

UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Ederson Constantino

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO FINASTERIDA E *BLEND* CONTENDO FATORES DE
CRESCIMENTO PELO PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE
(TESTE DE AMES)**

Sorocaba/SP

2020

Ederson Constantino

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO FINASTERIDA E *BLEND* CONTENDO FATORES DE
CRESCIMENTO PELO PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE
(TESTE DE AMES)**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco

Sorocaba/SP

2020

Ficha Catalográfica

Constantino, Ederson
C774e Efeito da associação finasterida e *blend* contendo fatores de crescimento pelo parâmetro da mutagenicidade (teste de Ames) / Ederson Constantino. – 2020.
81 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Yoko Oshima Franco
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2020.

1. Calvície. 2. Medicamentos – Administração. 3. Finasterida. 4. Testes de mutagenicidade. 5. Dermatologia. I. Oshima-Franco, Yoko, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

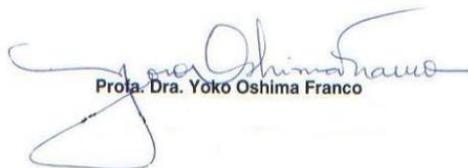
Ederson Constantino

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO FINASTERIDA E *BLEND* CONTENDO FATORES DE
CRESCIMENTO PELO PARÂMETRO DA MUTAGENICIDADE
(TESTE DE AMES)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba.

Aprovado em: 13/11/2020.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dra. Yoko Oshima Franco

Professora Doutora Yoko Oshima Franco
Universidade de Sorocaba – Uniso



Professor Doutor Edson Hideaki Yoshida
Centro Universitário Sudoeste Paulista – Itapetininga



Professor Doutor Rômulo Tadeu Dias de Oliveira
Universidade de Sorocaba - Uniso

Dedico a minha mãe, por me ensinar que sem luta nada somos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da perseverança no decorrer da vida e desses dois anos de curso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Yoko Oshima Franco, pela confiança depositada em mim. Aprendi muito com a senhora, sou grato imensamente por ter me escolhido para realizar este trabalho sob sua parceria e orientação, por suas contribuições e conhecimentos passados durante todo o tempo.

À Caroline Malavasi Barros, bolsista ProbiC/Uniso de Iniciação Científica, que me ajudou de forma consistente no desenvolvimento dos trabalhos práticos sem medir esforços. Sua contribuição foi essencial!

À querida Jaqueline de Cássia Proença Assunção, nos conhecemos no mestrado e se tornou uma amiga para a vida. Foi meu ombro amigo nas dificuldades durante as aulas e trabalhos e sempre me incentivou de forma muito positiva.

À toda equipe do LaPeNM, em especial Edson Hideaki Yoshida, Natália Tribuiani, Anna Paula Farias de França e Débora Antunes Neto Moreno, vocês são uma verdadeira família, estavam sempre prontos para ajudar, apoiar e incentivar quando o cansaço e as dificuldades apareciam.

À querida Valéria de Campos Orsi e aos técnicos dos laboratórios do Apoio 2, que em cada fase desse estudo estiveram presentes auxiliando onde eu precisava.

À médica Dra. Estrela D'Aurea Machado por contribuir com seu conhecimento e com a doação dos insumos tão importantes para a realização deste estudo.

Também agradeço a minha colega de trabalho e companheira nas aulas a Profa. Audrey Stefani Naufal Hernandez por me apoiar e incentivar em concluir esta importante caminhada.

Aos professores pela contribuição nas aulas e à Universidade de Sorocaba pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos, à qual serei sempre honrado e grato, que me permitiu a realização deste trabalho e minha capacitação profissional.

O apoio de vocês foi fundamental para o êxito deste projeto.

A minha imensa gratidão a todos, pela dedicação, compreensão, profissionalismo e orientações!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A alopecia androgenética (AAG) é uma condição que interfere na qualidade de vida, na autoestima e na vida social do indivíduo acometido. A busca pelo melhor tratamento para erradicar ou minimizar a queda de cabelo depende da segurança do seu uso. Para aferir segurança a um composto ou a uma mistura deve-se conhecer a sua toxicidade, incluindo a genotoxicidade, e o ensaio *Salmonella*/microsoma é recomendado para esta finalidade. **Objetivos:** O objetivo desse estudo foi verificar a segurança da combinação finasterida com um *blend* contendo fatores de crescimento, através do parâmetro *Salmonella*/microsoma (teste de Ames). **Metodologia:** As concentrações de Finasterida (50 mg/mL), *blend* de fatores de crescimento (1,2 mg/0,1 mL) e a associação Finasterida + *blend* (50 mg/mL, cada) foram preliminarmente ensaiadas em limite máximo preconizado pelas agências regulatórias (5 mg/placa) com a linhagem *S. typhimurium* TA100 para o teste de toxicidade. Posteriormente realizou-se o ensaio em linhagens de TA97a, TA98, TA100 e TA102, na ausência (-S9) e na presença (+S9) de ativação metabólica exógena. Os resultados foram analisados estatisticamente com controles (positivo de cada linhagem, negativo e espontâneo) e os índices de mutagenicidade ($IM \geq 2,0$) calculados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. **Resultados:** Os valores máximos de 5 mg/placa de Finasterida, do *blend* e da associação não apresentaram toxicidade à linhagem TA100. No Teste de Ames, sem ativação metabólica, a finasterida, o *blend* e a associação não se mostraram mutagênicos nas linhagens testadas. Na presença de ativação metabólica, o *blend* apresentou mutagenicidade dependente da concentração, sendo segura de 0,12 a 0,000012 mg/placa após sofrer diluições em série. Entretanto, quando em mistura com concentração fixa de finasterida (5 mg/placa), o resultado foi positivo para a linhagem TA98 e TA100, indicando a participação de metabólitos da finasterida na mutagenicidade. **Conclusão:** O *blend* comercial estudado não mostrou ser um mutágeno direto, por não apresentar mutagenicidade na ausência de ativação metabólica. Entretanto, na presença de ativação metabólica, concentrações $\geq 1,2$ mg/placa do *blend* resultaram em falso-positivo de mutagenicidade por conter em sua composição, histidina no complexo de cobre, que foi completamente atenuado em concentrações de 0,12 a 0,000012 mg/placa, consideradas seguras. Mesmo em concentrações seguras do *blend*, a associação com a finasterida induziu mutação reversa nas cepas TA98 e

TA100 (+S9), cujas evidências da literatura, pode ter sido causada pelo metabólito finasterida- ω -ácido-óico.

Palavras-chave: Alopecia. Mutagenicidade. Teste de Ames. Finasterida. Fatores de Crescimento. *Salmonella*/microsoma.

ABSTRACT

Introduction: Androgenetic alopecia (AGA) is a condition that interferes with the quality of life, self-esteem and social life of the affected individual. The search for the best treatment to eradicate or minimize hair loss depends on the safety of its use. To measure safety to a compound or mixture, its toxicity, including genotoxicity, should be known and the Salmonella/microsome assay is recommended for this purpose.

Objectives: The aim of this study was to verify the safety of the combination finasteride with a blend containing growth factors, through the Salmonella/microsome parameter (Ames test).

Methodology: Finasteride (50 mg/mL) concentrations, blend of growth factors (1.2 mg/0.1 mL) and finasteride + blend (50 mg/mL each) were preliminary tested at the maximum limit recommended by the regulatory agencies (5 mg/plate) with the *S. typhimurium* TA100 strain for the toxicity test. Subsequently, the assay was performed in ta97a, TA98, TA100 and TA102 lines, in the absence (-S9) and in the presence (+S9) of exogenous metabolic activation. The results were statistically analyzed with controls (positive of each lineage, negative and spontaneous) and the mutagenicity indexes ($IM \geq 2.0$) calculated. All trials were performed in triplicate.

Results: The maximum values of 5 mg/finasteride plate, blend and association showed no toxicity to the TA100 strain. In the Ames Test, without metabolic activation, finasteride, blend and association were not mutagenic in the tested strains. In the presence of metabolic activation, the blend presented concentration-dependent mutagenicity, being safe from 0.12 to 0.000012 mg/plaque after undergoing serial dilutions. However, when mixed with fixed finasteride concentration (5 mg/plate), the result was positive for the TA98 and TA100 strain, indicating the participation of finasteride metabolites in mutagenicity.

Conclusion: The commercial blend studied did not show to be a direct mutagen, because it did not present mutagenicity in the absence of metabolic activation. However, in the presence of metabolic activation, concentrations of ≥ 1.2 mg/plate of blend resulted in false-positive mutagenicity because it contained in its composition, histidine in the copper complex, which was completely attenuated at concentrations of 0.12 to 0.000012 mg/plate, considered safe. Even at safe blend concentrations, the association with finasteride induced reverse mutation in the TA98 and TA100 strains (+S9), whose evidence in the literature may have been caused by the finasteride- ω -acid-oic metabolite.

Keywords: Alopecia. Mutagenicity. Ames test. Finasteride. Growth Factors. Salmonella/microsome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura do folículo piloso.	19
Figura 2:	Fases do crescimento capilar.	21
Figura 3	Alopecia Areata (AA).	24
Figura 4:	Miniaturização dos fios de cabelos.	26
Figura 5:	Escala Norwood - Padrão de alopecia no sexo masculino.	29
Figura 6:	Escala de Hamilton - Padrão de alopecia no sexo feminino.	30
Figura 7:	Inibidor de 5-alfa-redutase.	35
Figura 8:	Ação da di-hidrotestosterona (DHT) no folículo piloso após conversão pela enzima 5-alfa-redutase e miniaturização do folículo piloso.	36
Figura 9:	Fatores de crescimento para estímulo folicular.	38
Figura 10:	Crescimento de colônias representativas de revertentes (His ⁺) em (A), controle negativo e (B), controle positivo.	49
Figura 11:	Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas com prévia incubação.	53
Figura 12:	Controles positivo (A) e negativo (B) da linhagem TA100	59
Figura 13:	Revertentes menor e maior concentração (+S9) – <i>Blend</i> – TA97a, TA98, TA100 E TA102.	63
Figura 14:	Controle positivo (c+) das linhagens com ativação metabólica (+S9) - TA97a, TA98, TA100 E TA102.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação das alopecias.	23
Tabela 2:	Características genóticas e fenotípicas para ensaio de Teste de Ames.	41
Tabela 3:	Taxa de reversão espontânea por placa.	45
Tabela 4:	Resultados da toxicidade preliminar do Finasterida.	57
Tabela 5:	Resultados da toxicidade preliminar do <i>Blend</i> .	58
Tabela 6:	Resultados Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) - Finasterida (TA97a; TA98; TA100; TA102).	59
Tabela 7:	Resultados do Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) - <i>Blend</i> (TA97a; TA98; TA100; TA102)	60
Tabela 8:	Resultados do Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) - Mistura: Finasterida + <i>Blend</i> (TA97a; TA98; TA100; TA102).	60
Tabela 9:	Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) - Mistura Finasterida + <i>Blend</i> (TA97a; TA98; TA100; TA102).	61
Tabela 10:	Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) - <i>Blend</i> (TA97a; TA98; TA100; TA102).	62
Tabela 11:	Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) - <i>Blend</i> (diluição) (TA97a; TA98; TA100; TA102).	66
Tabela 12:	Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) - Mistura: Finasterida + <i>Blend</i> (diluição) (TA97a; TA98; TA100; TA102).	66

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	17
2.1	O cabelo e o folículo piloso	17
2.1.1	Aspectos gerais	17
2.1.2	Anatomia do folículo piloso	17
2.1.3	Tipos de folículo piloso	19
2.1.4	Ciclos de crescimento capilar	20
2.1.5	Distúrbios associados ao folículo piloso	22
2.2	Alopecia	22
2.2.1	Aspectos gerais	22
2.2.2	Alopecia Androgenética (AAG)	25
2.2.2.1	Fatores desencadeantes	27
2.2.2.2	Apresentação clínica da AAG	28
2.2.2.3	Padrão de apresentação da AAG	29
2.2.3	Fatores genéticos	31
2.2.4	Impacto psicológico da alopecia	32
2.3	Tratamentos da AAG	33
2.3.1	Tratamento medicamentoso	33
2.3.1.1	Finasterida	34
2.3.1.1.1	Propriedades físico-químicas	34
2.3.1.1.2	Mecanismo de ação	35
2.3.1.2	Fatores de crescimento	36
2.3.1.2.1	Fatores de crescimento bioidênticos	37
2.4	Estratégia para o tratamento da AAG	38
2.5	Teste de Ames	40
3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	43
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo Geral	43
4.2	Objetivos Específicos	43
5	MATERIAL E METODOS	44
5.1	Fármacos	44

5.1.1	Finasterida	44
5.1.2	<i>Blend</i>	44
5.1.3	Linhagens de <i>Salmonella Typhimurium</i>	44
5.2	Preparo e Procedimentos Experimentais	45
5.2.1	Preparo dos inóculos de <i>S. typhimurium</i>	45
5.2.2	Meios de cultura e soluções	45
5.2.2.1	Caldo nutriente	45
5.2.2.2	Top agar	46
5.2.2.3	Solução de Biotina/Histidina (0,5 mM)	46
5.2.2.4	Agar mínimo nutriente	46
5.2.2.5	Solução de sais de Vogel Bonner (VB)	46
5.2.2.6	Soluções de Glicose a 40 % e 8 %	47
5.2.2.7	Tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4	47
5.3	Mistura S9	47
5.3.1	β -NADP (β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato)0,1 M	48
5.3.2	G6P (Glicose-6-fosfato) 1M	48
5.3.3	Solução de KCl 1,65 M	48
5.3.4	Solução de MgCl ₂ 0,4 M	48
5.3.5	Fração Microssomal S9	48
5.4	Controles negativos e positivos	49
5.4.1	NPD (4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamino)	50
5.4.2	NaN ₃ (Azida sódica)	50
5.4.3	MMC (Mitomicina C)	50
5.4.4	2-AA (2-aminoantraceno)	50
6	PROTOCOLO DE ENSAIO	52
6.1	Teste Preliminar de Toxicidade	52
6.2	Teste de Ames pelo método de incorporação em placas com prévia incubação	52
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
8	RESULTADOS	56
8.1	Teste de toxicidade preliminar – Finasterida	56
8.1.1	Cálculo para definição das concentrações de Finasterida	56
8.2	Teste de toxicidade preliminar – <i>Blend</i>	57

8.2.1	Cálculo para definição das concentrações do <i>Blend</i>	57
8.3	Teste de AMES - Finasterida, <i>Blend</i> e Mistura (-S9)	59
8.4	Teste de AMES – Mistura: Finasterida + Mistura (+S9)	61
8.5	Cálculo para a definição das concentrações em nanogramas do <i>blend</i> .	65
8.6	Teste de Ames – <i>Blend</i> e Mistura em nanogramas (+S9)	65
9	DISCUSSÃO	68
10	CONCLUSÃO	72
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

O cabelo humano tem várias funções como proteção física, isolamento térmico, dispersão de suor e gordura, além de funções sensoriais e táteis (GRUBBS; NASSEREDDIN; MORRISON, 2020).

