



EDITAL 20/2018 - Processo de Seleção Especial para o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) - Grupo Boticário

A Coordenação de Iniciação Científica e a Agência PUC, ambos vinculados à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PRPPGI), informam à comunidade universitária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná que, no **período de 23 a 27/08/2018**, receberão propostas para o processo de seleção de bolsistas para o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) em parceria com o Grupo Boticário.

1 Objetivos

O Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) tem por objetivo estimular os estudantes de graduação do ensino superior nas atividades, metodologias, conhecimentos e práticas próprias voltadas ao desenvolvimento tecnológico e processos de inovação. O objetivo desta chamada específica é selecionar estudantes que desejem desenvolver projetos de pesquisa aplicada, demandados e desenvolvidos em parceria com a Agência PUC de Inovação da PUCPR e o Grupo Boticário.

2 Bolsas

Serão oferecidas 2 bolsas que contemplam um valor mensal de R\$ 400,00 (quatrocentos reais) para o estudante. O período de vigência das bolsas é de 01 de setembro de 2018 a 31 de julho de 2019.

3 Cronograma

Lançamento do edital	23 de agosto
Período de submissão das propostas	23 de agosto a 27 de agosto
Entrevistas com candidatos à bolsa	28/08 às 13:30h
Divulgação do resultado	28/08 às 18:00h
Prazo para pedido de reconsideração	Até 02 (dois) dias úteis após a divulgação dos resultados
Implementação	31/08

4 Elegibilidade

4.1 Orientador

- ✓ Atuar no Campus Curitiba da PUCPR.
- ✓ Apresentar ao menos o título de mestre.
- ✓ Apresentar produção científica, tecnológica ou artístico-cultural relevante nos últimos três anos e currículo lattes atualizado.
- ✓ Apresentar experiência compatível com a função de orientador e formador de recursos humanos qualificados.
- ✓ Não ter tido penalidade no programa na vigência anterior que o impeça de realizar a submissão na vigência atual.

4.2 Estudante PIBIC/PIBITI

- ✓ Estar regularmente matriculado nos cursos de graduação de Biotecnologia (a partir do 4º período ao 6º) ou de Farmácia (a partir do 4º e 8º período) do Campus Curitiba da PUCPR.
- ✓ Ter currículo cadastrado na plataforma Lattes no CNPq.
- ✓ Ser selecionado e indicado pelo orientador. A indicação do estudante deve ser feita no momento da submissão do proposta. O estudante só poderá ser indicado uma única vez, por um único orientador.
- ✓ Estudantes contemplados com a bolsa PIBITI não poderão ter vínculo empregatício, nem realizar estágio remunerado durante a vigência da bolsa; os estudantes deverão dedicar-se integralmente às atividades acadêmicas e de pesquisa.
- ✓ Estudantes com bolsas de financiamento (bolsa rotativa PUCPR, FIES ou PROUNI)

poderão participar do programa e concorrer às bolsas.

✓ O estudante não poderá participar de nenhum outro programa simultaneamente (p.ex: PIBIC, PIBITI, PIBID, PIBEP, BEPID, *Apple academy*, monitoria, etc.), mesmo que na modalidade voluntária.

4.3 Projetos de Pesquisa

✓ Os projetos de pesquisa foram demandados e desenvolvidos pela equipe do Grupo Boticário. São dois projetos, intitulados: “Screening de claims para ativos de uso cosmetic” e “Disruptores Endócrinos na Indústria Cosmética”. Os projetos estão disponíveis nos anexos 1 e 2.

✓ Os projetos serão desenvolvidos em parceria Agência Puc de Inovação e Grupo Boticário, sendo financiados pelo Grupo Boticário.

✓ Cada projeto de pesquisa será executado por um único estudante.

5 Apresentação da proposta

As inscrições e envio de documentos deverão ser realizados exclusivamente por meio de mensagem eletrônica para o endereço pibicpr@pucpr.br, no período de **23 a 27 de agosto de 2018**.

No e-mail, o professor orientador deverá encaminhar o pedido de proposta de participação no edital, indicando para qual projeto está se inscrevendo. O aluno deverá estar indicado, sendo necessário anexar os seguintes documentos na mensagem:

- ✓ Carta de motivação, escrita pelo estudante
- ✓ Carta de recomendação, feita pelo professor orientador
- ✓ Link para o currículo Lattes do professor orientador
- ✓ Link para o currículo Lattes do estudante
- ✓ Histórico escolar

6 Avaliação das candidaturas às bolsas

A avaliação das propostas de candidatura às bolsas será realizada por uma banca, composta por um representante do Grupo Boticário, um representante do Comitê Gestor do PIBIC e um representante dos cursos de graduação envolvidos e/ou da Agência PUC de Inovação.

