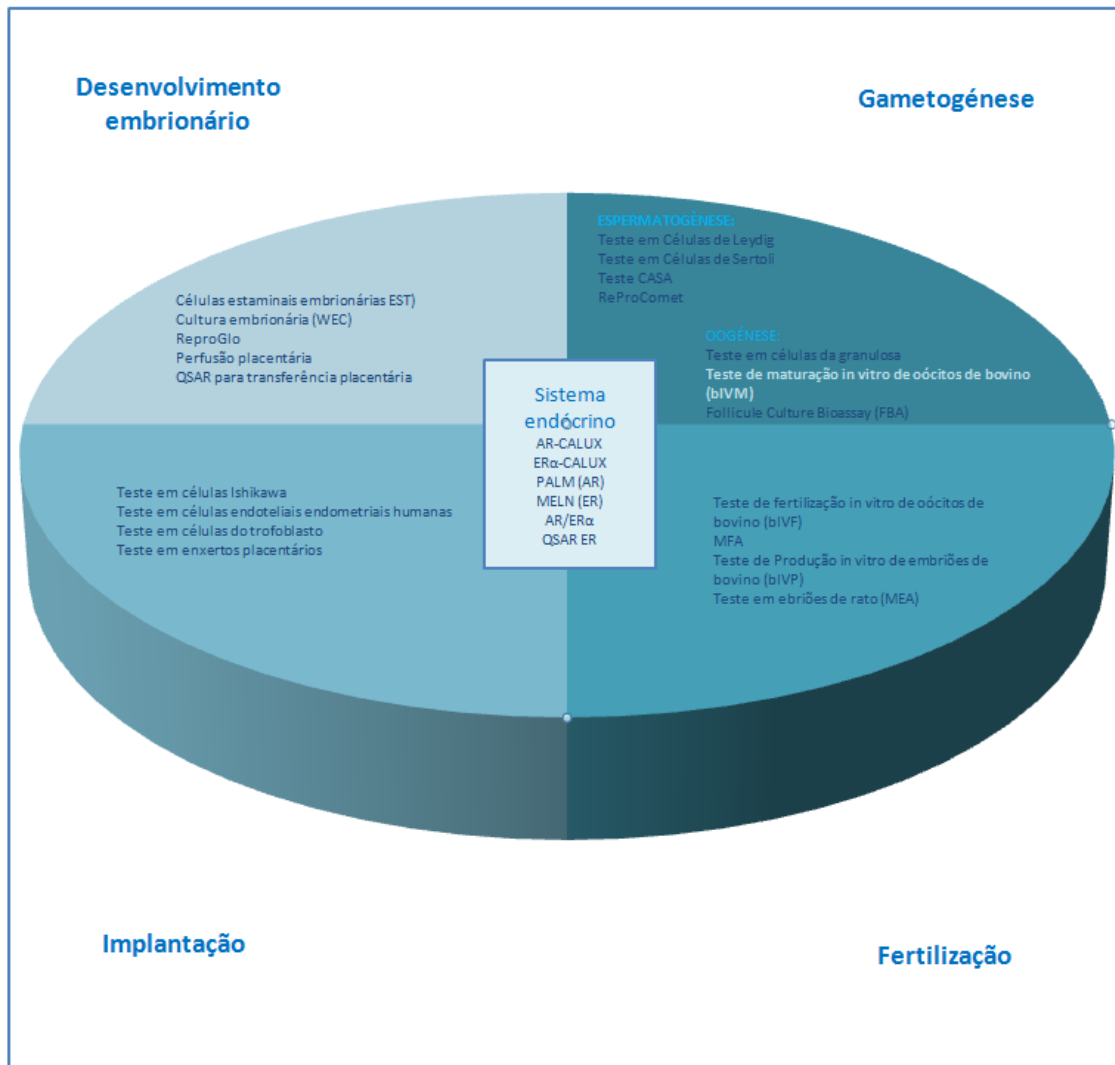


Figura 1. Relação entre os diferentes modelos de teste desenvolvidos segundo cada fase do ciclo reprodutivo . (Adaptado a partir de Schwartz, 2009 [24])

O projecto ReProTect foi o primeiro de uma série de projectos integrados, fundados pela UE, que incluem outros projectos como por exemplo, AcuTox (www.acutetox.eu), Sens-it-tiv (www.sens-it-tiv.eu) e Carcinogenomics (www.carcinogenomics.eu) com o intuito de desenvolver testes *in vitro* para os vários *endpoints* da saúde humana [26].

Neste projecto foram abordados diferentes modelos *in vitro* para o estudo de vários alvos toxicológicos tal como a gametogéese, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário e ainda, os efeitos secundários induzidos pelo produto teste no sistema hormonal. Alguns modelos demonstraram possuir um poder preditivo com relevância suficiente para serem convertidos em testes de segurança toxicológica. Neste sentido, o projecto foi conduzido de modo a resultarem testes que poderiam ser submetidos ao ECVAM,

estando preparados para entrar formalmente no processo de validação por esta entidade [20,27]

Apesar dos esforços realizados para encontrar testes alternativos, da vasta lista de testes propostos, a maioria encontra-se ainda em fases anteriores à sua validação. Existem várias razões para o difícil e lento avanço na implementação de métodos alternativos para a toxicidade reprodutiva que incluem o tempo médio de desenvolvimento e investigação, a falta de compreensão do modo de acção no sistema reprodutivo dos compostos potencialmente tóxicos e ainda, o elevado número de mecanismos fisiológicos envolvidos na reprodução dos mamíferos [22]. De facto, é globalmente considerado que modelos *in vitro* usados isoladamente são redutores, não englobando todos os aspectos do ciclo reprodutivo [28]. Por outro lado, cada modelo *in vitro* mimetiza uma parte do ciclo reprodutivo, pelo que se considera que só reunindo um conjunto de testes *in vitro* bem desenhados e validados se possa substituir uma proporção substancial dos testes realizados *in vivo* [21].

Existem ainda outras limitações que contribuem também para a dificuldade em concretizar a substituição total dos testes *in vivo* como por exemplo o facto da maioria dos métodos *in vitro* não considerar os vários aspectos ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) que por sua vez têm um impacto tremendo no perfil toxicológico da substância. Para além disso, a distinção entre toxicidade geral e os efeitos específicos no desenvolvimento, é difícil avaliar mesmo recorrendo a estudos *in vitro* complexos. De forma geral, a influência do organismo materno, incluindo a toxicidade materna não é tomada em conta por estes estudos. Finalmente, podem ocorrer dificuldades técnicas tendo em conta a baixa solubilidade em água de vários compostos testados, facto que tem de ser considerado no desenho de cada experiência *in vitro* individualmente.[21,22]

Tendo em conta todas estas dificuldades e o conhecimento actual prevê-se que a completa substituição de estudos recorrendo ao sacrifício de animais para estudos de toxicidade reprodutiva provavelmente, não ocorra num tempo útil menor que 10 anos [29].

No entanto, os métodos alternativos estão já a ser utilizados como ferramentas úteis para triagem e rastreio. Além disso, estes métodos podem ter uma importante contribuição na compreensão da mecânica da toxicidade reprodutiva, contribuindo com informação mais específica na interferência do composto em teste com o *endpoint* definido no estudo. O desafio é construir nestas vantagens um conjunto de testes que unidos definem uma estratégia de sucesso apresentada como alternativa aos actuais testes *in vivo*, nos quais os *endpoints* mais sensíveis são combinados com uma selecção de experiências bem construídas com informação correcta. Aplicar tal estratégia pode evitar os testes *in vivo* de muitos compostos potencialmente tóxicos e, desta forma otimizar e reduzir consideravelmente os testes de toxicidade reprodutiva em animais [30]. A existência de bases de dados nas quais se encontra reunida informação toxicológica proveniente de investigações standardizadas parece

ser prometedora. Estas bases de dados irão permitir a identificação de alvos do ciclo reprodutivo sensíveis a compostos potencialmente tóxicos bem como o estabelecimento de *endpoints* e a identificação de falhas de informação, de modo a concentrar esforços para a sua supressão [20,27].

A organização para a cooperação e desenvolvimento económico (OCDE) tem vindo a produzir linhas de orientação para testes altamente standardizados e internacionalmente homogéneos, de modo a serem usados para a avaliação toxicológica de diferentes produtos, incluindo químicos industriais, agroquímicos e cosméticos. Adicionalmente, foi recentemente preparado um documento guia para os testes e avaliação da toxicidade reprodutiva em mamíferos [31].

Actualmente, muito embora a já referida legislação para cosméticos, a avaliação da toxicidade reprodutiva nestes produtos rege-se pelas linhas de orientação da OCDE 415 [32] e 416 [33] que se referem a testes *in vivo*, existindo ainda outras relacionadas com o desenvolvimento (OCDE TG 414, 421, 422)[34-36]. No entanto, todos os esforços vão no sentido de validar a bateria de ensaios alternativos em proposta indo de encontro à legislação e à orientação mundial de redução do número de animais utilizados em testes toxicológicos.

Um resumo de todos os testes alternativos para a avaliação da toxicidade reprodutiva pode ser encontrado na publicação de Adler *et al* (2011) com referência à fase do ciclo reprodutivo que o teste inclui, a sua área de aplicação, a sua relação com os testes *in vivo*, o tempo estimado para entrar em processo de pré-validação bem como o seu estado actual (consideram-se 5 níveis no desenvolvimento de um teste: investigação e desenvolvimento, optimização, pré-validação, validação, aceitação e regulamentação) [21].

A TOXICIDADE PRÉ-IMPLANTATÓRIA

A fase pré-implantatória caracteriza-se pelo conjunto de processos que ocorrem antes de um embrião se implantar no útero materno, distinguido-se duas subfases principais: gametogénese e fertilização. A fertilização engloba todo o processo que permite que um oócito seja fertilizado por um espermatozóide bem como o desenvolvimento inicial embrionário até que chegue ao útero e se implante no endométrio. A gametogénese, por sua vez, refere-se aos processos biológicos desde a fase pré-natal durante a qual as células estaminais embrionárias se diferenciam e formam gâmetas femininos e masculinos imaturos, bem como os processos de maturação dos mesmos que ocorre já após o nascimento, puberdade e fase adulta [37].

Nos mamíferos, oócitos de pequenas dimensões crescem e atingem o seu tamanho final no ovário onde maturam e se preparam para ser fertilizados. O processo de maturação do oócito é um evento crítico para o potencial desenvolvimento de um embrião [38].

O ovário, nos mamíferos, é o órgão responsável pela produção de oócitos maduros e pela produção de hormonas que permitem o desenvolvimento de características sexuais secundárias e a possibilidade de uma gravidez a termo. O folículo ovárico contém um único oócito rodeado por múltiplas camadas de diferentes tipos de células somáticas [39]. O folículo providencia nutrientes e sinais regulatórios necessários para o crescimento e maturação do oócito. Os folículos começam a crescer durante a vida pós-natal e continuam o seu crescimento até à menopausa. Por sua vez, a oogénese ocorre ainda durante a vida fetal e o número de oócitos presente no ovário não é renovável, mantendo-se em forma latente durante muitos meses ou até anos [40].

A fase de latência termina após estimulação hormonal que promove o desenvolvimento folicular. De modo a que este processo ocorra são accionados vários e complexos mecanismos sendo a competência de desenvolvimento e a maturação oocitária processos extremamente importantes para o normal desenvolvimento embrionário [37].

A **competência de desenvolvimento** é a capacidade do oócito produzir uma descendência normal, viável e fértil após a fertilização. Os passos finais da maturação do oócito são cruciais para a aquisição de propriedades funcionais necessárias para o posterior desenvolvimento, como é o caso das alterações observadas na cromatina das vesículas germinativas ou da interacção existente através das junções comunicantes e a própria relação entre o oócito e as células do *cumulus* [41-43]. Esta competência é adquirida de forma gradual durante o desenvolvimento folicular, podendo ser perturbada por vários factores externos. A competência do desenvolvimento é normalmente expressa como a percentagem de oócitos que podem desenvolver-se até blastocisto (após fertilização), no entanto, tal não garante que o embrião se desenvolva a termo [44]. Outros aspectos comumente usados para avaliar esta competência incluem avaliações morfológicas como o número de blastómeros ou a razão entre a massa celular interna e o número de células da trofoectoderme. Avaliações funcionais como a taxa metabólica ou a capacidade de recuperação após congelamento deverão também ser consideradas de forma a fornecer uma ideia mais completa do potencial de desenvolvimento do oócito [37].

Para além da aquisição de competência, também o processo pelo qual o oócito passa de imaturo a maduro é de extrema importância. Este, é um fenómeno complexo durante o qual o oócito passa por várias fases e divisões até chegar à metafase II (maturação nuclear). Durante este processo, a membrana nuclear começa a enrolar, os poros nucleares desaparecem e a membrana nuclear fragmenta antes que rapidamente desapareça, deixando apenas pequenos sacos de dupla parede. Este evento é chamado de quebra da vesícula germinativa (*Germinal*

vesicle Breakdown - GVBD), os nucléolos desaparecem rapidamente após ficarem em contacto com o citoplasma. Depois, mais à frente, os cromossomas condensam, aparecem os cinetocoros e os microtúbulos puxam os cromossomas formando a placa metafásica da meiose I. A separação dos cromossomas homólogos e a migração destes aos respectivos pólos acontece durante a anafase I. Durante a telofase I, os cromossomas que se encontram cada um em seu pólo são rodeados por membrana nuclear. A segunda divisão meiótica sem replicação cromossómica toma lugar imediatamente e o oócito atinge a metafase II. O oócito permanece na metafase II até a fertilização ocorrer, altura em que este completa a meiose. Assim, a maturação nuclear refere-se à progressão do núcleo do oócito desde vesícula germinativa até à metafase II. Tal envolve a quebra da vesícula germinativa, a condensação dos cromossomas, a metafase I, a formação do fuso, a separação dos cromossomas homólogos com extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e latência em metafase II [45].