A humanidade supervaloriza o cabelo e sua importância ultrapassa o mundo da estética. A perda dos cabelos apesar de não causar consequências à saúde física provoca um grande impacto emocional como – estresse psicológico, altos níveis de ansiedade e depressão –, principalmente em mulheres (CALLAND, 2007; VICKERS, 2017).

A alopecia é definida como a perda de cabelos do corpo, abrange uma ampla gama de distúrbios de perda de cabelo, incluindo a alopecia areata e Alopecia androgenética (ORNELAS; SIVAMANI, 2015). A alopecia causa alteração no tempo de seus ciclos naturais, reduz a densidade, o processo de renovação e o surgimento de novos fios. Vários fatores de ordem genética, autoimunes e hormonais podem ocasionar redução parcial ou total de pelos ou cabelos em uma determinada área do corpo (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

O número de folículos pilosos é fixo em homens e mulheres não havendo formação de novos exemplares na idade adulta. O total é estimado em cerca de 100 a 150 mil no couro cabeludo, independentemente de gênero ou raça. A taxa média de crescimento é de 0,4 milímetros ao dia, com variações entre as áreas do couro cabeludo. A velocidade de crescimento tem um aumento entre os cinquenta e setenta anos de idade. Por outro lado, há diminuição do número de folículos por centímetro quadrado (MACHADO, 2011).

Cada folículo possui um ciclo de crescimento distinto que se divide em três fases sendo elas: fase anágena, catágena e telógena. A fase anágena é a fase de crescimento onde há grande síntese de DNA e intensa atividade mitótica; nesta fase encontram-se noventa por cento dos cabelos em condições normais e dura em média de quatro a sete anos. A fase catágena, intermediária, na qual o folículo se prepara para entrar em descanso e o crescimento do cabelo é interrompido. O fio se desconecta da papila e a base do folículo começa a subir em direção à superfície da pele; esta etapa normalmente dura de duas a quatro semanas. A última fase, a telógena, quando o fio está pronto para cair, normalmente ele se solta do folículo quando o cabelo é lavado ou escovado ou quando um novo fio começa a ser produzido

e a crescer no mesmo folículo, empurrando o antigo fio para fora; esta fase tem o tempo médio de três a 4 meses. Para diagnosticar possíveis casos de alopecias é necessário entender esses ciclos (MACHADO, 2011).

De acordo com Machado (2011) entre os diversos tipos de alopecias, a queixa mais comum nos consultórios dermatológicos é a percepção da diminuição da densidade dos cabelos causada por uma queda acentuada dos fios de forma frequente, este é o tipo conhecido com Alopecia Androgenética (AAG).

AAG é a causa mais comum de alopecias em ambos os sexos, sendo mais comum em homens a partir da puberdade, e são causadas por dois fatores principais: níveis andrógenos e fatores genéticos. A testosterona é o andrógeno mais potente, com concentrações superiores em indivíduos do sexo masculino e conversão em di-hidrotestosterona (DHT) por atuação da enzima 5-alfa-redutase (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

De uso recente, os fatores de crescimento foram incluídos entre os medicamentos utilizados no tratamento da alopecia, em conjunto a outros fármacos, para auxiliar no aumento da densidade e da microcirculação e favorecer a diferenciação folicular e a renovação dos fios de cabelos perdidos (KUBANOV; GALLYAMOVA; KORABLEVA, 2017; WEGER; SCHLAKE, 2006). O mercado que atua na tricologia oferece, para o tratamento de alopecias, um *blend* contendo fatores de crescimento (IGF, bFGF, VEGF e Cooper peptide), que promovem o aumento da mitose, crescimento e renovação dos vasos sanguíneos (GENTILE; GARCOVICH, 2019). Faz parte do mecanismo que restaura o fluxo sanguíneo às áreas teciduais proporcionando a oxigenação devido à circulação sanguínea comprometida (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

Em virtude do uso desses fatores de crescimento de forma concomitante a outros fármacos, como acontece com a finasterida, é de extrema relevância se conhecer o potencial mutagênico desta associação, para inferir a segurança de tal uso.

2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

2.1 O Cabelo e o Folículo Piloso

2.1.1 Aspectos Gerais

É frequente a preocupação com o aspecto do sistema tegumentar, ele possui funções importantes que vão além da aparência. O sistema tegumentar recobre o corpo protegendo-o contra a abrasão, a perda de água, a invasão de microrganismos e a radiação ultravioleta (TOBIN, 2016). Também apresenta um papel na percepção sensorial, termorregulação e síntese de vitamina D (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; WELLE; WIENER, 2016).

O sistema tegumentar é constituído pela pele e pelas estruturas anexas, como os folículos pilosos, unhas, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. De fácil observação, o aspecto visual deste pode indicar desequilíbrios fisiológicos orgânicos. Algumas doenças como por exemplo, a alopecia, afetam apenas o sistema tegumentar (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003). Os folículos pilosos são considerados pequenos órgãos que se formam na derme e atravessam a epiderme até a superfície (RISHIKAYSH *et al.*, 2014).

Os pelos são compostos queratinizados (SANTOS; AVCI; HAMBLIN, 2015) que se desenvolvem no folículo piloso, sendo que a sua raiz se encontra na zona mais profunda da derme, enquanto que o seu topo se direciona para a abertura folicular na epiderme (NICOL, 2005). Na fase de crescimento do pelo, o folículo piloso apresenta uma dilatação terminal, que é o bulbo piloso, onde ocorre a divisão celular e, na sua porção central, a papila dérmica, onde as células se diferenciam por queratinização (ZAIDI; WALTON, 2015).

2.1.2 Anatomia do Folículo Piloso

O folículo piloso (Figura 1) é uma estrutura tubular formado por cinco camadas concêntricas de células epiteliais que se estende desde a derme até a epiderme através do estrato córneo (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999).

Em sua base está o bulbo piloso, englobando a papila do bulbo piloso. Na medida em que elas são empurradas a partir do bulbo piloso em direção da superfície

da pele, as três camadas epiteliais internas sofrem queratinização para formar a haste do pelo, enquanto as duas camadas externas formam uma bainha epitelial (YOUNG *et al.*, 2015).

O bulbo piloso é uma proeminência que se expande na base da raiz do pelo. No interior do bulbo piloso encontram-se células epiteliais indiferenciadas, chamada de matriz, que produz o pelo e a bainha radicular epitelial interna. A derme se projeta para o interior do bulbo piloso e contém vasos sanguíneos que irão levar nutrientes e alimentar as células da matriz (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003).

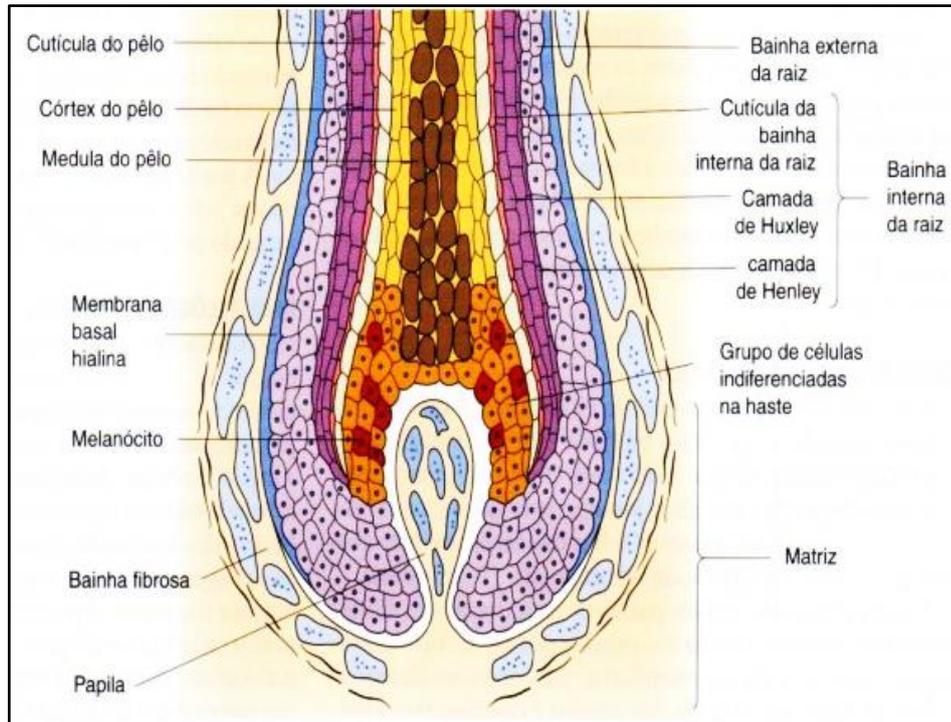
Durante o crescimento ativo do pelo, as células epiteliais que circundam a papila dérmica do bulbo piloso se proliferam para formar as quatro camadas internas do folículo, enquanto a camada mais externa representa uma mera continuação invaginada do estrato basal do epitélio superficial. Toda essa massa epitelial circundando a papila dérmica constitui a raiz do pelo (YOUNG *et al.*, 2015).

As células mais internamente encontradas no folículo, sofrem moderada queratinização para formar a medula do pelo que não é muito visível em pelos muito finos. Ao redor da medula, encontra-se uma camada altamente queratinizada, o córtex, que forma a parte principal do pelo. O córtex é formado por um conjunto de células cilíndricas denominadas de matriz, local onde fica situada a queratina e proteínas. A terceira camada celular do folículo sofre uma intensa queratinização para formar uma dura e fina cutícula na superfície do pelo. A cutícula consiste numa camada externa composta por várias subcamadas separadas por um complexo de células, endocutícula, epicutícula e exocutícula (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1999).

A quarta camada do folículo constitui a bainha radicular interna, as células desta camada tornam-se apenas levemente queratinizadas e desintegram-se no nível dos ductos das glândulas sebáceas, deixando um espaço no qual o sebo é excretado em torno do pelo em maturação. A bainha externa radicular, não participa na formação do folículo piloso, ela está separada da bainha de tecido conjuntivo que circunda o folículo pela membrana basal, uma camada espessa, especializada conhecida como membrana vítrea. Dependendo de sua localização, os folículos pilosos variam em tamanho e forma, porém, todos têm a mesma estrutura base. (YOUNG *et al.*, 2015).

Quando um pelo é arrancado, a bainha radicular epitelial interna também é extraída e se apresenta visivelmente como um tecido esbranquiçado em torno da raiz do pelo. (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003).

Figura 1 - Estrutura do Folículo Piloso.



Fonte: HABIF (2005).

2.1.3 Tipos de Folículo Piloso

Os pelos e os folículos pilosos estão presentes em quase toda a superfície do corpo humano, exceto, nas palmas das mãos, plantas dos pés, mamilos, parte dos órgãos genitais externos e segmentos distais dos dedos das mãos e dos pés (ZAIDI; WALTON, 2015). Humanos tem aproximadamente 5 milhões de folículos e 100 mil deles estão localizados no couro cabeludo (KRAUSE; FOITZIK, 2006).

Os folículos pilosos podem ser caracterizados de diversas formas, de acordo com a forma da fibra capilar, comprimento e tempo de aparecimento no corpo. São eles: o cabelo lanugo, cabelo velo, cabelo intermediário e cabelo terminal (VOGT *et al.*, 2008).

O cabelo lanugo cresce durante o período fetal, que se caracteriza por ser um cabelo fino, macio, pouco pigmentado e sem medula central. O cabelo velo é fino, pouco pigmentado e não possui medula, não penetra profundamente na pele e não atinge, desta forma, a camada subcutânea. Este tipo de cabelo continua a crescer ao longo da vida, mesmo em áreas que geralmente apresentam apenas cabelos

terminais, como o couro cabeludo, sendo que muitas vezes representa entre sete a vinte e cinco por cento do cabelo presente (STRUMÌA *et al.*, 2001).

O cabelo intermediário surge após o nascimento e é caracterizado por ser pouco pigmentado, fino e apresenta medula em parte da sua extensão (VOGT *et al.*, 2008). Com a maturidade e a exposição aos andrógenos, os folículos mudam a morfologia tornando-se folículos terminais que irão produzir os fios de cabelo terminal (STENN; PAUS, 2001).