A avaliação consistirá na análise dos documentos encaminhados (carta de

motivação, carta de recomendação, histórico escolar do estudante e consulta ao currículo na plataforma *Lattes* do CNPq) e em entrevista a ser realizada com o estudante.

A análise da produção científica e experiência profissional do professor orientador ocorrerá por meio de consulta ao currículo na plataforma *Lattes* do CNPq (<http://lattes.cnpq.br>).

7 Disposições gerais

A coordenação de iniciação científica reserva-se o direito de resolver os casos omissos e as situações não previstas no presente Edital.

Curitiba, 23 de agosto de 2018.

Profa. Cleybe H. Vieira
Coordenadora da Iniciação Científica

Profa. Paula Cristina Trevilatto
Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

ANEXO 1

PROJETO “Screening de claims para ativos de uso cosmetic”



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E
INOVAÇÃO

PIBITI – 2018/2019

SCREENING DE CLAIMS PARA ATIVOS DE USO COSMÉTICO

PROJETO DE PESQUISA DO PROFESSOR ORIENTADOR

PIBITI

ÁREA ESTRATÉGICA DO PROJETO: BIOTECNOLOGIA

**Curitiba
Agosto de 2018**

SUMÁRIO

1.	Introdução	8
2.	Objetivo	9
3.	Método	9
4.	Cronograma	9
5.	Principais contribuições científicas/tecnológicas da proposta	4
6.	Referências	11

Projeto de pesquisa (Plataforma Lattes)

--

2 INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo resulta do efeito cumulativo do envelhecimento cronológico e devido a fatores ambientais, sendo caracterizado clínica e instrumentalmente por ressecamento, flacidez e formação de rugas além de manchas. Do ponto de vista histológico o envelhecimento cutâneo é caracterizado pelo afinamento da epiderme, pelo achatamento da junção derme-epiderme, perda da laminação da membrana basal, alterações da derme superficial, com uma diminuição do colágeno tipo I, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, colágeno tipo VII, integrina e laminina (Lavker et al., 1987; Varani et al., 2006; Oh et al., 2011; Deloche et al., 2011; Craven et al., 1997; Langton et al., 2016). Além dessas alterações é possível verificar uma relação alterada entre queratinócitos proliferando e diferenciando, o que resulta na perturbação da função de barreira, havendo perdas na integridade e funções fisiológicas da pele.

Tanto os fatores extrínsecos (ambientais) como os intrínsecos (cronológico) envolvem diferentes processos, entre eles, a formação de ROS (reactive oxygen species) e mediadores inflamatórios (Pillai et al., 2005; Kohl et al., 2010). A pele está diariamente exposta a radicais livres oriundos de processos fisiológicos como a fosforilação oxidativa mitocondrial e agressões ambientais como a radiação solar (Hekimi et al., 2011). O stress oxidativo promove a inflamação dos tecidos através da indução da expressão de genes que codificam citocinas proinflamatórias, ativando a sinalização da via de NF-KB, acelerando o processo de envelhecimento da pele (Wilmer et al., 1994; Murphy et al., 2007; Tilstra et al., 2011). Essa inflamação crônica e a indução de expressão de mediadores pro-inflamatórios como IL-6, IL-8 e TNFa são um dos grandes vilões do envelhecimento da pele.

Adicionalmente, com a idade os melanócitos da epiderme acabam tendo a sua distribuição no tecido irregular. Em peles claras a hipo e hiperpigmentação estão associadas e resultam aparentemente da progressiva perda de atividade dos melanócitos e proliferação/agregação exacerbada focal (Haddad et al., 1998).

2. OBJETIVO

O presente projeto tem como objetivo *screening* de ativos, focados em processos e vias com conhecida ação no envelhecimento da pele agilizando o lançamento de novos produtos eficientes para a prevenção e atenuação dos sinais de envelhecimento cutâneo, seja intrínseco ou extrínseco.

3. MÉTODO

.1 Pele 3D

Para a realização do ensaio as peles equivalentes serão preparadas seguindo o protocolo validado pelo Grupo Boticário com alterações segundo Cardeal, 2010.

.2 Avaliação da citotoxicidade em pele 3D

As amostras analisadas serão aplicadas diretamente sobre a superfície epidermal da pele reconstituída, em diluições a serem definidas, utilizando 25 uL/cm² para amostras.

Serão incubadas em estufa a 37°C e 6% de CO₂ *overnight*. Após lavagem, as peles 3D serem incubadas, por 42 horas em meio de cultura apropriado e a viabilidade celular avaliada com o indicador MTT (Thiazolyl Blue Tretazolium Bromide - Sigma, M5655), 1 mL por poço, mantido em contato com as peles por 3 horas, na ausência de luz, a 37°C e 6% de CO₂, seguindo protocolo de irritação cutânea do ECVAM (2009).