A maturação do oócito envolve ainda transformações ao nível do citoplasma que prepara a célula para suportar a fertilização e o desenvolvimento inicial embrionário [46]. A maturação citoplasmática descreve tanto as alterações estruturais que tomam lugar no oócito de vesícula germinativa a metafase II como a aquisição de competência de desenvolvimento do oócito. A maturação citoplasmática está associada à capacidade que um oócito maduro (MII) tem para levar a cabo uma fertilização normal, uma clivagem com sucesso e ao desenvolvimento de blastocisto. Outros parâmetros indirectamente relacionados com a maturação do citoplasma incluem a expansão das células do *cumulus*, a extrusão do corpúsculo polar e o aumento do espaço perivitelino [37,45].

Este processo de maturação de oócitos foi utilizado como referência para o desenvolvimento de um procedimento laboratorial, testado no seu potencial de aplicação aos cosméticos no âmbito do projecto ReProTect, que se pretende que venha a constituir uma ferramenta de avaliação da toxicidade reprodutiva pre-implantatória sob a forma de teste *in vitro* alternativo [27]. O teste de Maturação *in vitro* (bIVM), usa como modelo os oócitos de bovino, analisando e monitorizando o efeito de um determinado composto durante a maturação dos oócitos *in vitro* [47]. O teste rastreia potenciais efeitos adversos no processo de maturação após exposição dos complexos *cumulus*-corona-oócito (COCs) a substâncias-teste, com especial referência a alterações da configuração nuclear no interior do oócito comparado com os oócitos de controlo não expostos à substância [48]. Lazarri *et al.* (2008), no seu trabalho de escrutínio dos valores EC₅₀ de diferentes compostos, realizou testes de maturação *in vitro* de oócitos de bovino e testes de fertilização dos mesmos. No final, comparou a sensibilidade da presença de cada composto no processo de maturação e no de fertilização concluindo que na maioria dos casos, o processo de maturação apresenta maior sensibilidade que a própria fertilização, demonstrando de alguma forma a complexidade do processo de maturação [11]. A toxicidade do composto é avaliada pelo insucesso do processo de maturação do oócito que corresponde à interrupção do processo de meiose (oócito não completa o ciclo até metafase II). A técnica bIVM encontra-se bem documentada na literatura e é aplicada em centros de

reprodução animal assistida [49]. Este teste não necessita que haja sacrifício de animais e não causa *stress* nos mesmos. É baseado no princípio de que a maturação dos oócitos é um passo crucial no ciclo reprodutivo [48]. Tem sido referido que o uso de gâmetas de bovino para estudos toxicológicos *in vitro* pode ter particular interesse e, nalguns aspectos, podem até ser vantajosos em relação a modelos em que utilizam roedores, por se basearem exclusivamente no uso de material biológico recolhido em matadouro, pela semelhança entre diversos aspectos da fisiologia do ciclo reprodutivo bovino e humano e pela maior homologia entre humanos-bovinos que humanos-ratos. A variabilidade e “transferibilidade” entre laboratórios deste teste foi analisada para um conjunto de oito químicos e a análise estatística demonstrou uma boa concordância entre os resultados dos dois laboratórios envolvidos. No entanto foi considerado necessário alargar o número de compostos testados de forma a confirmar a preditividade deste teste pelo que o ensaio se encontra ainda em fase de pré-validação [11,29,48,49,50].

Efectivamente, após o projecto ReProTect, foram realizados inúmeros protocolos e reunidos na biblioteca on-line da própria entidade reguladora (EURL-ECVAM, DB-ALM: *protocols*) com o objectivo de disponibilizar a todos os interessados, nomeadamente à comunidade científica, os procedimentos testados durante esse projecto. Pretende-se desta forma, homogeneizar o modo como estes são reproduzidos de forma a conseguir maior fiabilidade e concordância de resultados inter-laboratórios [20].

O projecto terminou em 2009 e, desde essa altura, têm sido disponibilizados estudos que procuram otimizar o procedimento do bIVM inicial [51]. De entre as modificações mais comuns, encontra-se a substituição do soro por álcool polivinílico (PVA) por este último ser uma macromolécula biologicamente inactiva que facilita o isolamento e a transferência no meio de maturação dos oócitos de bovino, rodeados por células de cúmulus (COCs) [52,53]. O objectivo tem sido essencialmente, remover qualquer efeito de interferência que o soro possa constituir, na avaliação do efeito dos compostos testados, havendo por isso estudos em que a maturação de oócitos é feita sob diferentes condições, incluindo diferentes concentrações de soro e composição do meio [54-56]. Também a duração dos vários passos incluídos no processo da meiose como o tempo de activação da partenogénese, ou a temperatura ideal para o procedimento têm sido objecto de estudo de maneira a otimizar resultados [57,58]

O protocolo referente ao teste bIVM em oócitos de bovino, na DM-ALM, tem o nº129 e foi revisto pela última vez em Março de 2010 [46]. Existem vários grupos de investigação que usam protocolos experimentais semelhantes, havendo alguns que utilizam oócitos de rato em vez de oócitos de bovino [59]. Os oócitos podem ser cultivados com as células do *cumulus* como COCs completos ou estas células podem ser removidas antes da maturação *in vitro*. Outros autores utilizam oócitos de bovino (não utilizando necessariamente o protocolo 129 fornecido pela EURL-ECVAM) para estudar os efeitos dos compostos com outro tipo de

endpoints como o estudo do comportamento de algumas proteínas no meio de maturação, a viabilidade celular ou a expressão génica [60,61].

Embora as entidades reguladoras anseiem por métodos alternativos, o processo de submissão e validação de modelos de teste, na União Europeia, é extremamente rígido. Na Figura 2 encontra-se um esquema representativo dos princípios da ECVAM para a aprovação e validação de um teste alternativo [62]. No que diz respeito especificamente à toxicidade reprodutiva os testes terão de no final permitir a classificação dos compostos em estudo segundo o risco que representam, dividindo-os em três grupos: não-tóxicos, ligeiramente tóxicos e extremamente tóxicos [63].

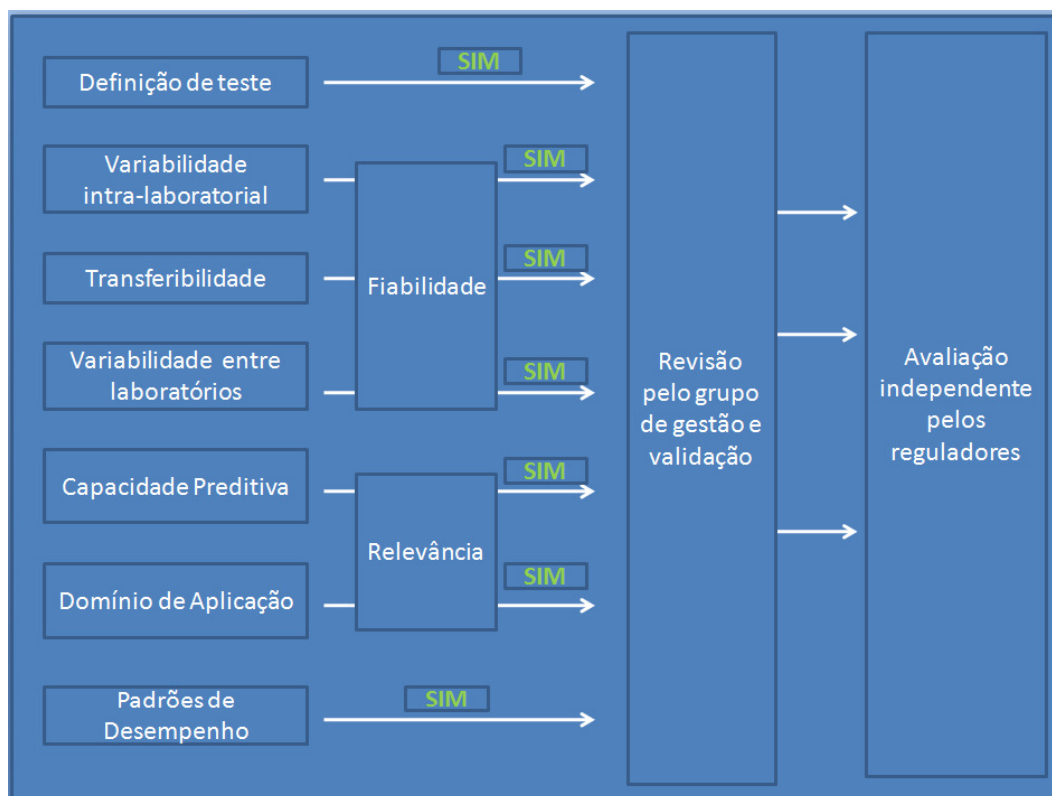


Figura 2 - Abordagem modular da aplicação dos princípios da ECVAM para a validação de testes alternativos. (Adaptado a partir de Hartung (2004)[62])

De acordo com o procedimento definido, o modelo do teste bIVM foi submetido à EURL-ECVAM em 2010 após preparação de resumo do método e submissão deste à rede de reguladores inseridos na EURL-ECVAM (PARERE - *Preliminary Assesment of Regulatory Relevance*) para análise da sua relevância. Alguns reguladores sublinharam o valor do método como componente de um grupo de testes para a avaliação da toxicidade reprodutiva e como importante ferramenta de *screening* de forma a identificar potenciais tóxicos para posterior análise aprofundada. Por outro lado, outros reguladores, consideraram que a posição deste teste no conjunto de testes estratégicos em curso e o seu impacto no princípio dos 3Rs deveria ser clarificada antes de qualquer validação. A curto prazo, foi considerado que este

teste seria útil para fornecer informação adicional acerca do modo de acção sem usar animais mas não como método de redução ou substituição do uso dos mesmos *per se* [20].

Para a avaliação da toxicidade reprodutiva na fase pre-implantatória, foram desenvolvidos diferentes testes como o já referido bIVM [53], o teste em células da granulosa (ainda em fase de desenvolvimento) [64] ou mFBA (*Follicle Culture Bioassay*, ainda em fase de desenvolvimento)[65], tendo-se escolhido para este estudo o bIVM por ser aquele em que a avaliação é feita directamente em oócitos e, ao mesmo tempo, por já se encontrar em fase de pré-validação.

Importância dos testes de toxicidade reprodutiva na indústria cosmética

De acordo com as directrizes gerais de ensaios de toxicidade com recurso a animais adoptadas pela Europa também a indústria cosmética foi incluída neste processo legal de utilização de métodos alternativos *in vitro* e *in silico*. A directiva dos cosméticos 76/768/EEC publicada em 1976, foi sofrendo algumas remodelações sob a forma de emendas ao longo dos anos compiladas e publicadas em 2004 pela COLIPA [17,66]. Mais tarde, em 2009, sob a forma de legislação, é publicada a (EC)1223/2009 dos produtos cosméticos, que surge com o objectivo de reformular a directiva 76/768/ECC, não havendo grandes alterações no que respeita à base de sustentação desta última, mas sim, enfatizando-se alguns aspectos que foram ganhando grande relevância e notificadas sob a forma de emendas ao longo dos 30 anos de aplicação da directiva, nomeadamente no que respeita à garantia de segurança de consumo dos diferentes produtos bem como as responsabilidades de cada agente ao longo de toda a cadeia [18,67,68].

A directiva dos cosméticos prevê o término do uso de animais em experiências para testar produtos cosméticos. A exclusão de determinados testes em animais em produtos cosméticos iniciou-se em Setembro de 2004 e a exclusão de testes de ingredientes ou combinação de ingredientes em Março de 2009 [17].

A partir de Março de 2009 foi também proibida na União Europeia a venda de produtos cosméticos e os seus ingredientes que tenham sido testados em animais, de forma a ir de encontro às exigências da directiva, independentemente da origem destes produtos. Estas regras aplicam-se a todos os testes havendo no entanto atenuantes quando se refere a efeitos na saúde humana mais complexos a serem testados para demonstrar a segurança dos produtos cosméticos (incluindo toxicidade por dose repetida, sensibilidade e carcinogénese da pele, toxicidade reprodutiva e toxicocinética), para os quais foi prolongado o prazo até Março de 2013 [1,20]

A análise de exclusão destes testes até 2013 foi também prevista pela própria directiva que obriga a comissão a estudar e acompanhar o progresso e o cumprimento da implementação dos prazos estabelecidos no que respeita a este assunto, bem como reportar essa análise ao Conselho do Parlamento Europeu. A directiva diz ainda que no caso de até 2013 não terem sido desenvolvidas e validadas alternativas ao uso de animais de laboratório em relação a determinados *endpoints*, tal deve ser reportado às mesmas entidades que, por sua vez, devem realizar e apresentar uma proposta legislativa acerca desse assunto [17,20].

A comissão monitorizou o progresso do desenvolvimento de testes alternativos desde o início, apresentando em 2011 um relatório ao Parlamento Europeu onde concluía que os testes alternativos em relação aos *endpoints* mais sensíveis e já referidos não estariam prontos em Março de 2013 como previsto [1]. No entanto, considera-se que tal representa apenas um atraso, sendo imperativo continuar os esforços para cumprir as normas, directivas ou legislações que promovem o desenvolvimento e validação de testes alternativos. Assim, e consequentemente, torna-se também imperativo para a indústria cosmética reunir esforços e colocar este assunto como prioritário de modo a que a substituição seja feita no mínimo de tempo possível diminuindo também o impacto económico que o incumprimento da directiva pode provocar [21].

A Comissão Europeia não limita os seus esforços à própria Europa, tendo por isso trabalhado activamente com os seus parceiros dos Estados Unidos, Japão e Canadá, na chamada Cooperação Internacional para a regulamentação da cosmética (ICCR - *International Cooperation on Cosmetic Regulation*), formando-se em 2009 a ICATM (*International Cooperation on Alternative Test Methods*) cujo principal objectivo reside na cooperação activa para a validação de alternativas bem como providenciar regularmente relatórios à ICCR [10].