O cabelo terminal se apresenta com comprimento superior em comparação aos anteriores, além disso, são espessos e pigmentados. O seu folículo atinge a derme profunda, se encontrando com o bulbo e a base da raiz do pelo, localizado na gordura subcutânea (VOGT *et al.*, 2008).

2.1.4 Ciclo de Crescimento Capilar

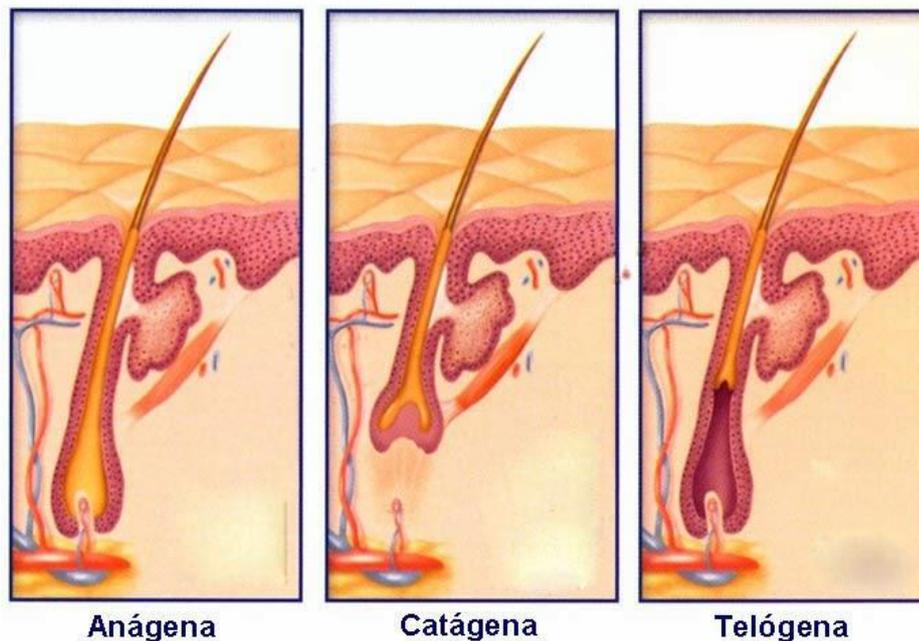
O ciclo de vida do cabelo descreve a mudança de sua morfologia e a mudança histológica do folículo ao longo do tempo (STENN; PAUS, 2001). Diariamente, perdemos entre cinquenta a cem fios de cabelo e sua vida dura, em média, entre dois a sete anos. Cada folículo segue um ciclo de crescimento distinto, ou seja, cada cabelo cresce independentemente do crescimento dos outros. Se os folículos estivessem sincronizados, todos os cabelos cresceriam ao mesmo tempo (SEELEY; STEPHENS; TATE, 2003).

O ciclo se divide em três fases (Figura 2), a anágena - fase de crescimento, a catágena - fase de regressão e a telógena - fase de repouso (Figura 2) (ALONSO; FUCHS, 2006). Na fase da anágena é determinado o comprimento da haste do cabelo, para o qual é necessária contínua proliferação e diferenciação do bulbo piloso situado na extremidade inferior do folículo, se regenerando para voltar a produzir a fibra capilar. Esta fase pode durar de três a sete anos, sendo que o cabelo cresce em média um centímetro por mês (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A segunda fase, a catágena, dura entre duas a três semanas, em que o folículo se retrai, ocorre a conclusão da produção da fibra e sua base migra em direção à superfície da pele. Esta diminuição no ciclo celular ocorre devido ao aumento de apoptose das células epiteliais do bulbo, bainha radicular externa e camada epitelial externa (RISHIKAYSH *et al.*, 2014).

Na fase telógena, não ocorre crescimento do cabelo; porém, o folículo permanece preso por cerca de três meses. Ao final desse tempo, o cabelo cai no momento de lavar ou pentear, podendo então, iniciar uma fase anágena. A transição da fase telógena para a anágena está associada à ativação de células estaminais embrionárias da pele que são estimuladas para fazer o folículo de novo (ALONSO; FUCHS, 2006). No bulbo dos folículos pilosos contém células-tronco pluripotentes, que são ativadas no início de um novo ciclo capilar (NELIGAN; GURTNER, 2015).

Figura 2 - Fases do crescimento capilar.



Fonte: CALLAND (2007).

O cabelo não possui crescimento contínuo, seus ciclos de vida são sucessivos (CHON *et al.*, 2012; PAUS *et al.*, 1999), sendo que noventa por cento dos cabelos, em média, encontram-se na fase anágena, ou seja, em constante crescimento, e dez por cento se encontram na fase telógena (SENNETT; RENDL, 2012).

O cabelo possui uma taxa média de crescimento de 0,4 milímetros por dia, e, apesar de estarem localizados uns próximos aos outros, há uma diferença na rapidez desse crescimento e ao nascer, possuímos aproximadamente cem a cento e cinquenta mil folículos no couro cabeludo e cada um passa em média por vinte e cinco ciclos ao longo da sua vida (MACHADO, 2011). No entanto, sob influência de

hormônios masculinos, podem ocorrer descontroles e estes ciclos podem sofrer alterações (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

2.1.5 Distúrbios Associados ao Folículo Piloso

O folículo piloso pode sofrer algumas disfunções, que podem ser classificadas principalmente em três tipos, alopecia, hirsutismo e problemas relacionados à haste capilar. Alopecia é caracterizada por perda ou afinamento anormal dos cabelos, em contrapartida, o hirsutismo é caracterizado por um crescimento excessivo de pelos em mulheres na idade adulta. Estes transtornos que afetam o crescimento normal dos cabelos são causados por diversos fatores, como o mau funcionamento de uma ou mais vias de sinalização, doenças autoimunes, predisposição genética e infecções microbianas (RISHIKAYSH *et al.*, 2014).

2.2 Alopecia

2.2.1 Aspectos Gerais

Alopecia, popularmente conhecida como calvície, consiste na queda parcial ou total dos pelos ou cabelos e que pode ser muito traumática para pessoas acometidas, tanto do sexo masculino quanto feminino. Pode ocorrer em qualquer local do corpo, mas afeta principalmente o couro cabeludo, sendo que devido ao encurtamento da fase de crescimento (anágena) e ao prolongamento da fase de queda (telógena), a perda do cabelo torna-se mais significativa e persistente, tornando a região mais visível (MIRMIRANI, 2013).

Sabendo que em condições normais possuímos cerca de noventa por cento dos cabelos em fase de crescimento e dez por cento em fase de queda, considera-se normal a perda entre 50 a 100 fios diários para uma densidade média de 250 fios por cm². A perda acima dessa média pode ser considerada como algum tipo de alopecia. (SENNETT; RENDL, 2012).

As alopecias dividem-se em cicatriciais e não cicatriciais. Na alopecia cicatricial ocorre inflamação e perda de folículos pilosos de caráter irreversível, sendo o resultado de doenças da própria pele ou alterações do sistema imune. Na alopecia não cicatricial os folículos pilosos estão preservados e, muitas vezes, pode ser

reversível tendo em vista que a queda do cabelo não origina a destruição do folículo (SPERLING *et al.*, 2015).

As alopecias tem várias causas e diferentes apresentações clínicas, sendo assim, o intuito do tratamento aumentar a cobertura do couro cabeludo ou retardar a progressão da diminuição dos cabelos ou ambas (KEDE; SABATOVICH, 2004).

Steiner (2000) escreve que a classificação das alopecias é realizada segundo as características clínicas, a extensão e a localização ou etiopatogenia, conforme descrito em tabela1:

Tabela 1 - Classificação das alopecias

ALOPECIAS CICATRICIAIS	ALOPECIAS NÃO CICATRICIAIS
1. Genodermatoses	1. Genodermatoses
2. Lúpus eritematoso	2. Infeciosas
3. Líquen Plano Pilar	3. Tricotilomania
4. Pseudopelada de Brocq	4. Alopecia areata
5. Foliculite decalvante	5. Eflúvio anágeno
	6. Alopecia de tração
	7. Eflúvio telógeno agudo e crônico
	8. Alopecia androgenética

Fonte: adaptado de: STEINER (2000).

Os principais tipos de alopecias não-cicatriciais são a tricotilomania, o eflúvio telógeno, alopecia areata e alopecia androgenética (MITEVA; TOSTI, 2012).

A tricotilomania é um transtorno crônico de controle de impulsos caracterizado pela ação de puxar o próprio cabelo, resultando numa perda perceptível de cabelo. Pode gerar irritações cutâneas, infecções e lesões no local acometido, entre os principais afetados, estão os adolescentes e jovens adultos (FRANKLIN; ZAGRABBE; BENAVIDES, 2011).

Dessa forma, também como distúrbio relacionado à quantidade de cabelos, tem-se o eflúvio telógeno, caracterizado pela perda de cabelo devido à existência de transtornos nesta fase. Nesse caso, ocorre uma queda excessiva diária de cabelo, podendo ter como possíveis causas uma doença sistêmica, estresse emocional, perda de peso, deficiência em ferro e/ou vitamina D, doenças inflamatórias do couro

cabeludo ou interrupção de contraceptivos orais e nesses casos o tratamento deve ser centralizado sobre a causa (GORDON; TOSTI, 2011).

Alopecia areata (AA) é uma afecção crônica dos folículos pilosos e das unhas, de etiologia desconhecida, provavelmente multifatorial com evidentes componentes autoimunes e genéticos, podendo haver um pico de incidência entre os 20 e 50 anos, sendo que 60% apresentam o primeiro episódio antes dos 20 anos (RIVITTI, 2005). Nesta afecção, a queda de cabelo dá-se devido à interrupção da sua síntese, sendo por isso reversível, pois não ocorre a destruição ou atrofia dos folículos (GORDON; TOSTI, 2011).

A probabilidade que a alopecia areata seja uma doença autoimune é baseada na presença de linfócitos T ativados no peribulbar do pelo anágeno afetado. A alopecia areata pode estar relacionada a outras doenças como: tireóide, vitiligo, lúpus-eritematoso, anemia perniciosa, colite ulcerativa, miastenia gravis, líquen plano, artrite reumatoide, doença de Addison, polimialgia reumática, síndrome endocrinopatia-cândida (SUCCI, 2004).

Em geral, existe a perda importante de cabelos e presença abrupta de área ou áreas de alopecia. A lesão característica da AA é uma placa lisa com coloração da pele normal atingindo o couro cabeludo ou qualquer área pilosa do corpo, conforme demonstra Succi (2004), Figura 3:

Figura 3 - Alopecia Areata



Fonte: SUCCI (2004).

2.2.2 Alopecia Androgenética

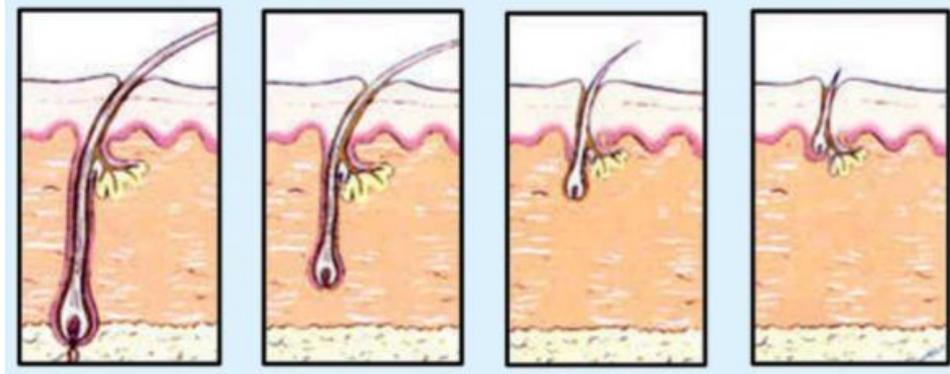
A alopecia androgenética (AAG) tem como características principais a perda progressiva do diâmetro, comprimento e pigmentação do cabelo (GORDON; TOSTI, 2011) e como o próprio nome apresenta, são dois os seus principais fatores de causa: androgênicos e genéticos (RATHNAYAKE; SINCLAIR, 2010).

O termo alopecia descreve uma condição definida pela perda de pelos em determinadas regiões ou em todo o corpo e a alopecia androgênica é um tipo de alopecia caracterizada pela perda progressiva dos pelos localizados no couro cabeludo, ou seja, os cabelos, acometendo cerca de 50% dos homens acima de cinquenta anos de idade e 75% dos homens em idades mais avançadas, sendo também frequente em mulheres, entre 20-30% com graus de expressão variáveis (BLUME-PEYTAVI *et al.*, 1997; TRUEB, 2002).

Essa forma de alopecia é identificada pela Classificação Internacional de Doenças (CID 10) através do código L64. Nessa patologia a queda capilar promove a escassez de cabelos dos indivíduos acometidos através de um padrão de perda bem definido, tanto para homens como para mulheres, sendo essa a causa mais comum de calvície (ROBBINS, 2000).

De acordo com Price *et al.* (2000) e Bienova (2005) os eventos bioquímicos e celulares que desencadeiam a AAG não ocasionam a perda definitiva do cabelo, mas sim uma modificação do ciclo de crescimento capilar. Segundo Bienova *et al.* (2005) quando ocorre o encurtamento da fase anágena (desenvolvimento e crescimento) e um prolongamento da fase telógena (repouso), conduzindo o folículo capilar a um processo progressivo onde se tem como resultado a miniaturização, o qual resulta em um pelo fino e pouco pigmentado tipo velo, em substituição aos pelos terminais, conforme Figura 4.