.3 Avaliação da expressão gênica

Após 24 horas de incubação com os ativos será realizada a extração de RNA das peles com o RNeasy Mini Kit (74106, Qiagen), de acordo com o fabricante. Após a extração, as amostras serão quantificadas no Nanodrop e mantidas a -80°C.

A transcrição reversa será realizada com o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada amostra serão considerados 200 ng de RNA total como

template para síntese de cDNA.

A expressão gênica será realizada pela metodologia de PCR em Tempo Real (qPCR) através do sistema TaqMan (Life Technologies) com sondas inventariadas, selecionadas posteriormente.

Todas as reações serão realizadas em placas de 384 poços em triplicata técnica.

Os resultados serão analisados através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change) com base nos valores de Ct das amostras obtidos após a corrida de qPCR, segundo Livak & Schmittgen (2000), como segue:

$$\Delta Ct (\text{tratamento}) = Ct (\text{gene alvo tratamento}) - Ct (\text{gene normalizador tratamento})$$

$$\Delta Ct (\text{controle}) = Ct (\text{gene alvo controle}) - Ct (\text{gene normalizador controle})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{tratamento}) - \Delta Ct (\text{controle})$$

$$\text{Onde, Fold Change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Os valores fixos de threshold foram definidos para cada um dos genes com base na fase exponencial da curva de amplificação.

4. CRONOGRAMA

	Revisão bibliográfica	Treinamento em BPL e cultivo celular	Compra de Material	Testes de Solubilidade	Testes de Citotoxicidade	Execução do Método	Análise dos Dados	Escrita do Relatório
2018								
Setembro								
Outubro								
Novembro								
Dezembro								
2019								
Janeiro								
Fevereiro								
Março								
Abril								
Maiο								
Junho								
Julho								
Agosto								
Setembro								

5. PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS/TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

Criar uma plataforma de avaliação de novos ativos com ação anti-idade focado nos principais processos e vias que influenciam o envelhecimento cutâneo utilizando as técnicas de transcriptômica e seleção de aproximadamente 38 genes alvos, utilizando modelo in vitro de pele equivalente. Agilidade no desenvolvimento de novos produtos anti-idade, explorando todo potencial dos ativos, e proporcionando um diferencial competitivo no lançamento de tratamentos antienvelhecimento.

6. REFERÊNCIAS

Cardeal, L. B. S. 2010. Caracterização de metaloproteinases de matriz e reek em queratinócitos primários que expressam oncoproteínas do papilomavírus humano (HPV). 142F. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Craven, N.M., Watson, R.E., Jones, C.J., Shuttleworth, C.A., Kielty, C.M. and Griffiths, C.E. Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br. J. Dermatol.* 137, 344– 350 (1997).

Deloche, C., Minondo, A.M., Bernard, B.A., Bernerd, F., Salas, F., Garnier, J. and Tancrede, E. Effect of C-xyloside on morphogenesis of dermal epidermal junction in female aged skin. An ultrastructural study. *Eur. J. Dermatol.* 21, 191–196 (2011).

ECVAM Skin Irritation Validation Study-Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min- 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. Standard Operating Procedure, 2009.

Haddad M.M., Xu W., Medrano E.E. Aging in epidermal melanocytes: cell cycle genes and melanins. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1998 Aug;3(1):36-40.

Hekimi, S., Lapointe, J. and Wen, Y. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–576 (2011).

Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M. and Szeimies, R.M. Skin ageing. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25, 873–884 (2011).

Langton, A.K., Halai, P., Griffiths, C.E., Sherratt, M.J. and Watson, R.E. The impact of intrinsic ageing on the protein composition of the dermal-epidermal junction. *Mech. Ageing Dev.* 156, 14–16 (2016).

Lavker, R.M., Zheng, P.S. and Dong, G. Aged skin: a study by light, transmission electron, and scanning electron microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 88(suppl 3), 44s–51s (1987).

Murphy, R.C. and Gijon, M.A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem. J.* 405, 379–395 (2007).

Oh, J.H., Kim, Y.K., Jung, J.Y., Shin, J.E. and Chung, J.H. Changes in glycosaminoglycans and related proteoglycans in intrinsically aged human skin in

vivo. *Exp. Dermatol.* 20, 454–456 (2011).

Pillai, S., Oresajo, C. and Hayward, J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation – a review. *Int. J. Cosmet. Sci.* 27, 17–34 (2005).

Tilstra, J.S., Clauson, C.L., Niedernhofer, L.J. and Robbins, P.D. NF- κ B in aging and disease. *Aging Dis.* 2, 449–465 (2011).