Esta política de segurança dos produtos cosméticos resultou também na passagem da directiva 76/768/EEC a legislação (EC)1223/2009 procurando assegurar maior regulação de entrada de produtos no mercado Europeu [17,18]. O seu objectivo principal é assegurar a máxima segurança para o consumidor, através de uma análise e avaliação de risco mais sustentada. Neste sentido, certos ingredientes como os corantes, os conservantes e os filtros UV, apenas os listados (Anexos IV, VI e VII da directiva) podem ser utilizados, existindo também um grande número de ingredientes proibidos ou de uso restrito (que se encontram nos Anexos II e III da mesma directiva). A inclusão dos anexos foi precedida de uma análise de risco realizada pelo Comité Científico SCCNFP (*Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers*) [21]. De forma a assegurar a segurança dos produtos, é necessário garantir ensaios de qualidade dos produtos comercializados, incluindo o estudo das propriedades intrínsecas de todos os ingredientes constituintes do produto, nomeadamente a avaliação do potencial alergénico ou risco de causar outros danos corporais resultantes do uso continuado do produto, tendo sido realizado pela COLIPA em 2004 um

conjunto de linhas orientativas que assegurem essa segurança e avaliação de risco [19]. Estes ensaios estavam no passado altamente dependentes do uso de animais, estratégia que tem vindo a alterar-se como consequência da estratégia de implementação dos testes alternativos. Na mesma linha, a União Europeia, através do SCCS (*Scientific Committee on Consumer Safety*), publicou em 2012 um guia com objectivos semelhantes ao publicado em 2004 pela COLIPA [69].

Numa estratégia um pouco distinta da Europeia, nos Estados Unidos da América (EUA), os cosméticos são regulados pela “Federal Food, Drug & Cosmetics Act”, entidade que proíbe o uso de qualquer substância que não seja segura em qualquer produto. No entanto não foi ainda esclarecido pelas entidades competentes o conjunto de testes toxicológicos aplicáveis à determinação da segurança dos ingredientes e produtos cosméticos. O produtor é responsabilizado pela verificação da ausência de risco dos produtos que comercializa cabendo ao mesmo a decisão do tipo de dados (literatura, testes, etc.) a que recorrer para fundamentar e provar a segurança dos mesmos. Caso contrário, o produto deve conter um aviso onde diz que a segurança do produto não foi determinada [70].

Embora com algumas diferenças de estratégia, pode-se afirmar que mundialmente, o principal objectivo da(s) entidade(s) reguladora(s) da indústria cosmética é assegurar um funcionamento adequado do mercado interno, mantendo um elevado nível de protecção da saúde humana enquanto se considera também como máxima prioridade, o bem estar dos animais. Estima-se que, apesar de não ter sido possível cumprir a meta de 2013, a substituição total de animais por testes alternativos deverá acontecer entre 2017-2019, [20] altura em que esta como todas as outras indústrias terão obrigatoriamente que estar adaptadas a esta nova realidade, adquirindo como rotina testes alternativos nas áreas mais sensíveis e que já foram referidas como, por exemplo, a toxicidade reprodutiva.

O Octocrileno: exemplo de fotoprotector de risco toxicológico

É do conhecimento geral alguns dos efeitos que as radiações ultravioleta (UV) ou outro tipo de radiações (como as radiações ionizantes) têm no organismo humano [71,72]. Os constantes avisos públicos dos potenciais perigos das radiações UV por exposição solar, nomeadamente queimaduras e cancro da pele, bem como a maior especificação da informação contida nas linhas de orientação das entidades reguladoras conduziram a um aumento do desenvolvimento tecnológico e uso global de cosméticos protectores solares [73 - 75]. Para além disso, nos últimos anos têm sido publicados alguns estudos que alertam para o possível impacto tóxico ao nível humano e ambiental destes agentes concluindo-se a necessidade de realização de maior número de estudos que elucidem o modo de acção dos filtros UV [72,76,77].

Os filtros UV nos protectores solares são os ingredientes activos que previnem que a luz UV atinja a pele. Uma exposição aos raios solares desprotegida pode causar eritema principalmente devido aos raios do tipo UVB. Os efeitos adversos dos UVA incluem envelhecimento prematuro da pele, fotossensibilidade bem como alguns tipos de cancro da pele. Os produtos cosméticos poderão conter diversos filtros UV de forma a fornecer um espectro elevado de protecção na medida em que cada filtro é mais efectivo num determinado comprimento de onda [75]. Existem dois tipos principais de filtros UV: orgânicos e inorgânicos (ou minerais). Os filtros orgânicos absorvem a luz UV convertendo-a numa pequena quantidade de calor. São os filtros mais comumente utilizados apesar de serem muitas vezes suplementados em produtos com filtros inorgânicos de modo a aumentar a sua eficácia. Por sua vez, os filtros inorgânicos podem reflectir, dispersar ou absorver a luz UV, dependendo do tamanho das partículas [78]. Quanto menores são as partículas maior é a absorção e a eficácia. Os filtros inorgânicos protegem tanto das radiações UVB como UVA. Como exemplo deste tipo de filtro pode referir-se o dióxido de titânio ou o óxido de zinco [74].

O octocrileno, por sua vez, é um filtro UV químico, orgânico. Este composto é relativamente recente, tendo sido introduzido nos protectores solares e outros produtos cosméticos (ex. anti-envelhecimento) no final dos anos 90 devido à sua capacidade para absorver radiações UV [41]. Desde 2003, diversos estudos indicam a existência de efeitos adversos provocados potencialmente por este composto ou pela combinação deste com outros compostos [72].

O Octocrileno é um éster formado pela condensação do ácido defenil-cianoacrílico com 2-etilhexanol (Figura 3), pertencente à família dos cinamatos [77]. Encontra-se na Tabela 1 um resumo das suas propriedades mais relevantes.

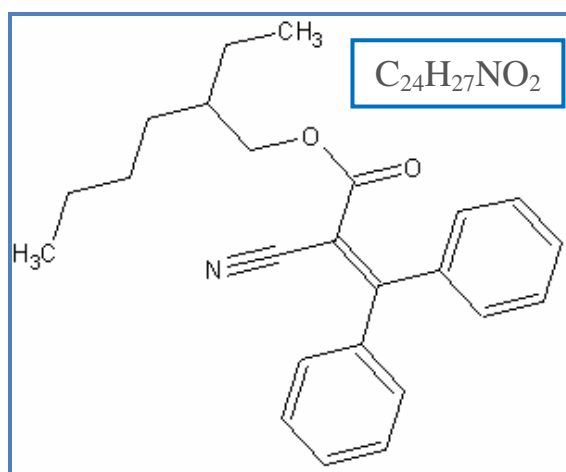


Figura 3 - Estrutura e fórmula química do Octocrileno. Fonte: (Brooke N., 2008 [77])

Tabela 1 - Principais propriedades do Octocrileno. (Adaptado a partir de Brooke N., 2008) [77]

Propriedades	Valor
Peso Molecular	361,50 g/mol
Ponto de ebulição	218 °C
Ponto de fusão	-10°C
Pressão de vapor	3,2x10 ⁻⁹ mmHg a 25 °C
Solubilidade em água	0,0013 g/l a 20 °C
Coeficiente de partição	6.88 (log K _{ow})
Densidade	1,051 g/cm ³
Aparência	Viscoso/Amarelado
Número CAS	6197-30-4

O espectro de acção do octocrileno (290-360nm, pico de absorção aos 303nm) cobre a maior parte dos comprimentos de onda UVB mas também os pequenos comprimentos de onda UVA. No entanto, não é um filtro muito efectivo e, por essa razão, é comumente associado a outro agente UVB (normalmente pertencente à mesma família), de forma a aumentar o Factor de Protecção Solar (FPS). O Octocrileno apresenta uma foto-estabilidade excelente, sendo usado para estabilizar outros filtros menos estáveis bem como melhorar a sua estabilidade em geral e a sua resistência à água. É também um composto miscível com muitos dos óleos utilizados na cosmética, sendo um dos filtros UV com melhor capacidade de incorporação no gel de protectores solares [74].

O Octocrileno é absorvido facilmente pela pele, o que aumenta o perigo de formação de radicais livres que se podem tornar instáveis e reagir com outros compostos, formando substâncias prejudiciais quando usado em excesso. Este facto torna-se um paradoxo se for tido em conta que este composto é utilizado com a intenção de diminuir os radicais livres presentes na superfície da pele. No entanto, quando é absorvido, ele possui mais oportunidades de reagir com outros químicos e causar alterações nas camadas mais internas da pele [79].

A Utilização deste tipo de filtros encontra-se limitada havendo recomendações da União Europeia que procuram promover a segurança e eficácia dos mesmos bem como a sua monitorização [75,80]. Tanto nos Estados Unidos como na União Europeia, no caso do

Octocrileno a sua utilização é permitida mas limitada a 10% por produto (Anexo VI, Directiva 76/768/EEC). Segundo as mesmas recomendações os protectores solares devem possuir uma combinação de filtros que abranja ambos os tipos de radiação (UVA, UVB)[81].

A informação disponível sobre este composto é limitada, referindo-se a potenciais efeitos no que respeita à irritabilidade da pele ou dos olhos, não referindo informação relativa ao seu potencial de toxicidade reprodutiva [78].

A preocupação acerca da potencial toxicidade deste composto tem sido crescente, não só ao nível da saúde humana como também acerca dos seus efeitos no ambiente. Um estudo publicado em Janeiro deste ano procurou avaliar a bioacumulação e os efeitos moleculares do octocrileno em machos adultos *Zebrafish*. A análise transcriptómica realizada no mesmo estudo revelou que o octocrileno poderá afectar principalmente genes ligados aos processos de desenvolvimento e aos processos metabólicos [82].

Um estudo realizado em 2012 por Krawse, M., *et al*, refere-se, após escrutínio de toda a informação existente tanto em humanos como em animais, à segurança de filtros UV utilizados em protectores solares, reportando os seus potenciais efeitos adversos. O octocrileno foi mencionado nesse estudo, tendo sido detectada a presença do mesmo em 67% das amostras de leite materno. A concentração média foi de 30.18 ± 24.51 ng/ g lípido do leite. O octocrileno não foi detectado em amostras de sangue ou urina [83].

A ampla utilização do octocrileno em protectores solares comercializados para uso em crianças e adultos, o que implica uma utilização de forma contínua desde a infância, bem como a parca informação relativa ao potencial de toxicidade reprodutiva deste composto impulsionou a sua escolha para a realização do trabalho apresentado nesta dissertação e que inclui a implementação do método no laboratório de reprodução animal do CICS-UBI bem como a avaliação do potencial de toxicidade reprodutiva pré-implantatória do octocrileno, com recurso ao teste bIVM. Deste modo foram incluídos os *endpoints* referidos no protocolo para os oócitos tratados com o composto em estudo e com as moléculas controlo: determinação do efeito do composto na maturação do oócito e determinação do efeito do composto na viabilidade do oócito. Por ser ainda bastante limitado o conhecimento sobre a permeabilidade do epitélio ao octocrileno foi ainda realizado um ensaio preliminar de permeação com recurso a células de Franz utilizando pele FT (*full thickness*).

Material e Métodos

Neste capítulo apresentamos em detalhe os materiais e os métodos adoptados neste trabalho para cada um dos parâmetros analisados no teste bIVM e ainda para o ensaio de permeação.

Todo os reagentes utilizados, com excepção dos assinalados, são da marca Sigma-Aldrich Co..

Teste de Maturação *In Vitro* de Oócitos de Bovino

Para a avaliação da toxicidade reprodutiva foi seleccionado o teste bIVM anteriormente descrito e que se baseia na maturação *in vitro* de oócitos de bovino, inserindo-se nos métodos de estudo de processos pré-implantatórios. Neste trabalho foi seguido maioritariamente o protocolo nº 129, EURL-ECVAM, tendo sido, no entanto, introduzidas algumas modificações provenientes do trabalho desenvolvido por Anna Beker Van Woudenberg *et al* (2012).

O objectivo deste teste é expor COCs a substâncias-teste e monitorizar os efeitos destas nos oócitos com particular relevância para as possíveis alterações ao nível da configuração nuclear no interior dos oócitos e a viabilidade dos mesmos comparativamente aos oócitos não expostos à substância (controlo).

Determinação do efeito do composto na maturação do oócito

O efeito do composto em estudo na maturação do oócito foi determinado por observação microscópica da morfologia nuclear dos oócitos após tratamento durante 24 horas com o composto teste e os compostos controlos. O *endpoint* deste teste refere-se ao EC₅₀ definido como o valor de concentração do composto em que 50% dos oócitos não alcançam o estadió de metafase II, ou seja, valor em que 50% dos oócitos vêem inibida a conclusão da meiose. Os compostos com um valor de EC₅₀ menor que 50 µM são identificados como positivos, considerando-se que afectam o processo de maturação, por sua vez, para compostos com EC₅₀ superior a esse valor consideram-se negativos, não afectando o processo de maturação.

A inibição da passagem a metafase II é observada directamente por ausência da extrusão do corpúsculo polar (CP) ou, de forma mais aprofundada, pela observação por fluorescência de duas placas metafásicas no interior do oócito.

O esquema-base do procedimento encontra-se representado na figura 4, tendo sido adaptado a partir do esquema apresentado no próprio protocolo [47]. A avaliação dos resultados foi feita com base no cálculo da percentagem de oócitos em MII.