Figura 4 - Miniaturização dos fios de cabelos.



Fonte: SINCLAIR (2004).

Além disso, existe um fator hereditário para a ocorrência de AAG que modifica a resposta dos folículos pilosos à presença dos andrógenos circulantes, de forma que indivíduos com forte predisposição genética tendem a desenvolver essa condição ainda jovens (SINCLAIR, 2005).

A forma de transmissão da herança genética permanece ainda não completamente esclarecida. Entre as possíveis explicações encontradas estão a herança autossômica dominante entre os homens e autossômica recessiva entre as mulheres, a qual foi o padrão considerado inicialmente. Mais recentemente, a herança poligênica vem sendo considerada a maneira mais provável de ocorrência da AAG (BRENNER; SOARES, 2009; LOBO; MACHADO; SELORES, 2008).

Na literatura, os genes que estão relacionados com a ocorrência da alopecia androgenética são os codificadores das enzimas 5-alfa-redutase, da aromatase e o responsável pelo receptor de androgênios, demonstrando a forte influência da ação dos hormônios andrógenos na ocorrência de AAG, uma vez que esses genes estão diretamente relacionados com o metabolismo desses hormônios (BRENNER; SOARES, 2009).

A ocorrência dessa forma de alopecia acentua-se com o aumento da idade do indivíduo, onde nos homens a recessão da linha frontal do cabelo, ou sua escassez na região do vértex pode começar logo após a puberdade, contudo em alguns casos esse início ocorre em um momento mais tardio e, apenas em uma pequena parcela da população masculina, a calvície não se manifesta (MESSENGER, 2008).

A razão principal pelas alterações do folículo piloso na AAG é a presença de androgênios, pois estes podem chegar à pele através da circulação ou podem ser

produzidos localmente. Tanto os circulantes como os produzidos localmente ligam-se a receptores androgênicos no bulbo do folículo piloso, estes androgênios causam alteração no tamanho da papila dérmica durante a fase anágena, reduzindo a duração da fase e, conseqüentemente, o tamanho do folículo e do cabelo emergente (BRENNER; SOARES, 2009).

2.2.2.1 Fatores desencadeantes

A influência dos andrógenos no desencadeamento da alopecia androgenética já havia sido descrito na antiguidade por Aristóteles, que observou que eunucos não se tornavam calvos (TRUEB, 2002). Os hormônios testosterona e seu metabolito di-hidrotestosterona (DHT) exercem um papel importante nos eventos da AAG por interagir com o receptor de andrógenos nos folículos capilares (MESSENGER, 2008; SINCLAIR, 2004).

A testosterona é convertida em DHT pela enzima 5-alfa-redutase, divididas em isoenzima tipo I e tipo II. Ambas isoenzimas são encontradas nos folículos pilosos do couro cabeludo, porém apresentam distribuição diferente (ELLIS; SINCLAIR; HARRAP, 2002). Nos indivíduos masculinos, o fator mais significativo que pode levar à AAG é a atividade da isoenzima tipo II 5-alfa-redutase, que irá metabolizar a testosterona testicular que circula no sangue em DHT, nos folículos pilosos geneticamente predispostos na região das têmporas e vértice (FISCHER *et al.*, 2012).

Com a ligação da DHT ao receptor de andrógenos ocorre uma mudança conformacional no complexo hormônio-receptor formado, o que promove uma sequência de eventos como a transcrição de genes específicos que sinalizam para a papila dérmica entrar precocemente em fase catágena e subsequentemente na fase telógena. Com isso, ocorre a mudança no ciclo de crescimento capilar e a conseqüente miniaturização desses folículos pilosos (RANDALL, 2007; MESSENGER, 2008).

Evidências que ainda reforçam o envolvimento hormonal na alopecia androgenética são o não desenvolvimento de calvície por parte de indivíduos castrados ou acometidos pela síndrome da deficiência da enzima 5-alfa-redutase e o desenvolvimento de AAG por parte de indivíduos castrados tratados com reposição de hormônios andrógenos (TRUEB, 2002).

A ação hormonal da testosterona e DHT sobre o crescimento dos pelos do corpo ocorrem de forma diferenciada à dos folículos capilares. Após a puberdade, por exemplo, ocorre o engrossamento dos pelos pubianos e das axilas, em ambos os sexos, mediado pela ação dos andrógenos, resultando na conversão dos pelos, tipo velo em pelos terminais (SINCLAIR, 2005).

Por outro lado, os folículos pilosos geneticamente predispostos, apresentam um comportamento inverso ao descrito anteriormente, tendo uma conversão progressiva dos cabelos tipo terminal em cabelos tipo velo, o que confere um efeito biológico paradoxal aos hormônios andrógenos sobre o crescimento capilar (MAIER, 2008; RANDALL, 2007).

No homem, 95% da produção da testosterona circulante ocorre principalmente pelas células intersticiais (ou células de Leydig) presentes nos testículos (BHASIN, 2003). Além disso, a sua secreção também ocorre diretamente pela glândula adrenal juntamente com a conversão periférica de pró-hormônios a testosterona correspondendo aos cinco por cento restantes desse hormônio (BHASIN, 2003).

Na mulher, uma pequena quantidade de testosterona é produzida pelos ovários, pois os andrógenos são compostos intermediários na biossíntese dos hormônios estrogênicos (BHASIN, 2003; BRUGGERMEIER; MILLER; DALTON, 2002).

Em tecidos específicos a enzima 5-alfa-redutase age sobre a testosterona e leva a formação de 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) que é o mais potente hormônio andrógeno (MAIER, 2008).

2.2.2.2 Apresentação Clínica da AAG

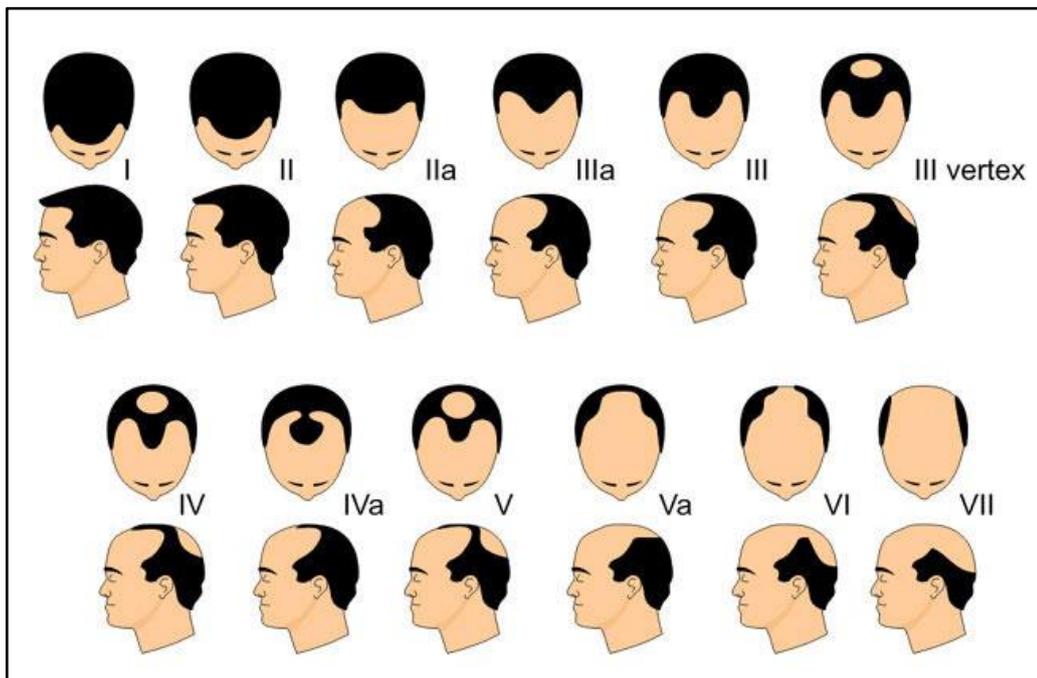
A AAG afeta ambos os gêneros, porém é mais comum nos homens do que nas mulheres, sendo que tem uma prevalência de 30% em homens adultos na faixa dos 30 anos de idade e, em mulheres, com igual idade cerca de 3-6%. Em homens com faixa etária de 50 anos é relatada uma prevalência de 50% e em idades superiores a 70 anos a prevalência é de 70% nos homens e 42% para as mulheres. Verifica-se então, que a patologia passa por um aumento e agravamento com o decorrer da idade (ELLIS, 2002; BLUMEYER *et al.*, 2011).

Os dados epidemiológicos variam de acordo com as etnias, na medida em que a população caucasiana é a mais afetada, numa razão quatro vezes superior à população africana (RAFI; KATZ, 2011).

2.2.2.3 Padrão de apresentação da AAG

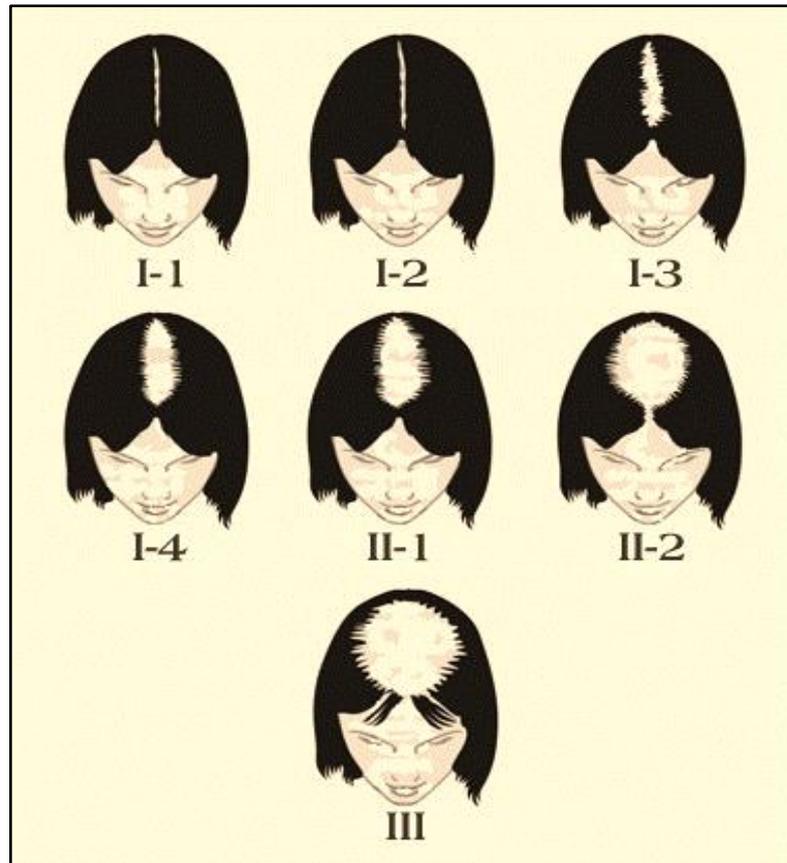
Ao contrário dos outros tipos de alopecias, a queda de cabelo na AAG é definida por um padrão tal qual demonstra a Escala Norwood (Figura 5) e Escala Hamilton (Figura 6), onde este padrão é diferente para homens e mulheres. O mais comum no gênero masculino é o padrão Norwood-Hamilton, onde se verifica uma recessão da linha frontal do cabelo, principalmente num padrão triangular e posteriormente um afinamento no vértice (PEREIRA; SINCLAIR, 2014).

Figura 5 - Escala Norwood - Padrão de alopecia no sexo masculino.



Fonte: MESSENGER (2008).

Figura 6 - Escala de Hamilton - Padrão de alopecia no sexo feminino.



Fonte: PEREIRA; SINCLAIR (2014)

Clinicamente, a AAG pode ser descrita como o resultado da redução gradual do folículo piloso e alteração da dinâmica do ciclo do cabelo e, ao longo do tempo, a duração da fase anágena diminui enquanto a duração da fase telógena aumenta. A duração da fase anágena é o principal determinante no comprimento do cabelo, pois o comprimento máximo do novo cabelo será mais curto do que o do seu antecessor. Esta fase normalmente tem uma duração tão curta que o fio de cabelo não consegue alcançar a superfície da pele, assim o período de latência entre o cabelo em fase telógena e a nova fase anágena torna-se mais longo, o que conduz a uma redução no número de cabelos presentes no couro cabeludo (PEREIRA; SINCLAIR, 2014).

A redução folicular que acompanha estas mudanças de ciclo do cabelo o afeta de modo geral, afetando a papila, a matriz e a haste do cabelo, conduzindo à passagem de um cabelo terminal para um cabelo velo (BLUMEYER *et al.*, 2011).

2.2.3 Fatores Genéticos

Os genes que estão envolvidos na AAG não estão completamente elucidados, no entanto, pensa-se que provavelmente seja uma doença autossômica dominante. Vários estudos têm sido feitos no sentido de conseguir relacionar o fator genético com a AAG. Diversos resultados foram encontrados quanto à dependência de ocorrência AAG com o polimorfismo no gene que codifica a ornitina decarboxilase, a qual desempenha um papel importante na regulação do ciclo do cabelo (CZUBATKA; KIMEĆ, 2014).

Outros estudos sugerem que as variantes genéticas presentes no gene que codifica o receptor androgênico (RA), ou as que estiverem próximas tem um efeito na ocorrência da AAG, sugerido por um aumento da concentração do receptor de androgênio e sua atividade, podem aumentar a sensibilidade à DHT. Quando a DHT se liga aos receptores androgênicos, forma um complexo que entra no núcleo da célula capilar combinando-se com o Ácido Desoxirribonucleico (ADN), levando assim à ativação de genes e à produção de proteínas responsáveis pela transformação gradual de folículos pilosos normais em folículos miniaturizados. Esta transformação faz com que a fase anágena se torne mais curta e alonga o período da fase telógena (CZUBATKA *et al.*, 2014).