Varani, J., Dame, M.K., Rittie, L., Fligiel, S.E., Kang, S., Fisher, G.J. and Voorhees, J.J. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am. J. Pathol.* 168, 1861–1868 (2006).

Wilmer, J.L., Burleson, F.G., Kayama, F., Kanno, J. and Luster, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* 102, 915–922 (1994).

ANEXO 2

PROJETO “Disruptores Endócrinos na Industria cosmética”



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E
INOVAÇÃO

PIBITI – 2018-2019

DISRUPTORES ENDÓCRINOS NA INDÚSTRIA COSMÉTICA

PROJETO DE PESQUISA DO PROFESSOR ORIENTADOR

PIBITI

ÁREA ESTRATÉGICA DO PROJETO: BIOTECNOLOGIA

**Curitiba
Agosto de 2018**

SUMÁRIO

1.	Introdução	8
2.	Objetivo	9
3.	Método	9
4.	Cronograma	9
5.	Principais contribuições científicas/tecnológicas da proposta	4
6.	Referências	11

Projeto de pesquisa (Plataforma Lattes)

--

1. INTRODUÇÃO

Receptores intracelulares nucleares incluem os receptores de estrógenos, andrógenos, tireóide e retinóides. Esses receptores possuem uma função essencial nos processos fisiológicos e nos processos toxicológicos, agindo como fatores de transcrição, alterando a expressão gênica. A estimulação desses receptores por substâncias químicas que apresentam características semelhantes aos hormônios e que são utilizadas na indústria, tanto em seus produtos como liberados nos efluentes, pode levar a danos irreversíveis nos organismos expostos, resultado em danos como a alteração da maturação sexual e carcinogênese (Janosek et al, 2006). Um exemplo dos compostos polêmicos na indústria cosmética são os parabenos que mostraram interação fraca com os receptores de estrógeno, com afinidade mil vezes menor que a do hormônio humano (Routledge, 1998), mas que já gerou uma grande discussão a respeito de segurança.

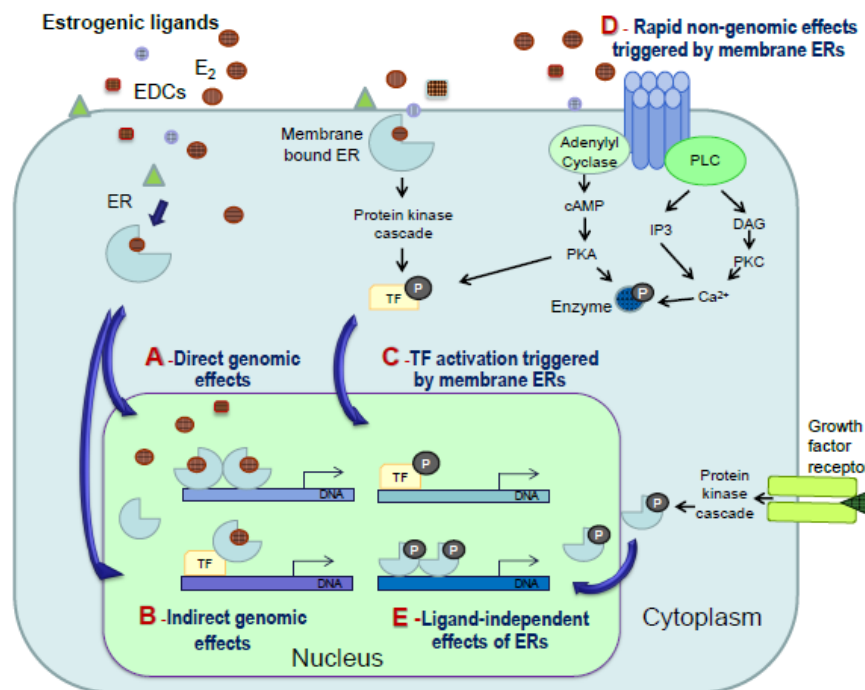
Estrógenos são compostos esteroides que possuem função de hormônio na maioria dos vertebrados, sendo o seu sistema biológico celular bem conservado entre as diferentes espécies, e o seu sistema incluem desde enzimas responsáveis pela sua produção, as moléculas estrona, estradiol e 17β -estradiol além dos receptores desses hormônios (Pinto et al, 2014). Estrógenos são importantes reguladores de mudanças fisiológicas associadas a reprodução em ambos sexos, além de regular também muitos outros processos fisiológicos como função imune e homeostase mineral (Guerreiro et al, 2002; Lange et al, 2002).

Uma série de compostos capazes de interferir no sistema estrógeno foram identificados e são classificados como disruptores endócrinos. Alguns desses disruptores endócrinos são capazes de se ligar aos receptores estrógenos e mimetizar ou bloquear a ação normal desse hormônio (Marino et al, 2012; Roper et al, 2006; Tabb et al, 2006).