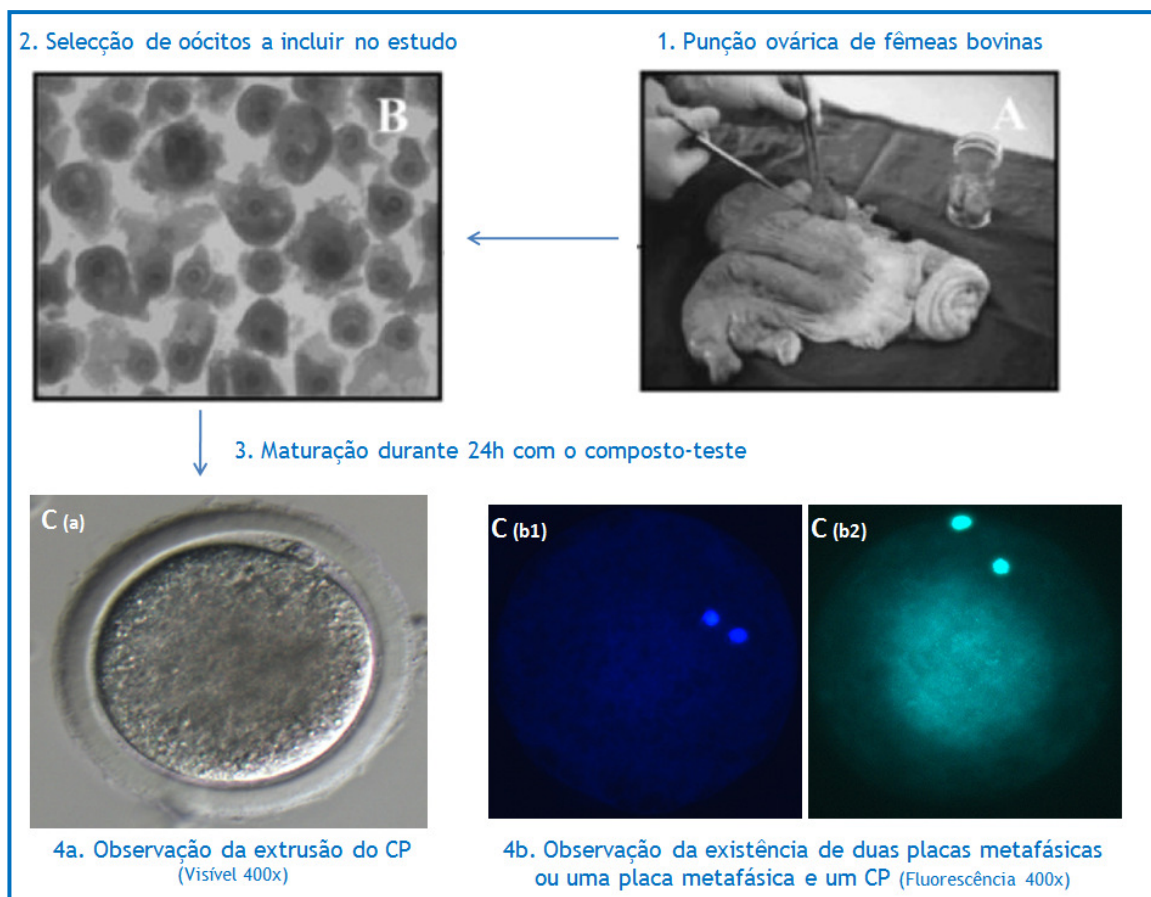


Figura 4. Representação esquemática dos principais passos do procedimento de maturação *in vitro* de oócitos de bovino. (Imagens A e B retiradas do procedimento fornecido pela EURL ECVAM [47]. Imagens C(a) e C(b1) e C(b2) obtidas na realização deste trabalho)

Punção, recolha e incubação dos oócitos com o composto em estudo

Foram recolhidos ovários de fêmeas bovinas abatidas no matadouro, gentilmente cedidos pela OVIGER (Matadouro de Alcains). O material foi recolhido em cada dia de experiência de modo a cumprir 4h (limite máximo) entre o abate e a punção dos ovários (no laboratório). Os ovários foram mergulhados e transportados num contentor de transporte com solução fosfato a uma temperatura de 25°C.

No laboratório de reprodução animal do CICS-UBI, os ovários foram puncionados recolhendo-se o líquido folicular contendo os oócitos imaturos bovinos (diâmetro folicular: 3mm) utilizando o meio de cultura para recolha de oócitos previamente preparado, constituído por Meio TCM 199, suplementado com Hepes (25 mM)(Biochrom AG, Reino Unido), Álcool Polivinílico (PVA) (1 mg/ml), heparina (10 µg/ml) e glutamina (0,1 mg/ml).

Os oócitos imaturos foram seleccionados à lupa (SZ, Olympus, Europa) com base no número de camadas de células de cúmulus (mínimo 3), segundo o protocolo adoptado.

Após duas lavagens em meio de recolha, os oócitos foram transferidos para meio de maturação, constituído por TCM 199 (Biochrome AG) suplementado por Factor de Crescimento Epidérmico (EGF, Gibco InVitrogen, USA) (10 ng/ml), hormonas FSH/LH (0,05 UI, Menopur, Ferring, USA), glutamina (0,10 mg/ml), piruvato de sódio (0,11 mg/ml) e PVA (1 mg/ml).

Para posteriores lavagens foi ainda preparado a solução H-SOF (*Hepes-buffered Synthetic Oviductal Fluid*) cuja composição inclui: Cloreto de Cálcio (300 mg/l), Cloreto de Magnésio (200 mg/l), Cloreto de sódio (6500 mg/l), Cloreto de Potássio (410 mg/l), Bicarbonato de sódio (420 mg/l), Fosfato de sódio (30 mg/l), Piruvato de sódio (36 mg/l), 20mM de Hepes (4760 mg/l) (Biochrom AG, Reino Unido), Penicilina/Streptomicina, Lactato de sódio 60% (0,94 ml/l), D-Glucose (270 mg/l), BSA frV (4000 mg/l), 10 mM de Glicina (750 mg/l), Glutamina (217 mg/l), MEM (aminoácidos não-essenciais) (10 ml/l), MEM (aminoácidos essenciais) (200 ml/l), água destilada até perfazer 1L.

O octocrileno foi dissolvido no meio de maturação previamente preparado a uma concentração de 0,39 μ M, tendo sido ainda testadas as concentrações de 0.195 μ M, 0.585 μ M, 1.170 μ M, 1.560 μ M. O solvente utilizado para dissolver o composto teste foi o DMSO uma vez que o octocrileno apresenta reduzida solubilidade em água (Tabela 1). Este solvente, foi incluído no estudo como controlo negativo, tendo sido para tal adicionado ao meio de maturação à concentração máxima utilizada (20 μ l/ml). Como controlo positivo foi utilizada a ciclohexamida composto cujo EC₅₀, avaliado em testes preliminares, se situa nos 0,39 μ M \pm 0.001. Este composto foi incluído em todas as réplicas de todas as concentrações testadas à concentração mencionada (0,39 μ M).

Por cada réplica foram incluídos cerca de 15 oócitos por concentração de composto e controlos, em 0,5ml de meio de maturação. O teste foi repetido três vezes para cada condição de ensaio tendo sido incluído em todas as experiências o controlo positivo (ciclohexamida).

A maturação dos oócitos foi realizada por incubação a 5% CO₂, 38,5°C, humidade saturada, durante 24h em incubadora (UniTherm, CO₂ Series, Uniequip GmbH, Alemanha).

Durante a experiência, foram realizados dois passos adicionais após o período de maturação *in vitro* e a partir deste ponto, o protocolo inicial, foi substituído pelo descrito por Ana Beker Van Woudenberg *et al.* (2012) que observa os oócitos por microscopia de fluorescência e faz uma avaliação considerando não só os oócitos em que se observou extrusão do CP como aqueles em que se observa a existência de duas placas metafásicas (Tabela 2). O primeiro passo adicional foi desnudar os oócitos por degradação enzimática com a utilização de hialuronidase (Cumulase, Origio®, Dinamarca). Para tal, cada grupo de 15 oócitos foi colocado em contacto com 100 μ l de cumulase durante 80 segundos e depois lavado 5 vezes em meio H-SOF previamente preparado e acima descrito. De seguida iniciou-se o procedimento descrito

por Woudenberg *et al.* (2012), tendo-se mergulhado os oócitos em paraformaldeído (PFA) a 4% e colocado no frigorífico (2 °-8°C) durante 15 minutos ou até posterior análise. Após esse período, os oócitos foram colocados numa solução de 1ml de PBS (suplementado com 1mg de BSA) para lavar os oócitos procurando eliminar o PFA onde se encontravam o máximo possível. Nesta altura foi feita a primeira análise (segundo passo adicional), observando os oócitos em microscópio invertido (IX51, Olympus, Europa), ampliação de 400x, registando o número de oócitos em que se observou extrusão do CP, e os que não se observou o mesmo. Foram também registados os oócitos degenerados.

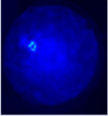
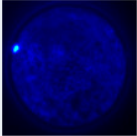
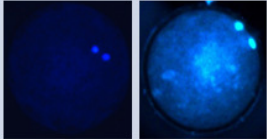
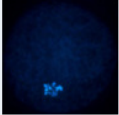
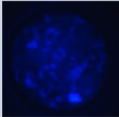
Registados os resultados referentes à primeira observação, cada gupo de oócitos (concentrações de octocrileno mais controlo) foi mergulhado em 1 ml de PBS suplementado com 1mg de BSA e 10 µl de Hoechst (33342) deixando-se a incubar à temperatura ambiente, durante 10 minutos, protegidos da luz devido à presença do marcador.

Após o período de incubação prepararam-se as lâminas, identificando-as com o valor da concentração, número da experiência e data. Foi colocada uma gota de cerca de 10µl com os oócitos e, por cima desta, uma gota de Entellan (Merk, Alemanha). Por fim colocou-se a lamela e deixou-se secar uns minutos. As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência (Axiobserver Z1, Zeiss, Alemanha) com uma ampliação de 400x. Os oócitos foram classificados segundo o esquema apresentado na Tabela II e os dados recolhidos reunindo numa só classe vesículas germinativas (VGs) e oócitos em metáfase I (MI) - classificados como imaturos, noutra os oócitos em metáfase II (MII) em que se observam duas placas metafásicas ou uma placa metafásica e um CP - oócitos maduros - e finalmente, numa terceira classe foram incluídos todos os oócitos degenerados, aberrantes ou que não foi possível classificar.

Os dados obtidos no visível (colectados no primeiro momento descrito) foram comparados com os obtidos por fluorescência, sendo ainda feita uma relação daqueles oócitos que se perderam no processo de montagem das lâminas.

Os resultados são apresentados em função da percentagem de oócitos maduros (MII), determinados por cálculo da percentagem do número de oócitos MII em função do número total de oócitos observados por concentração. Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Tabela 2 - Classificação do estadiu nuclear de oócitos maturados *in vitro* durante 24h. Foi utilizado Hoescht 33342 como marcador. (Imagens obtidas neste trabalho. Tabela adaptada a partir de Beker van Woudenberg [48])

Estadio Nuclear	Abreviação	Descrição	Exemplo
Vesícula germinativa	VG	Oócitos cuja cromatina se encontra difusa ou levemente condensada	
Metafase I	MI	Oócitos cuja cromatina se encontra fortemente condensada, formando uma rede irregular de bivalentes individuais.	
Metafase II	MII	Oócitos com duas placas metafásicas ou uma placa metafásica e um crepúsculo polar	
Aberrantes	Aberr	Oócitos com uma organização cromossômica anormal	
Degenerados	Deg	Oócitos com citoplasma granulado e/ou núcleo picnótico	

Avaliação da Toxicidade Geral com Azul Tripano

Ao objectivo principal deste trabalho, análise da morfologia nuclear após maturação *in vitro* com um composto potencialmente tóxico adicionado, juntou-se um outro teste cujo objectivo é analisar se, nas concentrações estudadas, o composto-teste, não é tóxico só por si. Esta informação adicional é importante considerando que para muitos dos compostos em teste, não existe informação na literatura que permita definir concentrações para as quais esta toxicidade não se verifique e conseqüentemente, assegurar que o efeito causado pelo composto é específico para o processo de maturação.

Da suspensão de oócitos incubados no procedimento anterior foram recuperados os oócitos num volume máximo de 20 µl e lavados 2 vezes em meio H-SOF.

As células do *cumulus* foram parcialmente removidas (deixando apenas a camada mais interna) recorrendo ao processo enzimático anteriormente descrito e os oócitos foram incubados novamente com a solução azul tripano a 4% diluído em H-SOF (de 1:4) durante 15 minutos. Após os 15 minutos, os oócitos foram novamente lavados 2 vezes com meio tampão observando-se por fim os oócitos à lupa (SZ, Olympus, Europa), avaliando-se e registando-se a viabilidade celular: células com citoplasma azul foram consideradas como danificadas e conseqüentemente não-viáveis. Os resultados são apresentados em função da viabilidade dos oócitos determinados por cálculo da percentagem do número de oócitos viáveis em função do número de oócitos observados para condição experimental. Os valores são apresentados em média e desvio padrão.

Teste de permeabilidade

Numa perspectiva de se procurar aferir a concentração de octocrileno absorvido pelo organismo após aplicação tópica, foi desenhado um teste de permeabilidade recorrendo a células de *Franz* (PermeGear, SES GmbH, Alemanha) para a sua detecção [84]. As células de *Franz* são constituídas por dois compartimentos, um dador (compartimento superior) e outro receptor (compartimento inferior) (Figura 5). Durante todo o procedimento as células permaneceram aquecidas a 32 °C (85).

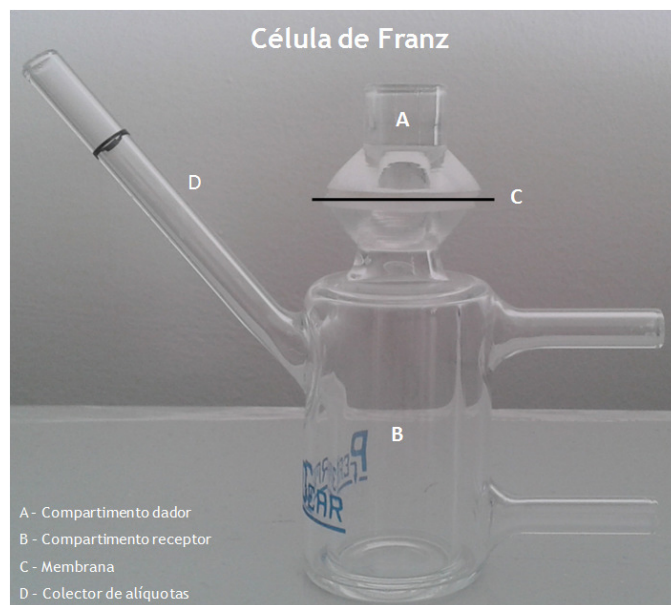


Figura 5. Representação dos diferentes elementos que compõe as células de *Franz*.