Há relatos em que a presença da AAG na mãe ou irmãs do doente é um fator de prognóstico desfavorável, pois demonstraram que o gene EDA2R, localizado no cromossomo X, está associado à frequência de AAG, podendo assim confirmar o impacto dos fatores genéticos herdados da mãe, embora não explicam a herança observada por parte do pai (CASH *et al.*, 1999).

Outros estudos observaram que a transmissão da AAG verificada de pai para filho, levanta a hipótese de que um gene no cromossomo Y pode contribuir para esta condição. Isto se dá pelo fato de que o cromossomo Y determina o sexo e as concentrações de esteroides sexuais, tais como a testosterona e DHT (HUNT; MCHALE, 2005).

Existem estudos que defendem que o aumento da concentração do RA é necessário, mas não suficiente para causar AAG, podendo haver outros genes que controlam a produção de DHT que estejam agindo em conjunto com o RA. Dado que a concentração de 5-alfa-redutase no couro cabeludo calvo se encontra aumentada, os possíveis genes responsáveis e que ainda não foram identificados, poderão ser

genes que codificam fatores de transcrição que regulam a produção de 5 α -redutase (HUNT; MCHALE, 2005).

Para além dos genes relacionados com androgênios, existe muita investigação relativa a genes que estão envolvidos na padronização, sinalização e morfogênese do folículo piloso. Ainda serão necessários muitos avanços nesta área, pois a descoberta de genes que estão envolvidos na predisposição para AAG irá conduzir a tratamentos a níveis molecular e celular, que como não atuam apenas na inibição das enzimas envolvidas no aumento dos androgênios no couro cabeludo calvo, não será uma terapêutica supressiva, mas sim curativa (MESSENGER, 2008).

2.2.4 Impacto psicológico da alopecia

O cabelo é um importante fator da aparência humana para reconhecimento dos indivíduos, símbolo de saúde e juventude, além de ser um fator determinante de atração física, sexualidade, feminilidade ou masculinidade (HURK *et al.*, 2010). Considerando essa importância, a perda de cabelos, embora tenha poucos efeitos nocivos sobre o organismo, pode influenciar psicologicamente o indivíduo acometido pela AAG, desencadeando patologias como ansiedade e a depressão (HUNT; MCHALE, 2005).

Problemas associados com a queda de cabelo também têm direcionado estudos para verificar uma correlação dessa condição com a diminuição na qualidade de vida (WILLIAMSON *et al.*, 2001). Em mulheres, verificou-se que entre os aspectos mais negativos estavam: a incapacidade de arrumar os cabelos, a insatisfação com a aparência e a preocupação com a continuidade da queda de cabelo (GIRMAN *et al.*, 1999).

O sentimento de vulnerabilidade, diminuição da autoestima e alteração da autoimagem também são algumas das implicações causadas pelo desenvolvimento da alopecia, os quais são relatados por uma grande parcela dos pacientes (WILLIAMSON *et al.*, 2001).

Estudos demonstram ainda a influência dos problemas de autoconfiança sobre o cotidiano das pessoas com algum grau de alopecia e essas pessoas tendem a evitar sair de casa e a continuidade dessa condição muitas vezes influencia negativamente até mesmo no ambiente laboral (HUNT; MCHALE, 2005). O sentimento de impotência que é gerado frente à continuidade da doença torna-se um

fator de preocupação entre uma parcela dos pacientes, uma vez que a AAG é uma condição progressiva (GIRMAN, 1999).

Apesar de esta patologia influenciar negativamente a qualidade de vida dos pacientes, o modo como os indivíduos enfrentam o problema ou são acometidos por questões de ordem psicológica varia entre eles. Pessoas inseguras, com histórico prévio de desordens psicológicas e jovens solteiros são mais predispostos a apresentar esses problemas de fundo emocional (CASH *et al.*, 1999).

A busca pelo tratamento pode ser um processo difícil, muitas vezes a postura adotada por alguns médicos, os quais menosprezam a relevância da situação, causa certo descontentamento no paciente, retardando ou inibindo essa busca (MESSENGER, 2008).

2.3 Tratamentos da AAG

2.3.1 Tratamento Medicamentoso

A busca por tratamento para alopecia, representa um sentimento de inconformidade desenvolvido pelo paciente com relação a perda de cabelos progressiva e com sua imagem pessoal, sempre na tentativa de melhorar a autoestima e a auto percepção (CASH, 1999). O uso de artifícios para disfarçar a calvície, como o uso de chapéus e próteses capilares as chamadas perucas, ou o simples ato de arrumar o cabelo também são recursos que, frequentemente, os pacientes fazem uso (SINCLAIR, 2005).

O tratamento para AAG amplamente utilizado são os fármacos que agem sobre as enzimas envolvidas na síntese dos hormônios masculinos e dos receptores androgênicos. Esses fármacos estão amplamente disponíveis na terapêutica, contudo a indicação principal dos mesmos não é no tratamento da AAG, mas sim outras condições como acne e hiperandrogenismo em mulheres, além da hiperplasia ou neoplasia da próstata em homens, patologias as quais são desencadeadas da mesma forma que a alopecia, porém em outros tecidos (BRUEGGEMEIER; MILLER; DALTON, 2002).

A terapêutica medicamentosa para o tratamento da AAG pode ser dividida em dependente e independente de androgênios. Os fármacos dependentes de androgênios agem reduzindo os níveis de testosterona e servem como bloqueadores dos receptores de androgênio ou inibidores da 5-alfa-redutase, já os medicamentos independentes de androgênios desenvolvem a sua ação através de diferentes mecanismos independentes dos fatores hormonais (VAROTHAI; BERGFELD, 2014).

O fármaco mais utilizado de ação sistêmica, aprovado pelo FDA para o tratamento da alopecia androgenética masculina, é a finasterida (SINCLAIR *et al.*, 2005). Os efeitos colaterais observados no tratamento medicamentoso são geralmente relevantes para a adesão ao tratamento, principalmente quando empregados fármacos que competem pela ligação ao receptor de andrógenos (RA). Sinais de feminilização, como a ginecomastia, queda da libido, queda do volume do ejaculado e disfunção erétil, são os efeitos colaterais mais comumente encontrados e indesejados nos homens quando tratados com anti-andrógenos (ROOS; SHAPIRO, 2005; MELLA *et al.*, 2010).

2.3.1.1 Finasterida

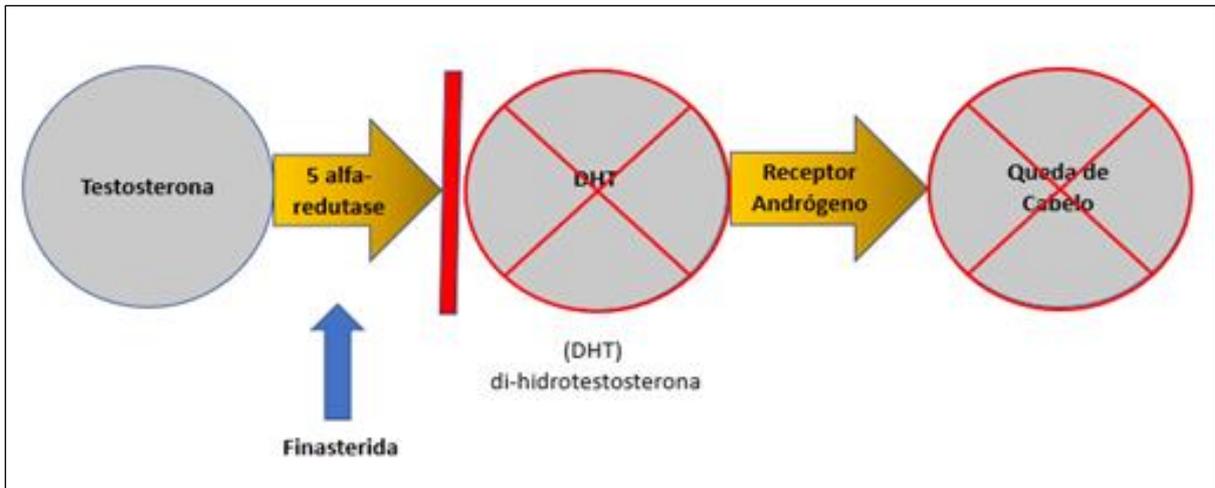
2.3.1.1.1 Propriedades físico-químicas

A finasterida faz parte dos inibidores sintéticos de 5-alfa-redutase tipo II, enzima responsável pela conversão da testosterona em DHT (MCCOY *et al.*, 2012). Entre as propriedades físico-químicas dessa molécula estão a insolubilidade em água e a solubilidade em álcool e diclorometano. A finasterida (Figura 7) se apresenta como um pó cristalino branco que pode exibir polimorfismo, possui peso molecular de 372,5 g/mol e sua nomenclatura química é (5 α ,17 β)-N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-azaandrost-1-ene-17-carboxamide (FARMACOPEIA, 2010). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, a finasterida é pertencente a Classe II (fármacos pouco solúveis e altamente permeáveis) (ALMEIDA; MARQUES, 2011).

2.3.1.1.2 Mecanismo de ação

A ação da finasterida envolve a inibição da conversão da testosterona em DHT nos tecidos onde ocorre a expressão da enzima 5-alfa-redutase (Figura 7) (PEREZ, 2004).

Figura 7 - Inibidor de 5-alfa-redutase.



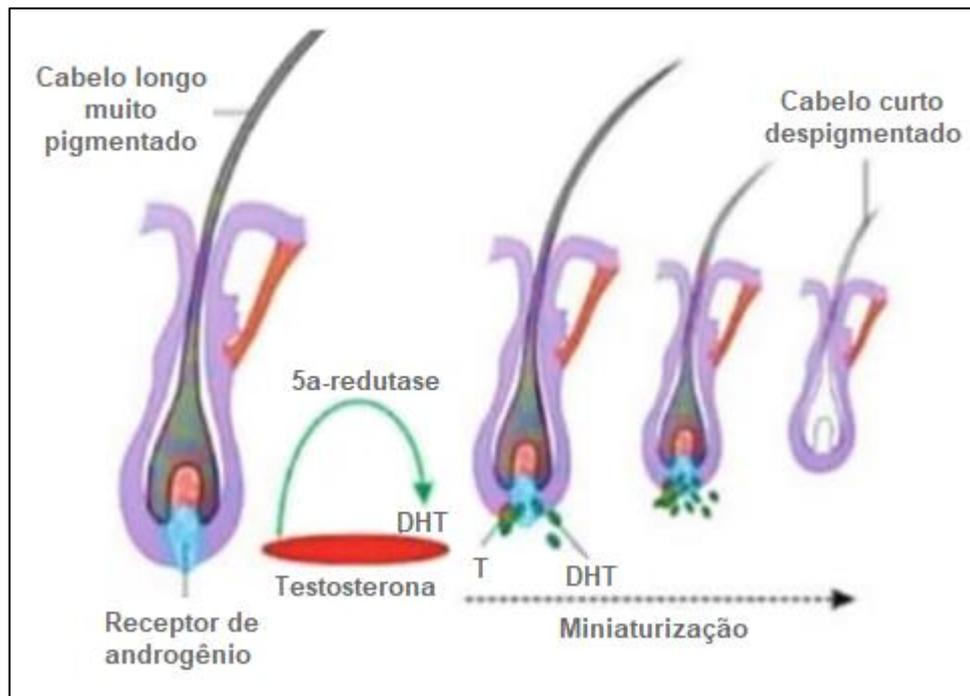
Fonte: Adaptado de PHARMASPECIAL, 2020.

As isoenzimas 5-alfa-redutase tipo I e tipo II encontram-se nos seres humanos e cada uma destas possui diferente expressão em diversos tecidos. O tipo I possui maior predominância nas glândulas sebáceas em grande parte das regiões da pele, couro cabeludo e fígado, e é responsável por aproximadamente um terço da DHT circulante. A tipo II encontra-se principalmente na próstata, vesículas seminais, epidídimo, folículos de cabelo, assim como no fígado, e é responsável por dois terços de DHT circulante (INFARMED, 2011).

Para o tratamento da próstata a dose usual diária administrada pela via oral é de 5 mg, já para a tratamento da alopecia androgenética em pacientes do sexo masculino, a dose diária administrada é de 1 mg também por via oral (PEREZ, 2004). Deste modo, a finasterida bloqueia seletivamente a ação androgênica, diminuindo os níveis de DHT em órgãos alvo tais como a próstata e o couro cabeludo sem afetar os níveis de testosterona circulante, preservando assim os efeitos andrógenos na força muscular, densidade óssea e função sexual (GORMLEY, 1995). A redução dos níveis de DHT no couro cabeludo (Figura 8) pode inibir o processo responsável pela

miniaturização dos folículos capilares, levando à reversão do processo de calvície (KOROLKOVAS, 2009).

Figura 8 - Ação da DHT no folículo piloso após conversão pela enzima 5-alfa-redutase e miniaturização do folículo piloso.



Fonte: DUARTE (2015).

Para pacientes do sexo feminino, a terapia deve ser muito bem avaliada, pois o uso do fármaco pode ter efeitos teratogênicos, neste caso o uso em mulheres com idade fértil não é recomendado (PEREIRA; SINCLAIR, 2014).