No modelo de ação clássicos dos estrógenos (Figura 1) os receptores estrógenos (ER) regulam a expressão gênica no núcleo da célula alvo através da ligação do elemento de resposta estrogênica (ERE) no promotor de determinados genes. (Bjornstrom et al, 2005; Laurentino et al, 2012), ou ainda ligando-se a

diferentes fatores de transcrição ou receptores de membrana levando a alterações na expressão gênica ou ativação direta de algumas enzimas (Watson et al, 2007; Roper, 2006).

Figura 1. Esquema do possível mecanismo celular de ação dos estrógenos naturais (17β -estradiol, E₂, P. EX) e disruptores endócrinos estrogênicos (EDCs). (A), um ligante estrogênico liga-se e ativa um RE intracelular (ER α , ER β a ou ER β b), que dimeriza no núcleo e liga-se ao elemento de resposta estrogênica na região promotora de genes alvo, regulando a sua expressão através do recrutamento de possíveis co-reguladores célula-específicos. Um mecanismo alternativo inclui: (B) regulação indireta da expressão gênica através da interação dos ligantes de ER a outros fatores de transcrição (TF); (C,D) ação estrógeno iniciada pela ligação a receptores de membrana (ERs ou receptores acoplados a proteína G- GPER, p. ex) e ativação da cascata da proteína quinase ou alterações em outros segundo mensageiros resultando na (C) ativação de fatores de transcrição que modulam a expressão gênica ou (D) efeitos rápidos não-genômicos como a ativação de enzimas específicas. Os ER podem ser ativados e regular a expressão gênica de forma independente de ligante (E) através da fosforilação (P) em resposta a ligação de fatores de crescimento aos receptores de membrana. cAMP, AMP cíclico; PKA, proteína quinase A; PLC, fosfolipase C; IP₃, inositol 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C. Fonte: Pinto et al, 2014.