O ensaio foi realizado para um protector solar comercializado (Sublime Sun Bronze, L'Óreal, PARIS) com uma concentração de 7-10% de octocrileno (não especificada) e para uma solução de 10% de octocrileno em DMSO, preparada no laboratório. Pele FT (*full thickness*), à qual apenas foi extraído o tecido adiposo subjacente, retirada da região abdominal do porco, foi gentilmente cedido pelo matadouro OVIGER (Alcains).

Foram realizados dois ensaios (4 células de Franz): na primeira célula foi colocado 1ml do protector solar em estudo (Formulação) no compartimento dador e 15ml de DMSO no compartimento receptor (Célula 1). O branco deste primeiro ensaio foi constituído por 1ml de 10% de octocrileno diluído em DMSO colocado no compartimento dador sendo a solução da câmara receptora igual à anterior (15 ml de DMSO) (Célula 2). No segundo ensaio manteve-se a mesma formulação no compartimento dador (Célula 3) e utilizou-se solução de DMSO diluído a 10% em água estéril (15ml) no compartimento receptor. O branco correspondente a este segundo ensaio foi constituído por 1ml de 10% de octocrileno diluído em DMSO colocado no compartimento dador e na câmara receptora 15 mL da solução de 10% de DMSO em água

(Célula 4). Nas 4 células de *Franz*, entre o compartimento dador e receptor foram colocados pequenos pedaços de pele.

Através do valor de solubilidade do octocrileno, foram garantidas as condições sink para estes ensaios.

Foi retirada uma amostra de cada câmara (400µl), sendo esse valor repostado com solução nova. As amostras retiradas foram devidamente identificadas com o número da câmara e tempo em que foi retirada a amostra (neste caso, t_0). O estudo foi iniciado e, durante seis horas, de hora em hora, foram retiradas amostras de todas as câmaras e repostado o valor retirado (400 µl) [86]. A seringa utilizada para cada câmara foi lavada três vezes na solução de diluição correspondente a cada célula entre cada recolha de amostras. As amostras foram colocadas em frascos de vidro devidamente identificados, conservados no frio até análise por NMR.

Resultados e Discussão

Maturação *in vitro* de oócitos de bovino - Avaliação

De acordo com o descrito no protocolo publicado para a avaliação do efeito de compostos com potencial tóxico sobre a maturação de oócitos, definiu-se como *endpoint* a concentração a partir da qual 50% dos oócitos são inibidos de completar a meiose II, ou seja, inibidos de completar a sua maturação, determinado pela observação ao microscópio da extrusão do corpúsculo polar ou pela existência de duas placas metafásicas.

Considerando os resultados obtidos para o controlo negativo, constituído pelo DMSO que foi utilizado como solvente do composto em estudo por este apresentar reduzida solubilidade em água, verifica-se, através da observação dos oócitos pelo microscópio invertido (400x) e que foi realizada previamente ao tratamento com fluorescência, que cerca de 70% dos mesmos completaram a meiose (Figura 6).

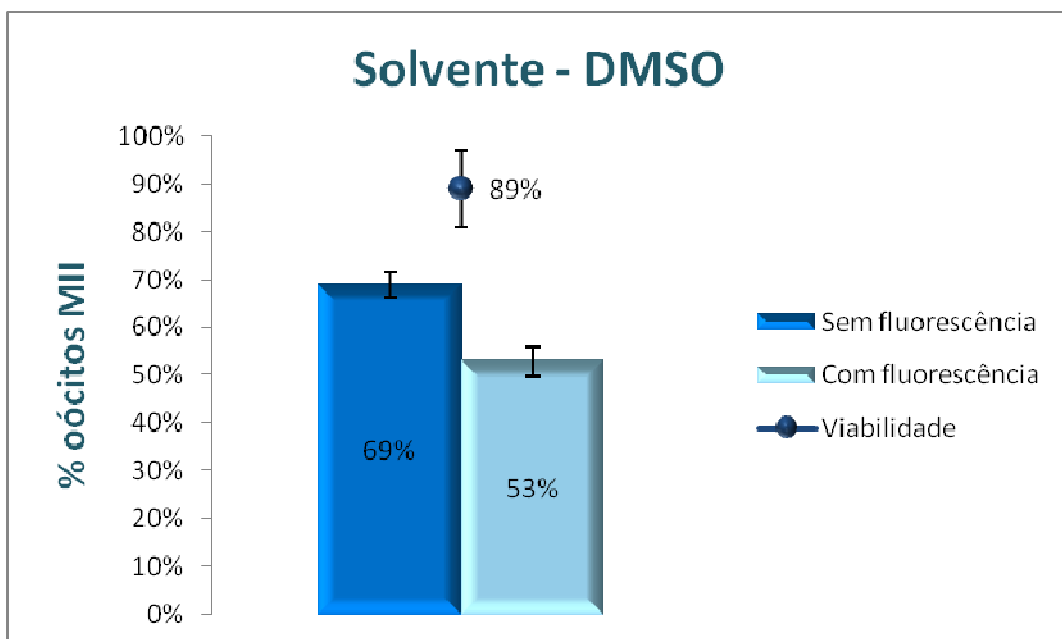


Figura 6 - Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de DMSO (controlo negativo), durante as observações com e sem fluorescência. Apresenta-se ainda a percentagem de oócitos viáveis nas mesmas condições.

Estes valores, apesar de no limite inferior, considerando o desvio padrão, encontram-se dentro do intervalo referido na literatura e que referem que para a maturação, a média de oócitos capaz de chegar a MII é de $85.58 \pm 8.12\%$ numa gama que varia entre 70% a 100%. (47) Os valores obtidos após tratamento com Hoechst 33342 revelam que, ao contrário do esperado, o controlo negativo apresenta um valor em fluorescência significativamente menor

ao observado sem fluorescência (16 décimas). Valores de percentagem de oócitos em MII observados em fluorescência superiores aos observados sem fluorescência são considerados coerentes na medida em que é possível observar a existência de duas placas metafásicas mesmo não tendo ocorrido ainda a extrusão do CP. Valores inferiores, por fluorescência, poderão ser explicados pela ocorrência, durante o procedimento de preparação e lâminas, de um comprometimento da integridade dos oócitos já após a primeira observação. Para este efeito pode ter contribuído por exemplo o tempo decorrido entre a lavagem do PFA 4% e a montagem das lâminas que pode ter de alguma forma degradado o corpúsculo tornando impossível a sua identificação como tal.

Relativamente ao controlo positivo, a ciclohexamida, a concentração incluída neste ensaio é referente ao valor de EC_{50} referido previamente no protocolo adoptado [47] pelo que a percentagem de maturação esperada é na ordem dos 50%, facto que se confirma nos resultados obtidos: 51% de oócitos em MII na primeira observação e, 52% obtidos por fluorescência (Figura 7).

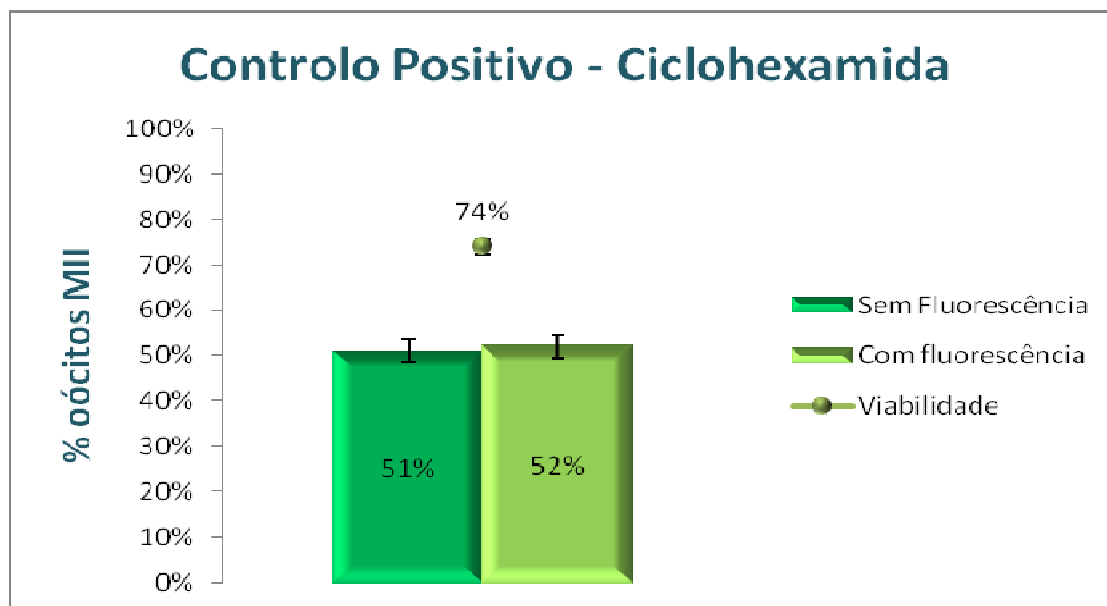


Figura 7 - Resultados obtidos para a percentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Ciclohexamida (controlo positivo), durante as observações com e sem fluorescência. Apresenta-se ainda a percentagem de oócitos viáveis nas mesmas condições.

Relativamente aos resultados do composto em estudo verifica-se que à medida que aumenta a concentração do octocrileno ($0,195\mu\text{M}$ - $1,560\mu\text{M}$) decresce a percentagem de oócitos em MII, (Figura 8) variando entre 69% para a menor concentração do composto e 37% para a concentração de $1,17\mu\text{M}$. A última concentração testada ($1,56\mu\text{M}$), apresenta um ligeiro aumento na percentagem de oócitos maduros (41%) relativamente à concentração imediatamente anterior ($1,17\mu\text{M}$, 37%).

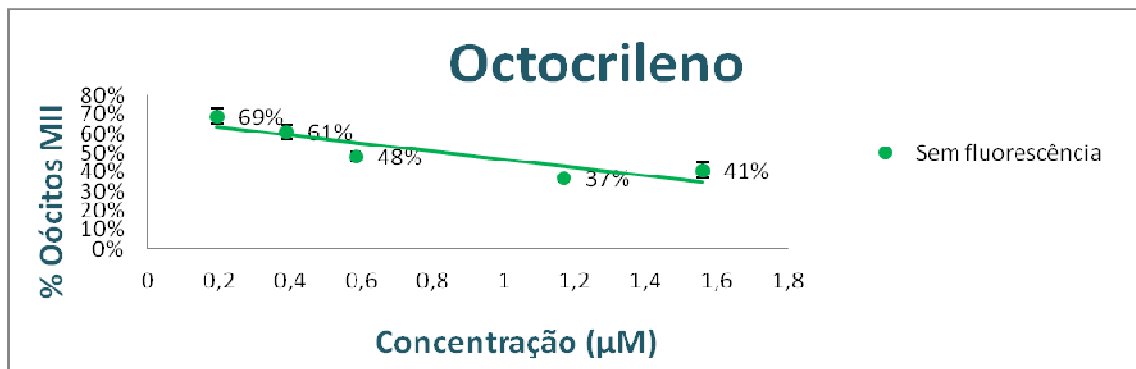


Figura 8 - Resultados obtidos para a porcentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste) durante a primeira observação, sem fluorescência.

Os resultados obtidos para o octocrileno após tratamento dos oócitos com o fluorocromo, descrevem a mesma tendência decrescente, diminuindo a porcentagem de oócitos maturados à medida que aumenta a concentração testada do composto em estudo, variando neste caso entre 68% e 43%, observando-se, também para a maior concentração testada, uma porcentagem de oócitos em MII superior (54%) relativamente à mesma porcentagem apresentada para a concentração imediatamente anterior (1,17 µM). (Figura 9)

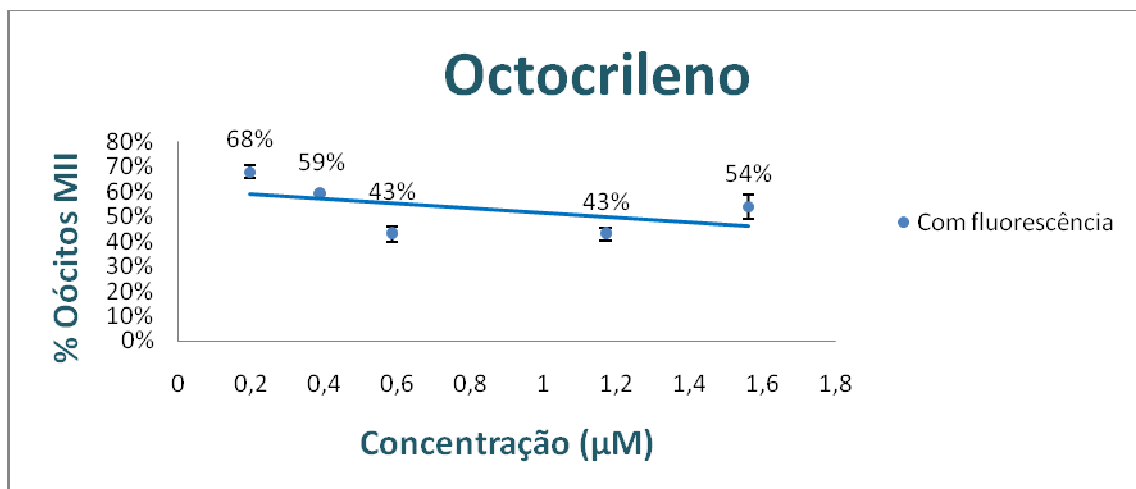


Figura 9 - Resultados obtidos para a porcentagem de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste) durante a segunda observação, com fluorescência.