2.3.1.2 Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento são citocinas, proteínas produzidas naturalmente pelas células e responsáveis pelo fenômeno conhecido como “Comunicação Celular” (MARONA *et al.*, 2004). A comunicação química é dinâmica e dependente do efeito complementar entre os diferentes tipos de fatores de crescimento. Em uma situação de equilíbrio as células produzem a quantidade adequada dessas citocinas garantindo o estímulo às demais células e o perfeito funcionamento do tecido. Dessa forma, o

crescimento que ocorre bem como a proliferação celular em diversas partes do corpo é um processo dependente da angiogênese (BARSANTI, 2009).

A angiogênese é um processo fundamental e complexo no qual ocorre formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, sendo essencial em condições fisiológicas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, embriogênese, crescimento tecidual, crescimento e reposição capilar através de seus folículos, desenvolvimento mamário na lactação, resposta imune, inflamação e cicatrização (BARSANTI, 2009). Os vasos alvos dos fatores angiogênicos são os capilares venosos e as vênulas terminais, os quais apresentam pequeno calibre com células endoteliais sobre uma lâmina basal coberta por uma camada descontínua de células musculares lisas (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

Um dos processos iniciais da resposta angiogênica é a quebra das ligações entre as células dessas camadas. As células endoteliais ativadas geram enzimas proteolíticas que permitem a degradação da matriz extracelular e migração dessas células através da membrana basal, a partir do vaso da qual se originam, expressando moléculas de adesão na superfície celular. Diante do exposto as proteínas auxiliam os fatores de crescimento e atuam como indutoras de reposição endotelial o que possibilita o crescimento. (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

O arsenal terapêutico que atua na tricologia oferece o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), proteína de sinalização que promove o crescimento e renovação dos vasos sanguíneos. Faz parte do mecanismo que restaura o fluxo sanguíneo às áreas teciduais do sangue proporcionando a oxigenação devido à circulação sanguínea comprometida (MULINARI-BRENNER; SOARES, 2009).

2.3.1.2.1 Fatores de Crescimento Bioidênticos

Muitos fatores de crescimento são versáteis, estimulando a divisão celular em diferentes tipos de células, enquanto outros são específicos para um tipo celular particular. Os fatores de crescimento afetam a proliferação celular, a remodelagem tecidual e o ciclo de crescimento capilar, bem como a diferenciação folicular (WEGER; SCHLAKE, 2006) conforme Figura 9.

Figura 9 - Fatores de crescimento para estímulo folicular.

	CITOCINA	MECANISMO DE AÇÃO	DOSAGEM
ESTÍMULO FOLICULAR	NANOFATOR® IGF (Fator de Crescimento Insulínico)	Reverte a atrofia folicular aumentando em poucos dias de uso o tamanho dos folículos (bulbo). Acelera a mitose – crescimento dos cabelos	0,5 – 1,0% (em associação) 3,0% (uso isolado)
	NANOFATOR® bFGF (Fator de Crescimento Fibroblástico Básico)	Ação fortificante no aumento da síntese de proteínas de ancoragem. Atua em sinergia com citocinas de ação angiogênica.	
	NANOFATOR® aFGF (Fator de Crescimento Fibroblástico Ácido)	Citocina angiogênica, estimula a formação de um novo plexo vascular. Diminui a perda de melanina.	
	NANOFATOR® VEGF (Fator de Crescimento Vascular)	Citocina angiogênica de ação vasodilatadora simultânea. Reverte a atrofia folicular induzida pela DHT. Aumenta o tamanho dos folículos.	
	COPPER PEPTÍDEO® (Copper Tripeptídeo)	Peptídeo de cobre com forte ação anti 5 alfa redutase. Reverte atrofia folicular induzida pela DHT. Fortificante.	
	PROHAIRIN® (Octapeptide 2)	Peptídeo Bioidêntico® com ações simultâneas no estímulo do crescimento de cabelos: aumento do tamanho do bulbo – controle da oleosidade excessiva – normalização da fixação de melanina e cicatrização do couro cabeludo.	3,0 – 7,0%

Fonte: Adaptado de PHARMASPECIAL, 2020.

2.4 Estratégias para o Tratamento da AAG

Para as pessoas que buscam tratamento ou maneiras de disfarçar a calvície, atualmente há vários recursos como fármacos, transplantes, fototerapia, microagulhamento e terapias adjuvantes. Os fármacos mais utilizados são o Minoxidil, que possui efeitos de vasodilatação e finasterida, um inibidor da 5 alfa redutase (COSTA, 2016; SHAPIRO; THIERS, 2015). Quando não tratada, a alopecia androgenética tende a uma progressiva miniaturização dos folículos pilosos, tendo uma taxa de redução do número de cabelos de 5% por ano (ELLIS *et al.*, 2002).

O tratamento com fármacos auxilia na redução na perda de cabelo e miniaturização dos folículos, com resultados visíveis, geralmente após três a seis meses de administração. O crescimento do cabelo é percebido entre seis a doze meses, devendo o tratamento ser contínuo, uma vez que estes tratamentos não são curativos. No tratamento de AAG, o desafio é garantir que os indivíduos entendam as limitações dos tratamentos e a necessidade de manter a continuidade, uma vez que muitos abandonam por medo de possíveis efeitos colaterais já citados anteriormente. O objetivo principal da terapêutica é evitar a progressão da perda de cabelo (LEE; LEE, 2012).

Segundo Machado, Viera e Santamaría (2018) o primeiro estudo sobre o uso de finasterida tópico foi publicado há 20 anos, sendo as últimas publicações nos últimos 8 anos comparando o uso tópico de finasterida 0,25% com uso oral a 1 mg/dia. Várias concentrações entre 0,005% até 1 % e em diferentes veículos e posologias também foram estudadas, onde a aplicação de uma vez ao dia obteve um resultado significativo em reduzir os níveis de DHT no couro cabeludo.

Nos diferentes métodos de intervenção, a mesoterapia utilizando finasterida tem se destacado com excelentes resultados (SEI, 2020). As concentrações recomendadas para uso tópico de finasterida é de 0,05% isoladamente ou em associação ao Minoxidil (IBEROQUÍMICA, 2017; INFINITYPHARMA, 2020).

Com intuito de garantir a adesão ao tratamento, reduzir efeitos colaterais e ter bons resultados no combate a AAG, a técnica MMP[®] (Microinfusão de Medicamentos na Pele), descrita recentemente na prática médica, promove administração de medicamentos através das injúrias causadas por micro agulhas que atendam aos princípios adequados de esterilização e descarte, utilizando um dispositivo para realizar tatuagens. Neste caso o aparelho faz sucção do medicamento que será liberado, através das perfurações, durante a realização do procedimento (CONTIN, 2016).

Na técnica de MMP[®] os principais fármacos empregados são finasterida 0,05 mg/mL e *blend* contendo fatores de crescimento (Fator de Crescimento Insulínico, IGF; Fator de Crescimento Fibroblástico Básico, bFGF; Fator de Crescimento Endotelial Vascular, VEGF; e tripeptídeo de cobre) 1,2 mg/100mL. Esses fatores de crescimento são compostos que irão atuar como mensageiros químicos e participar da divisão celular, crescimento de células e vasos sanguíneos proporcionando um resultado benéfico para o crescimento capilar.

2.5 Teste de Ames

Mutações são causadas por alterações na sequência de nucleotídeos do DNA de um gene. Quando essas alterações se acumulam, principalmente em um gene no processo de divisão celular há probabilidade do aparecimento de um câncer (NELSON; COX, 2011). Dentre as principais hipóteses sobre os mecanismos de ação de substâncias que provocam câncer encontram-se aquelas baseadas na indução de mutações em células somáticas (MOREIRA *et al.*, 2002).

Várias são as alterações possíveis nesta sequência de nucleotídeos, podendo ser a simples substituição de um par de base por outro até mesmo uma alteração cromossômica, onde pode ocorrer o desaparecimento de um cromossomo inteiro (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Por estes motivos, julga-se importante avaliar o potencial de mutagenicidade de substâncias, sejam elas puras ou em conjunto (VARANDA *et al.*, 1997; VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993).

Neste estudo, foi empregado o teste de Ames, também conhecido como ensaio *Salmonella*/microssoma, descrito em 1973 por Bruce Ames e equipe e revisado por Mortelmans e Zeiger (2000). O teste baseia-se na indução de mutações reversas com o emprego de linhagens de *Salmonella typhimurium* derivadas da parental *labile* toxin LT2, auxotróficas para histidina (his-), que apresenta diferentes mutações no *operon* deste aminoácido, sendo construídas para detectar mutações do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituição de pares de base no DNA (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

As cepas utilizadas para a realização do teste foram TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*. Cada cepa possui uma mutação distinta, de modo que essas mutações agem como alvo para novas mutações, podendo restaurar a função de um gene e revertendo assim, a situação de dependência de histidina, em um meio mínimo, sendo facilmente visível o aumento do número de colônias na presença de um mutágeno (MARON; AMES, 1983).

Além da mutação de histidina, as cepas possuem outras mutações que aumentam a capacidade em detectar mutágenos. A mutação *rfa* causa perda parcial na membrana de lipopolissacarídeo, aumentando a permeabilidade para moléculas grandes que não penetrariam normalmente na membrana. A mutação *uvrB* é uma deleção em um gene que codifica o sistema de reparo por excisão de DNA, aumentando a sensibilidade na detecção de mutágenos. Esta deleção estendeu-se

até o gene de síntese de biotina, conseqüentemente, as bactérias necessitam de biotina para sobreviver. A cepa TA102 não contém esta mutação (MARON; AMES, 1983).

Todas as cepas possuem o plasmídeo pKM101, que aumenta tanto a mutagênese espontânea quanto a induzida por otimizar o sistema de reparo *error prone*. Este plasmídeo contém gene de resistência à ampicilina (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A cepa TA102 possui o plasmídeo pAQ1, que carrega mutação no gene *hisG428* e gene de resistência à tetraciclina. Este plasmídeo aumenta o número dos sítios alvos. As linhagens TA98 e TA97a detectam mutações do tipo *frameshift*, a TA100 e TA102 detectam substituições de pares de bases e, ainda TA102 detecta com eficiência vários mutágenos, como formaldeído, hidroperóxidos, bleomicina e mitomicina C, que são dificilmente detectados nas outras cepas (MARON; AMES, 1983).

A tabela 2 resume as características genóticas de cada cepa.

Tabela 2 - Características genóticas e fenotípicas das cepas padrão sugeridas para o ensaio de Teste de Ames.

<i>Cepa</i>	<i>Mutação em His</i>	<i>Plasmídeos</i>	<i>Outras mutações</i>	<i>Tipo de mutação detectável</i>	
TA97	<i>hisD6610</i> <i>his01242</i>	<i>pKM101</i>	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Frameshift	Adição de um par G:C
TA98	<i>hisD3052</i>	<i>pKM 101</i>	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Frameshift	Deleção de um par G:C
TA100	<i>hisG46</i>	<i>pKM 101</i>	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Substituição	G:C para A:T
TA102	<i>pAQ 1</i> (<i>hisG428</i>)	<i>pKM 101,</i> <i>pAQ1</i>	<i>rfa</i>	Substituição	A:T para G:C
TA1535	<i>hisG46</i>	-	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Substituição	G:C para A:T
TA1537	<i>hisC3076</i>	-	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Frameshift	Adição de um par G:C
TA1538	<i>hisG46</i>	-	<i>rfa Δ(uvrB chl bio)</i>	Frameshift	Deleção de um par G:C

Fonte: MORTELMANS; ZEIGER (2000). A deleção (Δ) em *uvrB* também inclui os genes nitrato redutase (*chl*) e biotina (*bio*). *Frameshift*, deslocamento do quadro de leitura.

O teste de Ames é amplamente aceito pela comunidade científica e pelas agências regulatórias como a Anvisa e pode ser aplicado na avaliação da genotoxicidade de compostos químicos puros ou misturas, produtos naturais, fluidos corpóreos, ou, ainda, amostras ambientais. É parte das baterias de ensaios internacionalmente propostas para registro de medicamentos, outras drogas, formulações químicas, incluindo as substâncias ou misturas com ampla utilização na agricultura. Além disso, tem sido muito empregado em estudos para elucidação de mecanismos de mutagênese e antimutagênese e na avaliação de efeitos sinérgicos de misturas de compostos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo classifica-se como experimental *in vitro* com cepas de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Verificar a segurança da combinação finasterida + *blend* contendo fatores de crescimento (doravante denominado apenas como *blend*) pelo parâmetro *Salmonella*/microsossoma.

4.2 Específicos

- Determinar a toxicidade preliminar da finasterida e do *blend* em cepas *Salmonella typhimurium* - TA100;
- Averiguar se os compostos isolados ou em combinação apresentam efeito mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium* – TA97a, TA98, TA100 e TA102 pelo Teste de Ames (sem ativação metabólica);
- Averiguar se a combinação finasterida + *blend* apresenta efeito mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium* – TA97a, TA98, TA100 e TA102 pelo Teste de Ames (com ativação metabólica).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Fármacos

5.1.1 Finasterida

A finasterida foi adquirida da Farmácia Apotheka - Farmácia de Manipulação Enterprise LTDA - CNPJ: 05.910.221-0001/10, Sorocaba/SP.

5.1.2 Blend

O *blend* (IGF, bFGF, VEGF e complexo glicina-histidina-lisina:cobre, GHK:Cu (1:1)) foi adquirido de Centro Paulista de Desenvolvimento Farmacotécnico Ltda | Centro Paulista Laboratório | CNPJ: 05.724.370/0001-95, São Paulo e doado gentilmente pela médica dermatologista Dra. Estrela Machado, CRM 79618 SP.