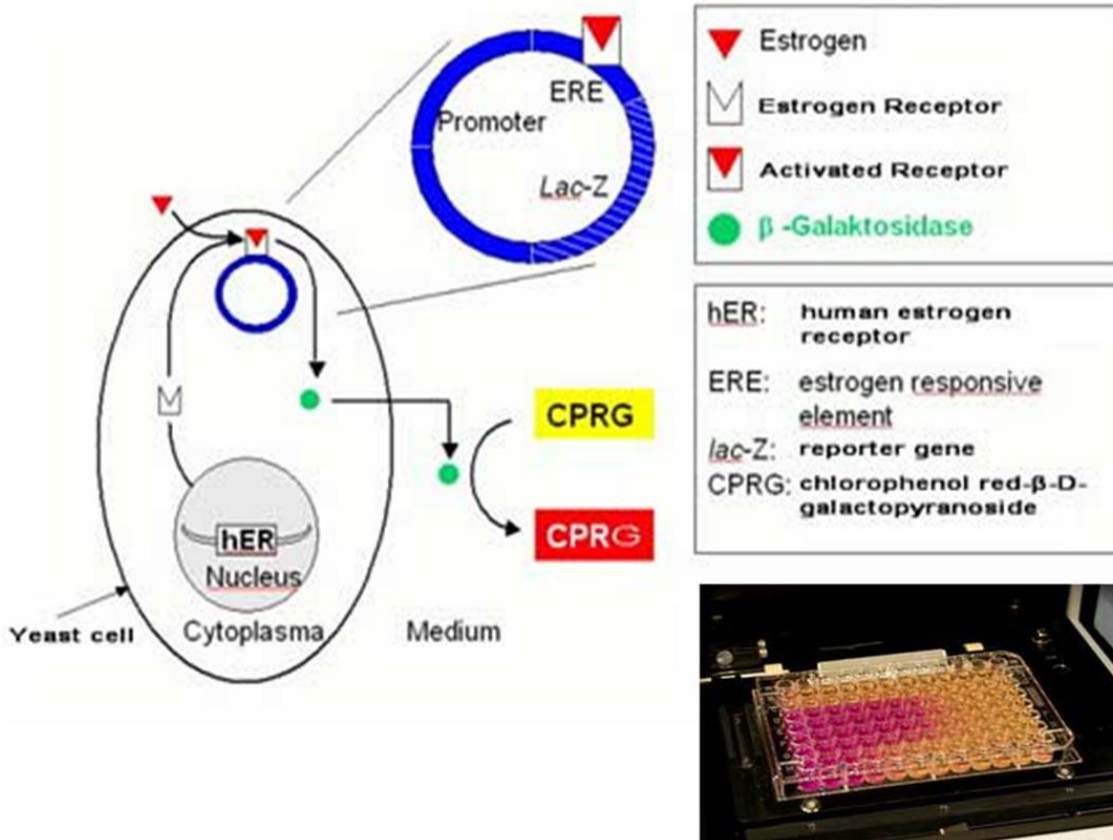


Atualmente existem diversos ensaios já padronizados que buscam auxiliar

na identificação de disruptores endócrinos estrogênicos, auxiliando na avaliação de segurança de produtos e seus efluentes. O ensaio ER-CALUX é composto por células T47D de adenocarcinoma de mama humano com receptor de estrogênio (RE) endógeno, o qual são transfectadas estavelmente com um gene repórter de luciferase (*Luc*) estrogênio-responsivo. No ensaio, no interior das células, as substâncias estrogênicas se ligam aos RE endógenos ativando-os. Com isso, o complexo ligante-receptor se liga aos elementos responsivos ao estrogênio (EREs) presentes na região do promotor do gene da luciferase, conduzindo a expressão do gene da luciferase. A enzima luciferase é liberada pela lise das células, que metaboliza o substrato luciferina e a luz produzida pode ser medida em um luminômetro (LEGLER *et al.*, 2002). Um prestador de serviços e fornecedor dessa metodologia é a Bio Detection Systems (<http://www.biodetectionsystems.com>).

Routledge e Sumpter (1996) desenvolveram um ensaio, chamado YES (*yeast estrogen-inducible expression system* ou *recombinant yeast estrogenic system*), em que foi inserido o gene do receptor de estrogênio humano (hRE) no genoma da levedura de forma estável, além da introdução de um plasmídeo contendo o elemento de resposta de estrogênio (ERE) e um gene repórter lacZ, o qual codifica a enzima galactosidase, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Um ligante ativo (o qual tenha a capacidade de acoplar-se ao hRE) induz a expressão da β -galactosidase (Figura 2). A enzima galactosidase metaboliza o substrato cromogênico clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosida (CPRG) presente no meio, gerando um produto com tons entre amarelo e vermelho, cuja absorbância é medida a 540nm. A produção de β -galactosidase no meio depende da quantidade de substância estrogênica. A medida da absorbância pela espectrofotometria pode estimar a quantidade de substância estrogênica no meio de análise. As vantagens dos ensaios YES são suas especificidade, sensibilidade, capacidade de realizar a análise de grande quantidade de amostras com processo de fácil manuseio, uma vez que as células não precisam ser continuamente transformadas. Pode-se adquirir o Kit com a linhagem de levedura transformada para detecção de estrogênos e andrógenos através do fornecedor Aniara (<http://www.aniara.com/>).

Figura 2. Modelo representando o ensaio YES para detecção de estrógeno. Foto com resultado típico. Fonte: [http://www. engineering.auckland.ac.nz/uoa/water-pollution-assessment.](http://www.engineering.auckland.ac.nz/uoa/water-pollution-assessment)



A internalização e validação de ensaios luminescentes é de extrema importância para a indústria cosmética que vem sendo questionada sobre possível componentes de cosméticos que possuiriam ação estrogênica. Uma categoria bastante questionada são a dos filtros UV, que possuem importância irrefutável na

prevenção dos danos dos raios solares à saúde da pele. Diversos filtros UV veem sendo identificados como ação estrógena em animais como ratos, *Xenopus laevis*, Japanese quail (*Coturnix japonica*), *Chironomus riparius* (Meigen) e peixes (Schlumpf et al, 2001; Kunz et al, 2004; Morohoshi et al, 2005; Suzuki et al, 2005; Molina-Molina et al, 2008; Weisbrod, 2008 e Kunz et al, 2006). Um resumo dos últimos estudos relativos a esses filtros e seus efeitos estrogênicos estão sumarizados na Tabela I.

Tabela I. Estrogenicidade de famílias de filtros UV.

Filtro UV	Efeitos como disruptor endócrino estrogênico
Benzofenonas	Ativação de $E\alpha$; inibição da atividade da 17β -estradiol; indução de proliferação de células MCF-7; redução do volume uterino em ratos.
Derivados de Cânfora	Ativação de $E\alpha$; inibição da atividade da 17β -estradiol; indução de proliferação de células MCF-7; indução da expressão de pS2 em células MCF-7; redução do volume uterino em ratos; indução de VfG em peixes
Derivados de Cinamato	Ativação de $E\alpha$; inibição da atividade da 17β -estradiol; indução de proliferação de células MCF-7; redução do volume uterino em ratos; idução de VfG em peixes

VfG; vitelogenina. Fonte: Wang et al, 2016.