Comparando os resultados obtidos nas visualizações com e sem fluorescência, (Figura 10) observam-se valores semelhantes para as concentrações 0,195 µM e 0,39 µM (variações não superiores a duas décimas), havendo um aumento nas observações em fluorescência de 6 e 13 décimas para as concentrações de 1,17 µM e 1,56 µM. O resultado reportado sem fluorescência que refere uma porcentagem de 1,56µM mais elevada que a concentração imediatamente anterior foi também observado neste ensaio de fluorescência. Este resultado embora consistente não é conclusivo pois tratavam-se dos mesmo oócitos que os utilizados

previamente. Ao contrário do esperado, tal como no controlo negativo, observa-se para os oócitos maturados, na presença de uma concentração de 0,585 μM de octocrileno, um decréscimo de 5 décimas quando visualizados em fluorescência em relação ao observado sem fluorescência. Também aqui é necessário considerar o valor de amostragem muito reduzido que poderá levar a variações desta natureza. Será necessário aumentar o número de oócitos por réplica ou o número de réplicas por concentração em estudo de modo a conseguir maior concordância de resultados.

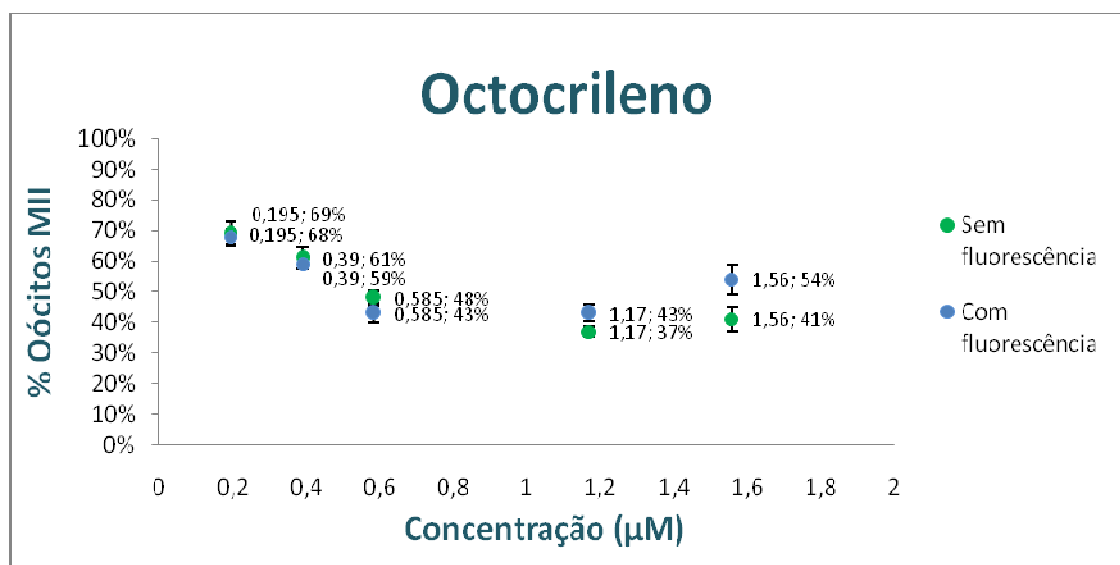


Figura 10 - Comparação de resultados obtidos para a % de oócitos que atingiu a maturação na presença de Octocrileno (composto-teste), com e sem fluorescência.

Em suma, os resultados obtidos durante a análise da morfologia nuclear, sem fluorescência, demonstram valores dentro do esperado para os controlos positivo e negativo e uma tendência decrescente de percentagem de oócitos em MII. Por sua vez, os resultados obtidos após observação dos oócitos por fluorescência, confirmam a tendência decrescente de percentagem de oócitos em MII nas concentrações de octocrileno. O valor do controlo positivo também se encontra dentro do esperado no entanto, o valor do controlo negativo encontra-se abaixo do esperado, facto que não deveria acontecer na medida em que a análise por fluorescência permite uma observação mais aprofundada tal como já foi referido.

Apesar de não ser possível com este trabalho determinar exactamente o valor de EC_{50} do octocrileno, na verdade, tendo em conta as percentagens de oócitos em MII obtidos nas diferentes concentrações e o *endpoint* deste método (inibição de 50% dos oócitos completarem a maturação), pode dizer-se que esse valor deverá incluir-se entre os 0,39 μM e os 1,56 μM . A confirmar-se com estudos com maior amostragem por concentração e maior número de concentrações testadas, esta informação torna-se ainda mais relevante ao considerar-se que, segundo o procedimento fornecido pela EURL-ECVAM, os valores de EC_{50} que se situem abaixo dos 50 μM são considerados positivos no que respeita à interferência que

exercem no processo da meiose e, conseqüentemente, considerados tóxicos ao nível reprodutivo[47].

Através do método χ^2 realizou-se uma análise estatística com o objectivo de compreender se a perda de oócitos que se danificaram e não puderam ser contabilizados por fluorescência, teria relevância para efeitos de comparação de dados obtidos com as duas observações. Tanto para os controlos como para as cinco concentrações testadas, não se observou nenhum valor de $p < 0,05$, tendo a gama de valores variado entre 0,079 e 0,893. Desta forma não foram encontrados valores estatisticamente relevantes no que respeita à interferência nos resultados da diminuição de oócitos do visível para fluorescência. (Tabela 3)

Tabela 3 - Apresentação dos valores que representam a relevância estatística da perda de oócitos entre as duas observações efectuadas.

	DMSO	Ciclohexamida	0,195 μ M	0,390 μ M	0,585 μ M	1,17 μ M	1,56 μ M
Valor de p	0,225	0,079	0,216	0,893	0,825	0,251	0,424

Avaliação da Toxicidade Geral com Azul Tripano

Os testes de citotoxicidade geral realizados representam um incremento da fiabilidade do próprio teste de maturação *in vitro* de oócitos de bovino. Na realidade, esta análise procura compreender se o composto, nas concentrações estudadas, é ou não tóxico à partida podendo desta forma interferir de modo não específico no processo de maturação do oócito, nomeadamente no processo da meiose.

Os controlos utilizados têm necessariamente estudos prévios que indicam que estes nas concentrações utilizadas não são citotóxicos. Efectivamente, para o octocrileno, do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que reporta resultados do efeito deste composto relativos à toxicidade reprodutiva, nomeadamente à toxicidade pré-implantatória por estudo da maturação de oócitos.

O protocolo nº 129 fornecido pela EURL-ECVAM e que se pretende que seja utilizado de forma global de maneira a homogeneizar métodos e resultados entre laboratórios, não explicita claramente a análise dos resultados obtidos para aferir a citotoxicidade geral dos compostos. No entanto, outros estudos semelhantes descrevem que, para este método, considera-se como viabilidade aceitável, as concentrações cujo teste demonstre a existência de cerca de 90% de oócitos viáveis (não citotóxicos). É de qualquer forma importante referir que estes valores são considerados em situações em que se pretende validar valores de EC_{50} , sendo por isso estudos que decorrem durante vários anos e que conseqüentemente possuem um valor significativamente elevado de amostra.

Os resultados obtidos encontram-se expressos em percentagem de oócitos viáveis ou seja, oócitos em que o azul tripano não penetrou e, dessa forma a análise será feita referindo a viabilidade e não a citotoxicidade (valor remanescente) e encontram-se representados nas figuras 11 (controlos) e 12 (concentrações da substância-teste).

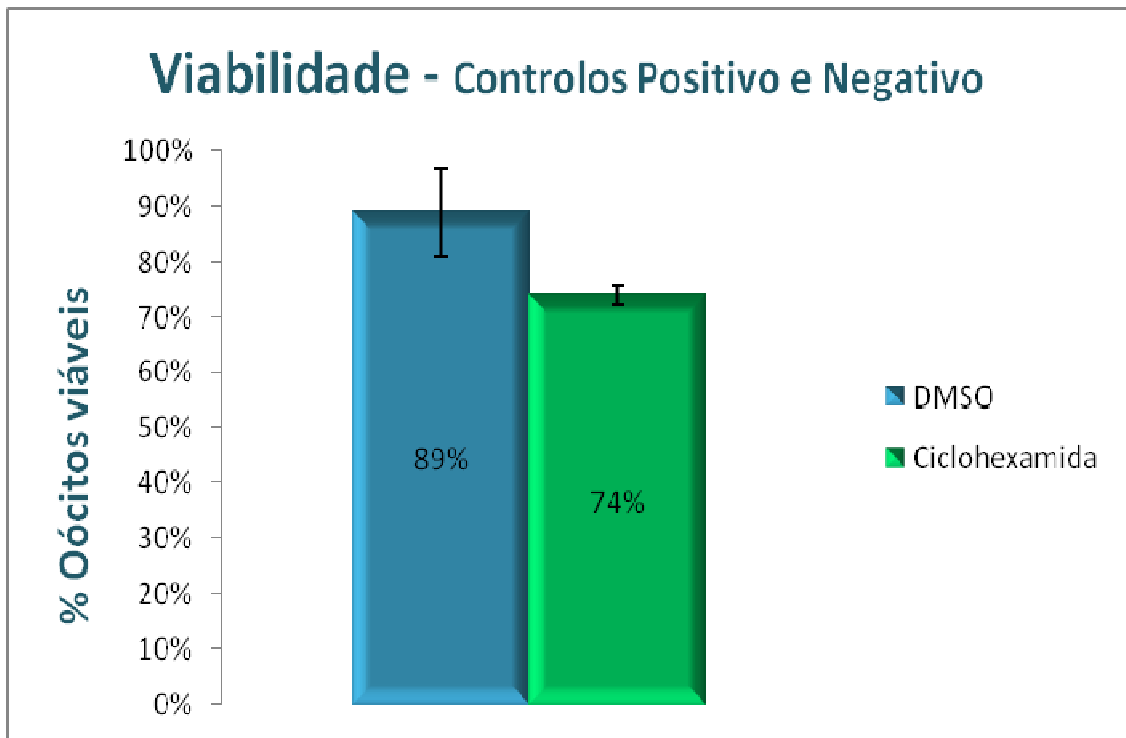


Figura 11 - Resultados obtidos para a percentagem de oócitos viáveis para os controlos positivo e negativo.

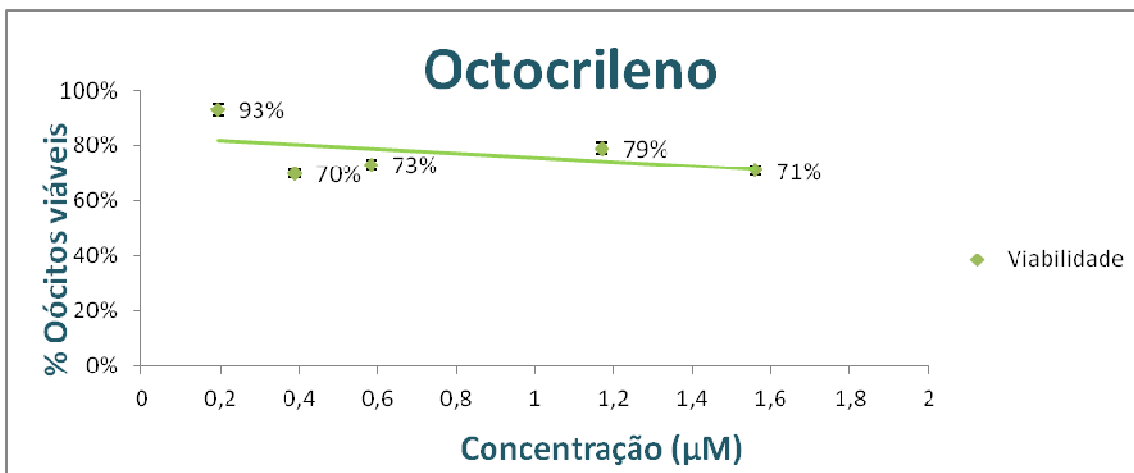


Figura 12 - Resultados obtidos para a percentagem de oócitos viáveis nas diferentes concentrações de octocrileno.

Analisando os resultados obtidos para o controlo negativo (DMSO) verifica-se que este se encontra dentro dos valores referidos na literatura. A viabilidade do controlo positivo (ciclohexamida) e do composto em estudo encontra-se entre os 70% e os 80% com excepção da concentração mais baixa de octocrileno em estudo ($0,195\mu\text{M}$) onde se verifica um valor superior a 90%.

Tendo em conta os dados encontrados na bibliografia, considerou-se que os valores obtidos para o controlo positivo se encontravam abaixo do esperado. Efectivamente, de entre os estudos encontrados na bibliografia todos se referiam á análise de resultados de um número elevado de testes efectuados ao longo dos anos. O aumento do número de ensaios ou da quantidade de oócitos por ensaio poderá contribuir para a melhoria dos nossos resultados visto que consideramos que só com uma amostra elevada de oócitos se poderá diluir a influência no resultado final dos oócitos não viáveis e não detectados no processo de selecção. No entanto, considerando o interesse do teste na sua aplicação em rotina para ensaios com produtos cosméticos, este será um ponto-chave do procedimento que deverá ser validado para valores de viabilidade inferior de modo a poder permitir a sua utilização para este efeito.

Para os valores obtidos nas diferentes concentrações de octocrileno, não havendo informação na literatura que suporte, da mesma forma que para os controlos, a não existência de toxicidade para as concentrações testadas, é necessário considerar não só os aspectos referidos para o controlo positivo como também a possibilidade deste composto poder de facto, apresentar alguma toxicidade nestas concentrações.