5.1.3 Linhagens de *Salmonella typhimurium*

As linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. typhimurium*, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley (Califórnia, EUA) e mantidas pela Dra. Flávia Aparecida Resende (UNIARA – Universidade de Araraquara – SP), que gentilmente doou à Uniso (04/12/2017). As linhagens de *S. typhimurium* estão estocadas em viais criogênicos (2,0 mL) e mantidas no freezer vertical de ultrabaixa temperatura (Coldlab®) do LaPeNM (Laboratório de Pesquisa em Neurofarmacologia e Multidisciplinar) a -80 °C para que se mantenham inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9 mL de cultura foi adicionada 0,1 mL de dimetilsufóxido (DMSO – Sigma-Aldrich) que é um crioprotetor (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Neste estudo foi utilizada a taxa de reversão espontânea para cada linhagem, testada em condições de ausência e presença da mistura S9, de acordo com a Tabela 3, seguindo o preconizado por Mortelmans e Zeiger (2000).

Tabela 3 - Taxa de reversão espontânea por placa.

Linagem	Revertentes sem S9*	Revertentes com S9*
TA 97a	75 – 200	100 – 200
TA 98	20 – 50	20 – 50
TA 100	75 – 200	75 – 200
TA 102	100 – 300	200 – 400

Fonte: MORTELMANS; ZEIGER (2000).

*Número de colônias de crescimento espontâneo por placa no Controle espontâneo.

5.2 Preparo e Procedimentos Experimentais

5.2.1 Preparo dos inóculos de *Salmonella typhimurium*

Com auxílio de alça de inoculação, uma pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37 °C, por 11-14 h em *shaker* incubador (37 °C -100 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x 10⁹ bactérias/mL. Após o tempo, as culturas foram removidas e mantidas refrigeradas em geladeira até o momento de uso (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

5.2.2 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983), abaixo descritos.

5.2.2.1 Caldo nutriente

O meio Nutrient Broth nº 2 (CM 0067 OXOID®) foi dissolvido em água purificada por osmose reversa na proporção de 0,75 g/30 mL. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. Este caldo foi utilizado para o crescimento de culturas bacterianas de *Salmonella typhimurium*.

5.2.2.2 Top agar

O Bacto Agar purificado (BD[®] Ref 214010) 0,6 % (m/v) e o Cloreto de sódio (Sigma[®]) 0,5 % (m/v) foram dissolvidos em 100 mL de água purificada por osmose reversa. O meio foi autoclavado a 121 °C, por 20 min e após o arrefecimento foi mantido refrigerado entre 2 a 8 °C. O Top Agar é utilizado para crescimento das colônias revertentes. No momento do uso, o Top foi fundido em forno de microondas, adicionado de 10 mL de solução de biotina/histidina e homogeneizado.

5.2.2.3 Solução de Biotina/Histidina (0,5 mM)

A D-Biotina (Sigma[®]) 0,00124g e a L-Histidina (Sigma[®]) 0,00096g foram dissolvidas em 10 mL de água purificada por osmose reversa aquecida a 45 °C. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e após o arrefecimento foi mantida refrigerada entre 2 a 8 °C. Esta solução foi utilizada para suplementar o Top Agar quanto à biotina e traços de histidina.

5.2.2.4 Agar mínimo nutriente

O Bacto Agar purificado (BD[®] Ref. 214010) foi pesado 7,5 g e dissolvido em 465 mL de água purificada por osmose reversa e agitado até a dissolução. O Agar mínimo nutriente foi autoclavado a 121 °C por 20 min. Aguardou-se o esfriamento até aproximadamente 60 °C e dentro da Capela de Fluxo Laminar, ao erlenmeyer contendo o Agar mínimo foi adicionado 10 mL de solução de sais de Vogel Bonner (VB) e 25 mL de solução de glicose 40 % e agitado vigorosamente. Para a linhagem TA97a foi utilizada a solução de glicose 8 %. Foi vertida a solução de meio em placas de Petri esterilizadas e descartáveis, as bolhas formadas foram retiradas com a chama do bico de Bunsen. As placas foram incubadas invertidas em estufa a 37 °C por 48 h para verificar a ausência de contaminação.

5.2.2.5 Solução de sais de Vogel Bonner (VB)

Para a preparação de 100 mL da solução de sais de Vogel Bonner foram pesados Sulfato de magnésio (Reagen[®]) 1,0 g, Ácido cítrico (Sigma[®]) 10,0 g, Fosfato

de potássio dibásico (Merck®) 50,0 g, Fosfato de sódio e amônio (Merck®) 17,5 g e dissolvidos seguindo a sequência em 67 mL de água purificada por osmose reversa mantendo-se a temperatura de aproximadamente 45 °C. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min.

5.2.2.6 Soluções de Glicose a 40 % e 8 %

Para a preparação de 100 mL e 50 mL da solução de Glicose a 40 % e 8 % foram pesados respectivamente 40 g e 4 g de D-Glucose (Sigma®) e dissolvidos, respectivamente, em 90 mL e 50 mL de água purificada por osmose reversa. As soluções foram autoclavadas a 121 °C por 20 min. A solução de Glicose a 40 % é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para as linhagens TA98, TA100 e TA102. A solução de Glicose 8 % é usada para o preparo do Agar mínimo glicosado para a cepa TA97a.

5.2.2.7 Tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4

Para a preparação da Solução A foi pesada uma massa de 2,76 g de Fosfato de sódio monobásico NaH_2PO_4 (Reagen®) e dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa. Para a preparação da Solução B foi pesado 2,84 g de Fosfato de sódio dibásico Na_2HPO_4 (Merck®) e dissolvido em 100 mL de água purificada por osmose reversa. As soluções A e B foram preparadas em dois béqueres separados. Após a calibração do pHmetro, foi colocado o eletrodo na solução A e adicionado aos poucos a solução B até o pH atingir valor de 7,4. A solução tampão final foi autoclavada a 121 °C por 20 min e após o arrefecimento foi mantida refrigerado entre 2 a 8 °C.

5.3 Mistura S9

Sabe-se que muitos compostos iniciadores do processo de carcinogênese necessitam ser metabolizados antes de interagir com o material genético. Desse modo realiza-se o teste de Ames na presença e ausência de um sistema de metabolização. O sistema mais comumente utilizado, a fração microsomal S9, é composta por um homogenato de células de fígado de rato, previamente tratado com a mistura bifenil

policlorinada (Aroclor 1254), que induz um aumento de enzimas P-450 neste órgão (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). É assim denominado pela obtenção de frações de enzimas *post* mitocondriais no sobrenadante resultante da ultracentrifugação a 9.000 g, por 10 minutos, do homogenato hepático (AMES *et al.*, 1973).

5.3.1. β -NADP (β -Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato) 0,1 M

Para a preparação de solução 0,1 M foi pesada uma massa de 0,15308 g de β -NADP (Sigma®) e dissolvida em 2 mL de água purificada, tipo MilliQ, estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco esterilizado.

5.3.2 G6P (Glicose-6-fosfato) 1M

Para a preparação de solução 1 M foi pesada uma massa de 0,084 g de G6P (Sigma®) e dissolvida em 300 μ L de água purificada, tipo MilliQ, estéril. A solução foi preparada no momento do uso em frasco esterilizado.

5.3.3 Solução de KCl 1,65 M

Para a preparação de solução 1,65 M foi pesada uma massa de 1,23 g de KCl (Sigma®) e dissolvida em 10 mL de água purificada por osmose reversa. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e armazenado em freezer a -20 °C.

5.3.4 Solução de $MgCl_2$ 0,4 M

Para a preparação de solução 0,4 M foi pesada uma massa de 0,81 g de $MgCl_2$ (Sigma®) e dissolvida em 10 mL de água purificada por osmose reversa. A solução foi autoclavada a 121 °C por 20 min e armazenado em freezer a -20 °C.

5.3.5 Fração Microsomal S9

A Fração S9 (11'01L Rat liver LS-9 / Aroclor 1254-induced male SD rat liver) utilizada no sistema de ativação metabólica foi adquirida liofilizada da MOLTOX®,

armazenado a -20 °C e reconstituído com 2,0 mL de água purificada, pelo sistema MilliQ, estéril no momento do uso.

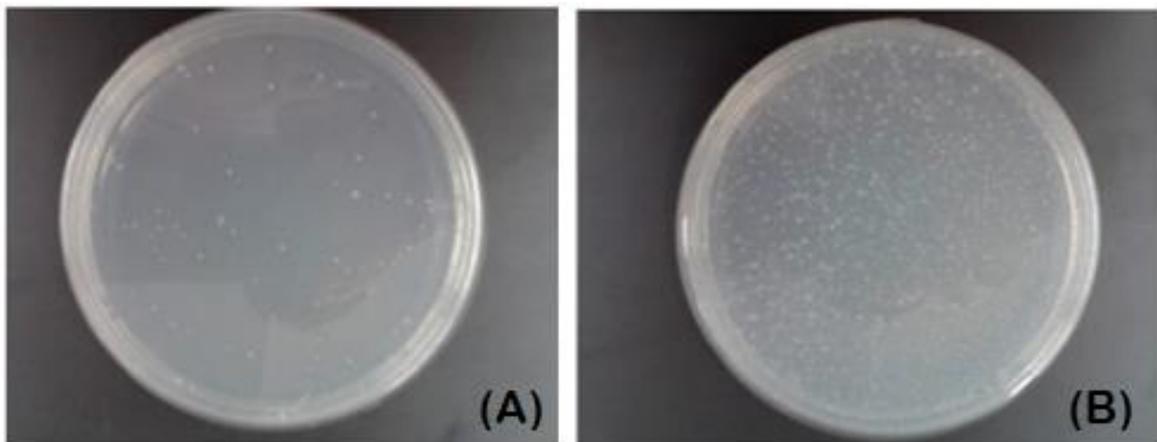
Foi usada a fração microsomal S9 homogeneizada de fígado de rato Sprague Dawley (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, Aroclor 1254 – 500 mg/kg), o qual induz um conjunto de enzimas do sistema microsomal hepático.

A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste de 4 % de fração S9, 1 % de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1 % de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5 % de 1 M de glicose-6-fosfato e 4 % de 0,1 M de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, além de 50 % de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5 % de água deionizada estéril (MARON; AMES, 1983). Essa mistura foi mantida resfriada em banho de gelo durante todo o ensaio. Esta solução de trabalho foi preparada sempre a fresco e utilizada num período máximo de 3 h.

5.4 Controles negativos e positivos

Os ensaios foram realizados sempre em presença de controles negativos e positivos (Figura 10) para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica.

Figura 10 - Crescimento de colônias representativas de revertentes (His⁺) em (A), controle negativo e (B), controle positivo.



Fonte: YOSHIDA *et al.* (2016).

Diferentes solventes foram testados como controles negativos tais como dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma®), polietileno glicol 400 (PEG 400, Synth®) e água para dissolver as amostras e o volume por placa foi o mesmo utilizado para as amostras (200 µL).

Como controles positivos foram usados produtos químicos reconhecidamente mutagênicos, específicos para cada linhagem de *S. typhimurium*, em concentrações definidas (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003), como descritos a seguir:

5.4.1 NPD (4-nitro-o-fenilenodiamino)

Uma massa de 0,001 g de NPD (Sigma®) foi pesada em balança analítica (Ohaus Discovery – DV214CD) e dissolvida em 5 mL de DMSO (Sigma®). Sendo este o controle utilizado para as linhagens TA98 e TA97a em ausência de S9. Foi utilizado 50 µL por placa em concentração de 10,0 µg/placa.

5.4.2 NaN₃ (Azida sódica)

Uma massa de 0,0005 g de NaN₃ (Sigma®) foi pesada em balança analítica (Ohaus Discovery – DV214CD) e dissolvida em 10 mL de água purificada, tipo MilliQ, estéril. Sendo este o controle utilizado para a linhagem TA100 em ausência de S9. Foi utilizado 50 µL por placa em concentração de 2,5 µg/placa.

5.4.3 MMC (Mitomicina C)

Uma massa de 0,0001 g de MMC (Sigma®) foi pesada em balança analítica (Ohaus Discovery – DV214CD) e dissolvida em 10 mL de água purificada, tipo MilliQ, estéril. Sendo este o controle utilizado para a linhagem TA102 em ausência de S9. Foi utilizado 10 µL por placa em concentração de 0,1 µg/placa.

5.4.4 2-AA (2-aminoantraceno)

Uma massa de 0,0003 g de 2-AA (Sigma®) foi pesada em balança analítica (Ohaus Discovery – DV214CD) e dissolvida em 10 mL de DMSO (Sigma®). Sendo

este o controle utilizado para as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 na presença de S9. foi utilizado 50 μ L por placa em concentração de 1,25 μ g/placa.

OBS.: A etapa com ativação metabólica foi realizada com redução proporcional a 50% em todas as quantidades de reagentes e materiais, seguindo rigorosamente a metodologia.