2. OBJETIVO

Diante da importância da identificação de potenciais disruptores endócrinos com ação estrogênica em cosméticos o objetivo do presente projeto é internalizar e validar com 24 substâncias referência o ensaio de *PERFORMANCE-BASED*

TEST GUIDELINE FOR STABLY TRANSFECTED TRANSACTIVATION IN VITRO ASSAYS TO DETECT ESTROGEN RECEPTOR AGONISTS AND ANTAGONISTS (OECD 455) adotado e validado pela OECD em 2016 no Laboratório de Métodos Alternativos do Grupo Boticário.

3 MÉTODO

O método será seguido conforme OECD 455 (2016) seguindo critérios de boas práticas em laboratório e instruções do Guideline do anexo I.

a. Cultivo Celular

Será utilizada a linhagem hER α -HeLa-9903 que deverá ser obtida junto ao Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank.

As células serão mantidas em meio Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) sem vermelho fenol, suplementado com 60 mg/L de kanamycine e 10% soro fetal bovino (DCC-FBS), em uma incubadora de CO₂ (5% CO₂) a 37 \pm 1°C. Na confluência entre 75 -90% a célula será subcultivada (10 mL of 0.4 x 10⁵ – 1 x 10⁵ células/mL em placas de cultivo de 100mm, podendo ser mantida por até 40 passagens. As células deverão ser ressuspensas no meio 10% FBS-EMEM e plaqueado em poços de placa de 96 poços num volume de 100 μ L numa densidade de 1 x 10⁴ células. Após as células serão pré-incubadas por 3 horas antes da exposição aos químicos. Deve-se garantir que o plástico utilizado seja livre de atividade estrogênica.

b. Preparo das substâncias teste

Deverão ser solubilizados em DMSO, ou no solvente específico indicado, numa concentração 1:10 para o preparo das diluições seriadas.

c. Citotoxicidade

Deverá ser realizado o ensaio de vermelho neutro descrito a seguir, aceitando como concentração máxima em que se observa uma redução de até 20% na viabilidade celular.

Para essa avaliação os químicos diluídos 1:10 e diluídos numa razão de 3,14 serão testados em 8 concentrações em placas de 96 poços. Após o período de tratamento de 24 horas, o meio de cultivo será removido e os poços lavados com PBS. A solução do corante vermelho neutro (50 µg/ml) diluída em meio de cultivo será adicionada às células. Após o tempo de captura de 3 horas à 37°C, o corante será removido e as células lavadas duas vezes com solução de D-PBS e o corante será eluído das células com ácido acético-etanol por 15 minutos. Em seguida a leitura da absorbância será realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

d. Adição das substâncias teste

Cada químico deverá ser serialmente diluído em DMSO preferencialmente na maior concentração com citotoxicidade aceita, de forma seriada, utilizando 1,5 µl da substância teste em 500 µl de meio de cultivo. Adicione 50 µl dessa diluição no poço do ensaio contendo 10^4 células por poço.

e. Ensaio luminescente

Será utilizado um kit comercial de luciferase (Promega, E2510), seguindo as instruções do fabricante.

4 CRONOGRAMA

	Revisão bibliográfica	Treinamento em BPL e cultivo celular	Compra de Material	Testes de Solubilidade	Testes de Citotoxicidade	Execução do Método	Análise dos Dados	Escrita do Relatório
2018								
Setembro								
Outubro								
Novembro								
Dezembro								
2019								
Janeiro								
Fevereiro								
Março								
Abril								
Maiο								
Junho								
Julho								
Agosto								
Setembro								

5 PRINCIPAIS CONTRIBUIÇÕES CIENTÍFICAS/TECNOLÓGICAS DA PROPOSTA

A entrega do projeto entregara um método de rotina para avaliação de segurança de produtos cosméticos no que diz respeito a estrogénicidade das matérias-primas e impurezas dos componentes dessa indústria.

6 REFERÊNCIAS

Bjornstrom, L.; Sjoberg, M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: Convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* 2005, 19, 833–842.

Guerreiro, P.M.; Fuentes, J.; Canario, A.V.; Power, D.M. Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): The effect of oestradiol-17beta. *J. Endocrinol.* 2002, 173, 377–385.

Janosek J. , K. Hilscherova, L. Bla'ha, I. Holoubek. Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 20 (2006) 18–37.

Kunz, P.Y.; Fent, K. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquat. Toxicol.* 2006, 79, 305–324.

Kunz, P.Y.; Galicia, H.F.; Fent, K. Assessment of hormonal activity of UV filters in tadpoles of frog *Xenopus laevis* at environmental concentrations. *Mar. Environ. Res.* 2004, 58, 431–435.

Kunz, P.Y.; Galicia, H.F.; Fent, K. Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish. *Toxicol. Sci.* 2006, 90, 349–361.

Lange, I.G.; Hartel, A.; Meyer, H.H. Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2002, 83, 219–226.