Teste de permeabilidade

A aplicabilidade do NMR para a detecção do octocrileno foi verificada pela sua quantificação nas amostras controlo utilizadas no ensaio tendo os resultados confirmado a assertividade desta abordagem. De modo a conhecer a sensibilidade do método foram efectuadas determinações de concentração em diluições sucessivas das soluções padrão tendo-se verificado que o método é efectivo até à concentração de octocrileno de 19,4 µM.

A análise efectuada por NMR às amostras obtidas nas diferentes câmaras das células de *Franz* não detectou a presença de octocrileno em nenhuma das soluções receptoras das quatro células utilizadas, traduzindo-se supostamente na ausência de permeação do octocrileno através da pele ou ter ocorrido em concentrações abaixo da sensibilidade do método.

A concentração efectiva de octocrileno no protector solar utilizado no ensaio não foi possível determinar por NMR por a amostra não se encontrar no estado líquido (formulação era semi-sólida) e não se validou um método para a sua extracção. No entanto, foi claramente detectada a sua presença na amostra padrão.

Deste modo conclui-se que o octocrileno em todas as condições testadas não foi capaz de permear o epitélio, com uma sensibilidade final de 19,4 µM. No entanto, considerando os nossos resultados de toxicidade verifica-se que esta concentração é claramente superior à concentração máxima testada (1,56 µM) e considerada tóxica sobre o processo de maturação dos oócitos. Assim, conclui-se que futuramente se deveria realizar novamente este estudo recorrendo, no entanto, a outro método potencialmente mais sensível na detecção do octocrileno. Recentemente foi publicado um estudo onde se referia ter havido sucesso na separação dos diferentes filtros UV que compõem os protectores solares através do método RP-HPLC, método que poderia ser incluído em estudos de permeação futuros [87,88]. Esta estratégia de validação de um método claramente mais sensível para a detecção deste composto é também evidenciada no estudo anteriormente referido de detecção do octocrileno em leite materno por se ter verificado que os valores encontrados são claramente inferiores ($3,34 \times 10^{-3}$ µM) aos detectáveis no nosso estudo de permeação (19,4 µM)[83,89].

Conclusão

O trabalho realizado teve como principal objectivo estudar o potencial efeito tóxico do octocrileno no processo de maturação dos oócitos. Considerou-se que sendo este composto amplamente utilizado como filtro UV nos protectores solares e, havendo já alguns estudos que referem potenciais efeitos nocivos do octocrileno noutras áreas da toxicologia, este seria uma boa escolha como composto de estudo na área da toxicologia reprodutiva, tendo em conta a necessidade urgente de se recolher mais informação acerca do seu modo de acção e, conseqüentemente, realizar uma avaliação de risco mais sustentada que permita alcançar um dos objectivos das novas directivas e legislações europeias e da indústria cosmética, que se refere ao aumento da segurança dos produtos comercializados.

A escolha do método, de entre os métodos incluídos na sub-classe de estudos pré-implantatórios, teve em conta por um lado o facto da maturação *in vitro* de oócitos ser um teste que se encontra em fase de pré-validação pela ECVAM sendo o seu procedimento utilizado há anos em centros de reprodução animal assistida com sucesso, o que prevê que desta maneira se consiga mimetizar *in vitro* de forma mais fiável o processo que ocorre *in vivo* e, por outro lado, por este teste se enquadrar dentro das capacidades do LaBRA.

A complexidade do processo de maturação faz com este seja extremamente sensível a alterações das condições óptimas podendo o resultado das mesmas implicar a não concretização da maturação que conseqüentemente se traduz na não fertilização ou numa fertilização anómala.

De forma geral considera-se que o teste de maturação *in vitro* de oócitos de bovino poderá, incluído num conjunto de testes, representar uma alternativa ao uso de animais em laboratório. A concordância de resultados obtidos pelos laboratórios implicados no desenvolvimento deste teste no âmbito do projecto ReProTect, comprova a sua validade. Adicionalmente, o facto deste teste não necessitar de sacrificar animais, não provocar stress nos mesmos e ainda reduzir o número de animais utilizados em testes toxicológicos, converge no objectivo do princípio dos 3Rs. Verifica-se no entanto a necessidade de otimizar o método quer seja em tempos de cada passo do procedimento quer seja na composição dos meios e a inclusão no protocolo oficial da EURL-ECVAM de contribuições ao nível da avaliação e análise de dados publicados em artigos posteriores.

Tendo em conta a falta de informação relativa ao octocrileno, considera-se que o escrutínio efectuado neste trabalho representa um contributo positivo, aumentando os dados conhecidos sobre este composto.

Limitações conceptuais e operacionais

O facto de não haver muitos dados acerca deste composto disponíveis em mamíferos, colocou uma primeira barreira no desenho da experiência e que tinha como base a selecção da/das concentração(ões) a estudar. Em mamíferos sabe-se apenas o valor (em percentagem) permitido pelas entidades reguladoras, de incorporação deste composto num produto cosmético. Na ausência de dados na literatura que permitissem servir de base para a selecção de uma concentração ou uma gama de concentrações a ser testadas, decidiu-se começar com uma concentração igual à apresentada pelo controlo positivo (ou seja, $0,39\mu\text{M}$ de octocrileno) aferindo a partir da análise do comportamento dos oócitos na presença desta concentração, as concentrações a serem testadas em seguida.

O tempo decorrido entre o abate do animal e a punção dos ovários em laboratório (definido pelo protocolo inicial 4 horas como tempo máximo), referido na literatura como um factor influenciador do processo, pode igualmente ter-se apresentado como uma limitação do ensaio já que por questões processuais não pode ser completamente controlado. Em trabalhos futuros propõe-se que a punção dos ovários seja realizada no matadouro antes de nos deslocarmos para o laboratório. Esta alteração ao nosso procedimento carecerá de autorização da administração do matadouro e cedência de uma pequena bancada limpa.

A classificação e selecção dos oócitos imaturos para inclusão no teste deve ser mais restrita considerando-se que este é outro dos factores influenciadores da percentagem de oócitos em MII.

Especificamente, em relação ao presente trabalho, considera-se que existe a necessidade de otimizar resultados sendo para isso importante rever cada passo do procedimento e identificar aqueles que possivelmente poderão estar a influenciar negativamente os resultados. Considera-se também que, para que os resultados sejam mais consistentes, é necessário aumentar a amostra significativamente. Esta situação é particularmente delicada no sentido em que o número de oócitos cuja classificação possibilita a sua introdução no estudo é variável. Por experiência, esse valor depende sempre do número de ovários fornecidos e do número de oócitos incluídos no estudo. Pode, no entanto, considerar-se aumentar o número de réplicas por concentração testada. Outra questão cuja relevância têm impacto directo nos resultados tem a ver com o facto dos ensaios para cada concentração, devido ao número reduzido de oócitos que pela sua classificação, podem ser incluídos no teste, não serem realizados ao mesmo tempo, sendo necessário dividir as diferentes concentrações e réplicas por diferentes dias. Idealmente, para que fosse possível garantir a existência das mesmas condições, deveriam testar-se todas as concentrações definidas para estudo, no mesmo ensaio.

Perspectivas futuras

Ao abrigo da necessidade de se desenvolverem testes alternativos ao uso de animais em laboratório, muitos têm sido os testes desenvolvidos nas mais diferentes áreas da toxicologia. Estes testes *in vitro* baseiam-se normalmente em estabelecer *endpoints* relativamente simples que sejam representativos de um determinado processo como acontece para o processo de maturação *in vitro* de oócitos de bovino e que, em conjunto com outros testes desenhados sob os mesmos princípios, com *endpoints* diferentes também eles simples, em conjunto, sejam capazes de recolher dados acerca dos compostos que permitam por um lado a construção de uma base de dados sustentada e de elevada utilidade para as indústrias que pretendam incluir novos compostos nas suas formulações e, por outro, aumentar a segurança dos mesmos produtos na medida em que se consegue realizar uma análise e avaliação de risco também ela mais sustentada.

O contributo destes testes no rastreio da potencial toxicidade de diversos compostos sem a necessidade de sacrificar animais em laboratório, tem sido amplamente reconhecido, havendo no entanto algumas questões que necessitam ainda de reunir maior consenso. A simplificação dos métodos por exemplo, pode conduzir a falsos positivos e/ou negativos e consequentemente, limitar a sua preditividade mostrando que o domínio de aplicação do ensaio pode também ser mais limitado que o previsto [13]. Tal leva a que se defenda que mais do que se focar exclusivamente em testes individuais e na sua relevância, a implementação de métodos alternativos, deve, no futuro, e sob o ponto de vista da legislação, incorporar estes testes em estratégias globais.

Existem ainda algumas áreas cujos testes já implementados não conseguem cobrir. É ainda necessário encontrar *endpoints* para testes alternativos que estudem a influência de aspectos importantes ainda não considerados como é o caso da absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) dos compostos.

A procura em resolver e colmatar estas questões que influenciam os testes alternativos em geral, juntamente com a complexidade do ciclo reprodutivo, faz com que a validação dos testes seja morosa. Tendo em conta a informação que se possui actualmente, analisando o futuro destes testes como métodos alternativos, a total substituição de animais em estudos de toxicidade, nomeadamente de toxicidade reprodutiva, acontecerá de forma gradual e demorará mais tempo que o esperado.

Apesar dos diversos obstáculos apresentados que representam as razões pelas quais os testes alternativos, na sua maioria, se encontram em fases anteriores à validação, é reconhecido o valor dos mesmos, sendo os testes alternativos utilizados já de forma rotineira para fins de rastreio e estabelecimento de prioridades. Além disso, estes testes podem fornecer um

importante contributo na compreensão de mecanismos de actuação de compostos em toxicidade reprodutiva.

Futuramente, o desafio centra-se em conseguir aproveitar as vantagens dos testes alternativos em relação aos testes *in vivo* e construir estratégias bem desenhadas que permitam combinar os *endpoints* mais sensíveis com uma selecção de métodos alternativos bem estruturada.

A aplicação de uma estratégia como a referida anteriormente pode a seu tempo acabar com os testes realizados *in vivo* para diferentes compostos e, desta forma, otimizar e reduzir consideravelmente o número de testes realizados no âmbito da toxicidade reprodutiva.

Desta forma, e no que respeita ao método e ao protocolo fornecido, prevê-se que, até este ser validado, serão ainda necessárias algumas optimizações. O protocolo nº 129 da EURL-ECVAM foi optimizado pela última vez em 2010 tendo sido, entretanto, publicados alguns estudos que propõe alterações com o objectivo de optimizar o método como acontece no estudo de Anna Beker Van Woudenberg *et al*, (2012).

Referências bibliográficas

1. European Commission, (2011), “*Report on the Development, Validation and Legal Acceptance of Alternative Methods to Animal Tests in the Field of Cosmetics (2009)*”. COM (2011) 558 final, Brussels, 13.09.2011. Disponível em:http://ec.europa.eu/consumers/archive/docs/annual_reports_animal_testing_13092011_en.pdf.
2. De Boo J & Knight A., (2008), “*Increasing the implementation of alternatives to laboratory animal use*”, AATEX; 13(3): 109-117
3. Commission of the European Communities (2005a). “*Fourth report from the Commission to the Council and the European Parliament on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union*”. COM (2005) 7 final, Brussels, 20.01.2005. (http://www.europa.eu.int/comrn/lenvironment/chemicals/lab_animals/pdf/com_2005_7_en.pdf).
4. Sauer, U. et al., (2005), “*Fourth EU Report on the statistics on the number of animals used for scientific purposes in 2002 - Trends, Problems, Conclusions*”, ALTEX, 22, 2/05.
5. EC, (2006), “*Regulation (EC) 1907/2006 concerning Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH)*”, Official Journal of the European Communities, L136, pp. 3-280.
6. Balls, M., (2012), “*ECVAM and New Technologies for Toxicity Testing*”, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, Chapter 10, 27pgs.
7. Bremer S., et al., (2005), “*The Effects of Chemicals on Mammalian Fertility. The report and recommendations of ECVAM Workshop 53 - the first strategic workshop of the EU ReProTect Project*”, Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 33(4) , 391-416.
8. Bremer S., et al., (2007), “*In vitro tests for detecting chemicals affecting the embryo implantation process. The report and recommendations of ECVAM workshop 62 - a strategic workshop of the EU ReProTect project*”, Alternatives to Laboratory Animals (ATLA) 35(4) , 421-439.

9. EPAA, (2006), "3 Rs Declaration": <https://circabc.europa.eu/sd/d/3a0533fa.../3rs-declaration.pdf>.
10. COLIPA, (2011), "Colipa Report on the 8th World Congress on Alternatives & Animal Use on Life Sciences", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association.html>.
11. Lazzari, G., et al., (2008), "*Development of an in vitro battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella*", Toxicology and Applied Pharmacology 233, p. 360-370, doi:10.1016/j.taap.2008.08.019.
12. Russel, W., Burch, R., (1959), "*The Principles of Humane Experimental Technique*", London: Methuen, p. 69-154.
13. Langley, G., (2007), "*Replacing animal experiments: choices, chances and challenges*", BioEssays 29:918-926, DOI 10.1002/bies.20628.
14. Balls, M., (2010), "*The Principles of Humane Experimental Technique: Timeless Insights and Unheeded Warnings*", ALTEX 27, Special Issue 2010, PL7, p. 19-23.
15. Stephens ML, Conlee et al., (2002), "*Possibilities for refinement and reduction: future improvements within regulatory testing*", ILAR J; 43(Suppl): S74-9.
16. Whelan, M., et al., (2011), "*SEURAT: vision, research strategy and execution*", disponível em: http://www.seurat-1.eu/media/users/Downloads/SEURAT-1_Strategy_Paper.pdf. (24)
17. COLIPA, (2004), "Cosmetics Directive 76-768-ECC - Consolidated Version", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/european-union-cosmetics-directives.html>.
18. EC, (2009), "*Regulation (EC) 1223/2009 on cosmetic products (recast)*", Official Journal of the European Communities, L342, pp. 59-209.
19. COLIPA, (2004), "*Guidelines for the safety assessment of a cosmetic product*", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europeassociation/guidelines.html>.
20. Zuang, V., et al., (2013), "*EURL ECVAM progress report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods (2010-2013)*", JRC Scientific and Policy Reports, ISBN 978-92-79-29943-8, doi: 10.2788/90736.