Laurentino, S.S.; Pinto, P.I.; Correia, S.; Cavaco, J.E.; Canario, A.V.; Socorro, S. Structural variants of sex steroid hormone receptors in the testis: From molecular biology to physiological roles. *OA Biotechnol.* 2012, 1, 4.

Marino, M.; Pellegrini, M.; La Rosa, P.; Acconcia, F. Susceptibility of estrogen receptor rapid responses to xenoestrogens: Physiological outcomes. *Steroids* 2012, 77, 910–917.

Molina-Molina, J.M.; Escande, A.; Pillon, A.; Gomez, E.; Pakdel, F.; Cavailles, V.; Olea, N.; Ait-Aissa, S.; Balaguer, P. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 232, 384–395.

Morohoshi, K.; Yamamoto, H.; Kamata, R.; Shiraishi, F.; Koda, T.; Morita, M. Estrogenic activity of components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicol. in Vitro* 2005, 19, 457–469.

Pinto, Patricia I. S.; Estêvão; Maria e Power, Deborah M. Effects of Estrogens and Estrogenic Disrupting Compounds on Fish Mineralized Tissues. *Mar. Drugs* 2014, 12, 4474-4494.

Ropero, A.B.; Alonso-Magdalena, P.; Ripoll, C.; Fuentes, E.; Nadal, A. Rapid endocrine disruption: Environmental estrogen actions triggered outside the nucleus. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2006, 102, 163–169.

Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B.; Lichtensteiger, W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 2001, 109, 239–244.

Suzuki, T.; Kitamura, S.; Khota, R.; Sugihara, K.; Fujimoto, N.; Ohta, S. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005, 203, 9–17.

Tabb, M.M.; Blumberg, B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol. Endocrinol.* 2006, 20, 475–482.

Wang, Jiaying; Pan, Liumeng; Wu, Shenggan; Lu, Liping; Xu, Yiwen; Zhu, Yanye; Guo, Ming e Shulin Zhuang. Recent Advances on Endocrine Disrupting Effects of UV Filters. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2016, 13, 782.

Watson, C.S.; Alyea, R.A.; Jeng, Y.J.; Kochukov, M.Y. Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007, 274, 1–7.

Weisbrod, C.J.; Kunz, P.Y.; Zenker, A.K.; Fent, K. Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007, 225, 255–266.

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**PERFORMANCE-BASED TEST GUIDELINE FOR STABLY TRANSFECTED
TRANSACTIVATION *IN VITRO* ASSAYS TO DETECT ESTROGEN RECEPTOR AGONISTS
AND ANTAGONISTS****GENERAL INTRODUCTION****Performance-Based Test Guideline**

1. This Performance-Based Test Guideline (PBTG) describes the methodology of Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists (ER TA assays). It comprises several mechanistically and functionally similar test methods for the identification of estrogen receptor (i.e. ER α , and/or ER β) agonists and antagonists and should facilitate the development of new similar or modified test methods in accordance with the principles for validation set forth in the OECD Guidance Document (GD) on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (1). The fully validated reference test methods (Annex 2 and Annex 3) that provide the basis for this PBTG are:

- The Stably Transfected TA (STTA) assay (2) using the (h) ER α -HeLa-9903 cell line; and
- The VM7Luc ER TA assay (3) using the VM7Luc4E2 cell line¹ which predominately expresses hER α with some contribution from hER β (4) (5).

For the development and validation of similar test methods for the same hazard endpoint, performance standards (PS) (6) (7) are available and should be used. They allow for timely amendment of this PBTG so that new similar test methods can be added to an updated PBTG; however, similar test methods will only be added after review and agreement that performance standards are met. The test methods included in this Test Guideline can be used indiscriminately to address countries' requirements for test results on estrogen receptor transactivation while benefiting from the Mutual Acceptance of Data.

¹ Before June 2016, this cell line was designated as BG1Luc cell line. BG-1 cells were originally described by Geisinger et al. (1998) (35) and were later characterized by researchers at the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) (36). Relatively recently, it was discovered that there exist two different variants of BG-1 cells being used by researchers, BG-1 Fr and BG-1 NIEHS. In-depth analysis, including DNA testing, of these two BG-1 variant cell lines carried out by Li and coworkers (2014) (37) showed that the BG-1 Fr was unique and that the BG-1 NIEHS, i.e. the original cell line used to develop the assay, was not the BG1 human ovarian carcinoma cell line, but was instead a variant of the MCF7 human breast cancer cell line. The cell line used in the assay, originally referred to as BG1Luc4E2 (38), will now be designated as VM7Luc4E2 ("V" = variant; "M7" = MCF7 cells). Likewise, the assay will now be designated as the VM7Luc ER TA. While this changes the origin of the cell line upon which the assay is based, it does not affect published validation studies nor the utility and application of this assay for screening of estrogenic/anti-estrogenic chemicals.