21. Adler, S., et al., (2011), "*Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects - 2010*", Archives Toxicology, 85, p. 367-485, doi: 10.1007/s00204-011-0693-2.
22. Knight, A., (2008). "*Non-Animal Methodologies within Biomedical Research and Toxicity Testing*", Altex 25, 3/08
23. EURL ECVAM (2010), "*EU Integrated Project - ReProTect - Development of a novel approach in hazard and risk assessment for reproductive toxicity by combination and application of in vitro tissue and sensor Technologies. (2004-2009)*", EURL ECVAM DB-ALM: EU integrated project.
24. Swartz, M., (2009), "*The ReProTect Framework Program: New Innovative Approaches for Evaluating Fertilization, Implantation and Prenatal Development*", ReProTect Workshop, Brussels, 19th of November of 2009.
25. Bremer S., et al., (2005), "*The integrated project ReProTect: A novel approach in reproductive toxicity hazard assessment*", Reproductive Toxicology, 20(3), 441-452.
26. D'Yvoire, M., et al., (2012), "*ECVAM and New Technologies for Toxicity Testing*", Chapter 10, Landes Bioscience and Springer Science, pps. 154 - 180.
27. Pazos, P., et al., (2010), "*The test chemical selection procedure of European Centre for the Validation of Alternative Methods for the EU Project ReProTect*", Reproductive Toxicology 30, p. 161-199, doi: 10.1016/j.reprotox.2010.04.001.
28. Piersma, A., (2006), "*Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing*", Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2006, 98, 427-431, ISSN 1742-7835.
29. Schenk, B., et al., (2010), "*The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants*", Reproductive Toxicology 30, p. 200-218, doi: 10.1016/j.reprotox.2010.05.02.
30. Hareng, L. et al., (2005), "*The integrated project ReProTect: A novel approach in reproductive toxicity hazard assessment*". Reproductive Toxicology 20, 441-452, doi: 10.1016/j.reprotox.2005.04.003.
31. OECD (2012), "*OECD Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*", OECD Environmental Health and safety Division.

32. OECD (1983), "*OECD Test Guideline no. 415: One-Generation Reproduction Toxicity Study*", adopted on the 26th of May of 1983, OECD Environmental Health and safety Division.
33. OECD (2001), "*OECD Test Guideline no. 416: Two-Generation Reproduction Toxicity Study*", updated guideline, adopted on the 22th of January of 2001, OECD Environmental Health and safety Division.
34. OECD (2001), "*OECD Test Guideline no. 414: Prenatal Developmental Toxicity Study*", updated guideline, adopted on the 22th of January of 2001, OECD Environmental Health and safety Division.
35. OECD (1995), "*OECD Test Guideline no. 421: Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*", adopted on the 27th of July of 1995, OECD Environmental Health and safety Division.
36. OECD (1996), "*OECD Test Guideline no. 422: Combined Repeated dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*", adopted on the 22th of March of 1996, OECD Environmental Health and safety Division.
37. Ekaterina Voronina and Gary M. Wessel, (2003), "*The Regulation of oocyte Maturation*", Current Topics in Developmental Biology, Vol. 58, chapter 3.
38. Luciano, A., et al., (2013), "*Oocytes Isolated from Dairy Cows with Reduced Ovarian Reserve Have a High Frequency of Aneuploidy and Alterations in the Localization of Progesterone Receptor Membrane Component 1 and Aurora Kinase B*", BOR Papers in Press. Published on January 16, 2013 as DOI:10.1095/biolreprod.112.106856.
39. McLaughlin, M., et al., (2010), "*Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles*", Molecular Human Reproduction, Vol.16, No.9 pp. 644-653, doi:10.1093/molehr/gaq02.
40. Hillier, S., et al., (2010), "*Folliculogenesis and oogenesis: from basic science to the clinic*" Molecular Human Reproduction, Vol.16, No.9 pp. 617-620, doi:10.1093/molehr/gaq068.
41. Luciano, A., et al., (2011), "*Gap Junction-Mediated Communications Regulate Chromatin Remodeling During Bovine Oocyte Growth and Differentiation Through cAMP-Dependent Mechanism(s)*" Biology of Reproduction, 85, 1252-1259, DOI 10.1095/biolreprod.111.092858.

42. Thomas, R., et al., (2004), "*Bovine Cumulus Cell-Oocyte Gap Junctional Communication During In Vitro Maturation in Response to Manipulation of Cell-Specific Cyclic Adenosine 39,59-Monophosphate Levels*", *Biology of Reproduction* 70, 548-556, DOI 10.1095/biolreprod.103.021204.
43. Huang, z., Wells, D., (2010), "*The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome*", *Molecular Human Reproduction*, Vol.16, No.10 pp. 715-725, doi:10.1093/molehr/gaq03.
44. Marc-André Sirard and Karine Coenen, (2006), "*In Vitro Maturation and Embryo Production in Cattle*", *Methods in Molecular Biology*, Vol. 348: Nuclear Transfer Protocols: Cell Reprogramming and Transgenesis, Chapter 2, Edited by: P. J. Verma and A. Trounson © Humana Press Inc., Totowa, NJ, ISBN978-1-58829-280-3.
45. Tatjana Smiljaković, W. Tomek, (2006), "*Meiotic Maturation and in vitro maturation of bovine oocytes*", *Biotechnology in Animal Husbandry* 22 (1-2), p 29-34.
46. Benjamin G. Brackett, (1985), "*In vitro oocyte maturation and fertilization*" *J ANIM SCI* 61:14-24.
47. EURL ECVAM (2010), "*Toxicity Test on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes*", EURL ECVAM DB-ALM: protocol n° 129.
48. Beker van Woudenberg, A., et al., (2012), "*The bovine oocyte in vitro maturation model: A potential tool for reproductive toxicology screening*", *Reproductive Toxicology* 34, p. 251-260, doi: 10.1010/j.reprotox.2012.05.098.
49. Luciano, A., et al., (2010), "*Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProTect*", *Reproductive Toxicology* 30, p. 81-88, doi: 10.1016/j.reprotox.2010.01.015.
50. Sun, F., et al., (2004), "*Preantral follicle culture as a novel in vitro assay in reproductive toxicology in mammalian oocytes*", *Mutagenesis*, vol 19 no.1, pp. 13-24, doi: 10.1093/mutage/geg040.
51. Lorenzetti, S., et al., (2011), "*Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: the contribution of Italian partners*", *Ann Ist Super Sanità*, Vol. 47, No. 4: 429-444, DOI: 10.4415/ANN_11_04_16.

52. Levent Keskin-tepe and Benjamin G. Brackett, (1996), "*In Vitro Developmental Competence of In Vitro-Matured Bovine Oocytes Fertilized and Cultured in Completely Defined Media*", *Biology of Reproduction* 55, 333-339.
53. EURL ECVAM (2010), "*Oocyte in vitro maturation assay - summary*", EURL ECVAM DB-ALM: method summary.
54. Tavares, L., et al, (2011), "*In vitro development of bovine embryos cultured under different fetal calf serum concentrations and cell types*", *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, Sao Paulo, v. 48, n. 1, p. 38-45.
55. Tetzner. T., et al., (2011), "*The effects of ovalbumin as a protein source during the in vitro production of bovine embryos*", *R. Bras. Zootec.*, v.40, n.10, p.2135-2141.
56. Tahaei, L., et al., (2011), "*Effects of retinoic acid on maturation of immature mouse oocytes in the presence and absence of a granulosa cell co-culture system*" *J Assist Reprod Genet*, 28:553-558, DOI 10.1007/s10815-011-9579-8.
57. Shirazi, A., et al., (2009), "*The Effect of the Duration of In Vitro Maturation (IVM) on Parthenogenetic Development of Ovine Oocytes*", *Avicenna J Med Biotech*; 1(3): 181-191.
58. Lenz, R., et al., (1983), "*In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature dependent processes*", *Biology of Reproduction* 29, p. 173-179.
59. Bahadori, M., et al., (2013), "*Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice*", *Iran J Reprod Med* Vol. 11. No. 1. pp: 11-18.
60. Avenel-Audran, M., et al., (2010), "*Octocrylene, an emerging photoallergen*", *Archives Dermatology*. 146(7):753-75.
61. Khaki, E., et al, (2013), "*Effect of Leptin on In Vitro Nuclear Maturation and Apoptosis of Buffalo (Bubalus bubalis) Oocyte*", *Royan Institute, International Journal of Fertility and Sterility*, Vol 8, No 1, Apr-Jun 2014, Pages: 43-50.
62. Hartung, T., et al., (2004), "*A Modular approach to the ECVAM principles on test validity*", *ATLA* 32, p.467-472.

63. Schwarz, M., (2011), “*Meta Analysis of a battery test of reproductive toxicity assays . The ReProTect experience*”, OpenTox, Munique, disponível em: www.opentox.org/meet/.../talks/OpenTox2011_Talk-Schwarz.pdf.
64. EURL ECVAM (2010), “*Culture of Human Cumulus Granulosa Cells*”, EURL ECVAM DB-ALM: protocol nº 92
65. EURL ECVAM (2010), “*Follicle Culture Bioassay (FBA) - method summary*”, EURL ECVAM DB-ALM: summary
66. EC, (1976) “*Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the member states relating to cosmetic products*”, Official Journal of the European Communities, L262, pp. 169-200.
67. European Commission, (2013), “*Impact assessment on the animal testing provisions in regulation (EC) 1223/2009 on cosmetics*”. COM (2013) 135 final, Brussels, 11.03.2013. Disponível em: http://ec.europa.eu/consumers/archive/sectors/cosmetics/files/pdf/animal_testing/ia_at_2013_en.pdf.
68. Cosmetics Europe, (2012), “*Compliance with regulation 1223/2009 on cosmetic products roles and responsibilities along the supply chain - a practical guide*”, disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html>.
69. EC, (2012), “*The SCCS’s notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation. 8th Revision*”, SCCS, 1501/12.
70. Center for Drug Evaluation and Research, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry, (2011), “*Reproductive and Developmental Toxicities - Integrating Study Results to Assess Concerns*”, Pharmacology and Toxicology, disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079240.pdf>.
71. T. G. Baker, (1978), “*Effects of Ionizing Radiations on Mammalian Oogenesis: a Model for Chemical Effects*”, Environmental Health Perspectives, Vol. 24, pp. 31-37.
72. Brugè, F. et al., (2014), “*Prevention of UVA-Induced Oxidative Damage in Human Dermal Fibroblasts by New UV Filters, Assessed Using a Novel In Vitro Experimental System*”, PLoS ONE 9(1): e83401. doi:10.1371/journal.pone.0083401.

73. COLIPA, (2007), "Guidelines for monitoring UV radiation sources", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html>.
74. Scalia, s., Mezzena, M., (2009), "Incorporation in Lipid Microparticles of the UVA Filter, Butyl Methoxydibenzoylmethane Combined with the UVB Filter, Octocrylene: Effect on Photostability", AAPS PharmSciTech, Vol. 10, No. 2, DOI: 10.1208/s12249-009-9217-2.
75. EC, (2006), "Comission Recomendation (EC) 647/2006, on the efficacy of sunscreen products and the claims made relating thereto (notified under document number C(2006) 4089)", Official Journal of the European Communities, L265, pp. 39-43.
76. Danovaro, R., et al., (2008), "Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections", *Environ Health Perspect* 116:441-447, doi:10.1289/ehp.10966.
77. Brooke N, et al., (2008), "UV-filters in cosmetics - prioritisation for environmental assessment", Environment Agency, ISBN: 978-1-84432-968-7.
78. Polonini, H., et al., (2014), "Synthesis and evaluation of octocrylene- inspired compounds for UV-filter activity", *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 6, 1004-1009, doi.org/10.5935/0100-4042.20140160.
79. Gago-Ferrero, P., et al., (2012), "An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota", *Anal Bioanal Chem* (2012) 404:2597-2610, DOI 10.1007/s00216-012-6067-7.
80. COLIPA, (2007), "Guidelines for monitoring UV radiation sources", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/guidelines.html>.
81. COLIPA, (2007), "COLIPA Recommendation nº 20 to In vitro UVA test method", disponível em: <https://www.cosmeticseurope.eu/publications-cosmetics-europe-association/recommendations.html>.
82. Blüthgen N., et al., (2014), "Accumulation and effects of the UV-filter octocrylene in adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*)", *Science of the Total Environment* 476-477, p. 207-217, doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.015.

83. Krause, M., et al., (2012), "Sunscreens: are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters", *International Journal of Andrology*, 35, p. 424-436, doi: 10.1111/j.1365.2605.2012.01280.x.
84. Netzlaff, F., (2012), "*Permeability of the reconstructed human epidermis model Episkin in comparison to various human skin preparations*", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (2007) 127-134.
85. Wagner, H., et al., (2000), "*Drug Distribution in Human Skin Using Two Different In Vitro Test Systems: Comparison with In Vivo Data*", *Pharmaceutical Research*, Vol. 17, No. 12.
86. Wagner, H., et al., (2001), "*Human Skin Penetration of Flufenamic Acid: In Vivo/In Vitro Correlation (Deeper Skin Layers) for Skin Samples from the Same Subject*", *THE Journal of Investigative Dermatology*, vol. 118, NO. 3.
87. Sobanska, A., Brzezinska, E., (2012), "*Strategies of sunscreen separation by thin layer chromatography*", *Acta Poloniae Pharmaceutica, Drug Research*, Vol. 69 No. 5 pp. 791-797.
88. Yousef N, Haidar A, (2013), "*Development and Validation of RP-HPLC Method for Analysis of Four UV Filters in Sunscreen Products*", *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 23(2), nº43, 254-258.
89. Claro da Silva, R., et al., (2007), "*Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura*", *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 7, 1535-1538.