6 PROTOCOLO DE ENSAIO

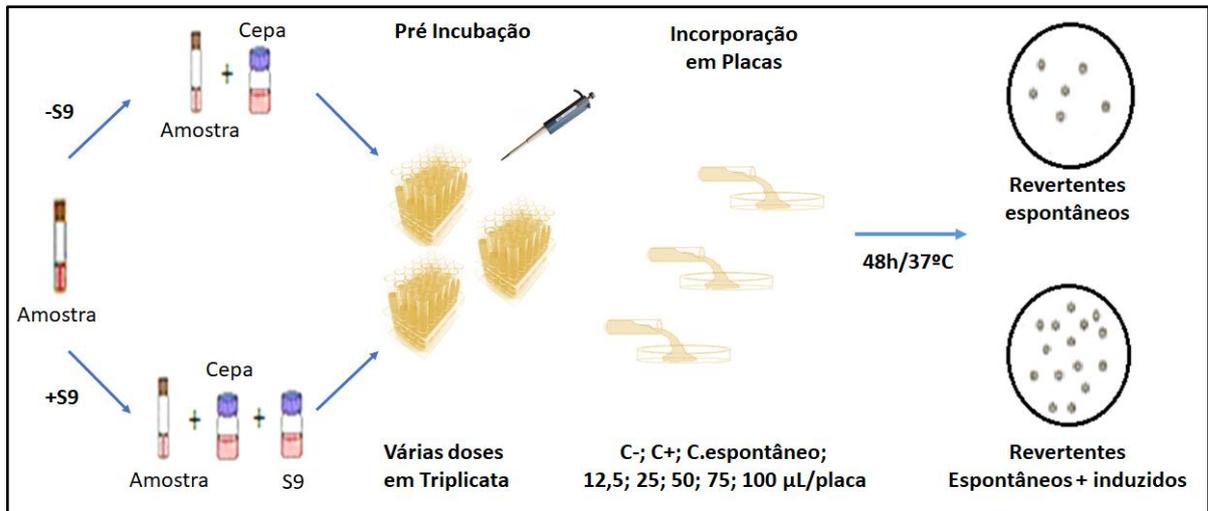
6.1 Teste Preliminar de Toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados isoladamente e em triplicata com a finasterida, *blend* e associação finasterida + *blend*, em diferentes concentrações até um máximo de 5 mg/placa. Para avaliar a toxicidade foram observadas as características de crescimento da última população de bactérias na placa de ágar glicose mínimo após 48 h de incubação. Durante a contagem das placas, a toxicidade das amostras é evidenciada pela ausência completa de crescimento, redução no número de revertentes His+ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas teste de ágar glicose mínimo em comparação com as placas de controle negativo e controle espontâneo. Uma diminuição no crescimento de colônias com mutação reversa abaixo do controle espontâneo pode indicar toxicidade parcial, neste caso as bactérias sobreviventes formam ainda micro colônias. A ausência de crescimento de colônias e de crescimento de fundo indica um elevado grau de toxicidade que impede o crescimento da bactéria e a formação do crescimento de fundo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993).

6.2 Teste de Ames pelo método de incorporação em placas com prévia incubação

O método escolhido para a realização do teste de Ames foi o de incorporação em placas com prévia incubação (Figura 11), sendo este o recomendado pela literatura (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003). O teste foi realizado na presença e na ausência de ativação metabólica com as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102.

Figura 11 - Esquema do Teste de Ames. Método de incorporação em placas com prévia incubação.



Fonte: Adaptado de UMBUZEIRO; VARGAS (2003).

O teste de incorporação em placas consiste na exposição das linhagens de *Salmonella typhimurium* e a amostra a testar em placa de ágar glicose mínimo na presença e ausência do sistema de ativação metabólica mistura S9 de acordo com a metodologia de incubação prévia, desenvolvida por Maron e Ames (1983). O método de pré incubação (MARON; AMES, 1983) é caracterizado por uma etapa de incubação antes do plaqueamento. As culturas de bactérias e a mistura contendo a amostra teste, em presença e ausência do sistema de metabolização, foram previamente incubadas por período de 20-30 min a 37 °C. Primeiramente realizou-se a identificação dos tubos para, na sequência, adicionar a amostra. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Na sequência, adicionaram-se os controles negativos (solventes utilizados para a dissolução dos compostos) e positivos (tabela 4), nos tubos correspondentes. A presença desses controles é importante para assegurar a capacidade de resposta da linhagem e a eficácia do sistema de ativação metabólica. Em seguida, adicionou-se o tampão fosfato e a bactéria, em todos os tubos, inclusive nos controles. Os tubos foram colocados na estufa, para uma prévia incubação de 20-30 min a 37 °C.

Depois de cumprido o tempo de incubação, adicionou-se 2,0 mL de top Agar a 45 °C, suplementado com solução de biotina/histidina, em todos os tubos. Os tubos foram homogeneizados e vertidos sobre a superfície da placa contendo ágar glicose mínimo. Com a solidificação do top ágar, as placas foram incubadas invertidas, por 48 h a 37 °C. Depois de cumprido o tempo desta segunda incubação, procedeu-se, então,

à contagem do número de revertentes por placa. Os ensaios com ativação metabólica seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém, em uma das etapas, substituiu-se apenas o tampão fosfato pela adição da fração S9.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S.Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982). Os dados (revertentes/placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a fórmula a seguir.

$$IM = \frac{\text{número de revertente}_{\text{placa com a amostra (revertentes induzidas)}}}{\text{número de revertentes}_{\text{placa do controle negativo}}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando a relação dose/resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ou quando o IM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). O número de revertentes no controle negativo é a taxa de reversão espontânea obtida nas condições do ensaio. Ao tratar essa mesma cultura com doses crescentes do agente com atividade mutagênica, o número de revertentes por placa aumenta, proporcionalmente ao aumento das doses de exposição, até um platô, no qual as doses aplicadas são letais para as células por causarem excesso de danos ao DNA. Conceitualmente uma amostra pode apresentar indícios de mutagênese para as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a, para índices imediatamente menores do que 2, desde que acompanhados de ANOVA significativa e o efeito dose-resposta reprodutível (VARGAS; MOTTA; HENRIQUES, 1993). A resposta é considerada negativa quando a ANOVA não for significativa nem for observado um efeito dose-resposta.

8 RESULTADOS

O teste de Ames é sempre precedido por um ensaio de Toxicidade Preliminar. Neste estudo selecionou-se a linhagem TA100 de *S. typhimurium* para todas as substâncias testadas, conforme descritas a seguir.

8.1 Teste de toxicidade preliminar – Finasterida

Para cada 50 mg de finasterida foi adicionado 1,0 mL de DMSO resultando na concentração de 50 mg/mL. Os ensaios de toxicidade realizados abrangeram cinco concentrações diferentes por v/v da solução de 50 mg/mL: 12,5 µL/mL; 25 µL /mL; 50 µL/mL; 75 µL/mL e 100 µL/mL, de acordo com o cálculo mostrado abaixo, que correspondem à faixa de 0,625 a 5 mg/placa. Nesta etapa, busca-se avaliar se até a concentração máxima exigida para o teste de toxicidade (5 mg/placa), a finasterida apresentaria alguma toxicidade, ao se observar as características de crescimento de colônias de bactérias na placa de ágar glicose mínimo após 48h de incubação.

8.1.1 Cálculo para a definição das concentrações de finasterida:

50 mg/1000 µL (concentração inicial de finasterida). Os volumes utilizados no teste de toxicidade revelam a concentração de finasterida/placa, abaixo:

5 mg/placa	100 µL (concentração máxima requerida por agências)
3,75 mg/placa	75 µL
2,50 mg/placa	50 µL
1,25 mg/placa	25 µL
0,625 mg/placa	12,5 µL

Para este estudo utilizou-se a linhagem TA100 de *S. typhimurium* tomando-se 0,9 mL de cultura e 0,1 mL de DMSO. Após o tempo de incubação e contagem das placas, todas as concentrações testadas não apresentaram toxicidade, então, optou-se por manter esta faixa de concentração (0,625 a 5 mg/placa) em ensaios posteriores.

Tabela 4 - Resultados da toxicidade preliminar do Finasterida.

TA 100		mg/placa	Nº revertentes	DP
Finasterida (50 mg/mL)	Controle +	-	2092	±148
	Controle -	-	153	±34
	Controle Esp.	-	160	±13
	100 µL	5	134,67 (0,88)	±3,2
	75 µL	3,75	159,67 (1,04)	±8,1
	50 µL	2,5	173 (1,13)	±9,5
	25 µL	1,25	145,3 (0,94)	±1,52
	12,5 µL	0,625	150,3 (0,98)	±8,4

Legenda: Controle +: azida sódica; Controle-: dimetilsulfóxido (DMSO); nº revertentes: número médio das triplicatas; DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

8.2 Teste de toxicidade preliminar – *Blend*

O ensaio de toxicidade para o *blend* foi realizado utilizando os volumes (12,5 µL/mL; 25 µL /mL; 50 µL/mL; 75 µL/mL; 100 µL/mL) que correspondem a uma faixa de concentração entre 150 a 6 mg/placa). O *blend* é fornecido na concentração de 1,2%. Nos testes foram avaliadas as características de crescimento de colônias de bactérias na placa de ágar glicose mínimo após 48h de incubação.

8.2.1 Cálculo para a definição das concentrações do *blend*:

O *blend* é de 1,2%, ou seja, contém 1,2 g dissolvido em 100 mL. Entretanto, para se trabalhar com a concentração requerida pelas agências (5.000 µg/placa ou 5 mg/placa), foram feitos os cálculos abaixo:

1,2 g	100 mL
1200 mg	100.000 µL
1.200.000 µg	100.000 µL
6.000 µg	500 µL
5.000 µg	416,6 µL
2.500 µg	208,3 µL
1.200 µg	100 µL

900 µg	75 µL
600 µg	50 µL
300 µg	25 µL
150 µg	12,5 µL

A tabela 5 ilustra o ensaio de toxicidade preliminar do *blend* (0,15 a 6 mg/placa). Note que a concentração de 2,5 mg/placa se mostra próxima ao nível de toxicidade (~ 0,6). Entretanto, na concentração de sua apresentação comercial (1,2%) representada pelo volume de 100 µL (1,2 mg/placa) não mostrou toxicidade.

Tabela 5 - Resultados da toxicidade preliminar do *Blend*.

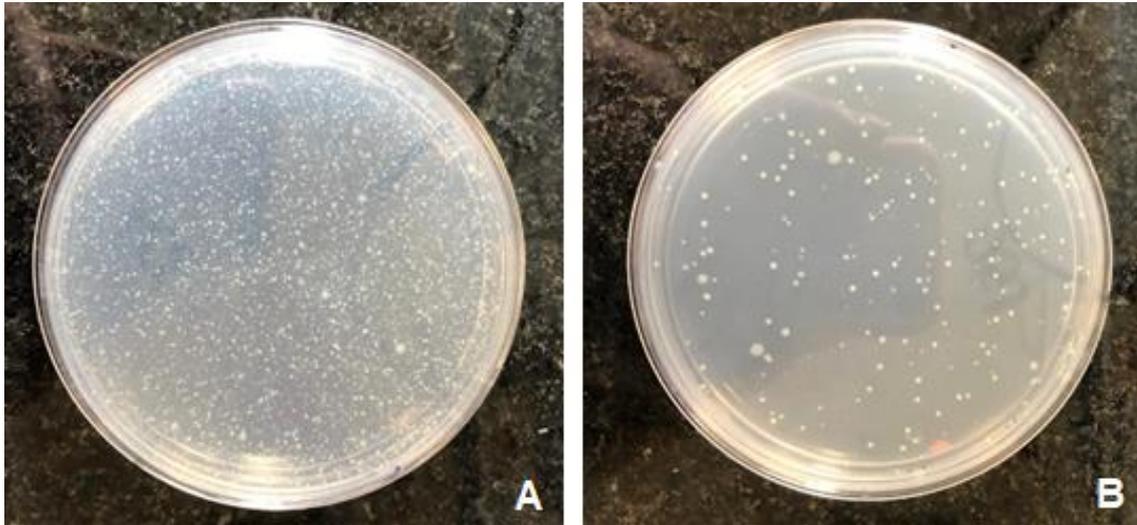
TA 100	mg/placa	Nº revertentes	DP	
Blend (1,2 mg/0,1 mL)	Controle +	-	2310	±126,2
	Controle -	-	202	±60,9
	Controle Esp.	-	208,5	±51,3
	500 µL	6	144,7 (0,72)	±13,87
	400 µL	5	147,7 (0,73)	±11,06
	200 µL	2,5	135 (0,67)	±15,1
	100 µL	1,2	236,7 (1,17)	±24,79
	75 µL	0,9	258,3 (1,28)	±11,55
	50 µL	0,6	230,3 (1,14)	±17,21
	25 µL	0,3	289 (1,43)	±16,46
	12,5 µL	0,15	284,7 (1,41)	±17,62

Legenda: Controle +: azida sódica; Controle-: dimetilsulfóxido (DMSO); nº revertentes: número médio das triplicatas; DP: desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Após o tempo de incubação e contagem das placas, a toxicidade não foi evidenciada (Figura 12).

FIGURA 12 - Controles positivo (A) e negativo (B) da linhagem TA100.



Fonte: Elaboração própria.

8.3 Teste de Ames – Finasterida, *Blend* e Mistura (-S9)

A partir dos resultados do teste preliminar de toxicidade, observando-se a curva de dose e resposta sem toxicidade, iniciou-se o Teste de Ames sem ativação metabólica para o fármaco finasterida, *blend* e mistura, conforme resultados mostrados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6 - Resultados do Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) - Finasterida (TA97a; TA98; TA100; TA102).

<i>Tratamento mg/placa</i>		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a - S9	TA98 - S9	TA 100 - S9	TA 102 - S9
Finasterida (50 mg/mL)	0.0 ^a	117 ± 6	15 ± 4	153 ± 34	343 ± 7
	5	110 ± 10 (0,9)	15 ± 1 (1,0)	134 ± 3 (0,8)	327 ± 4 (0,9)
	3.75	120 ± 38 (1,0)	13 ± 2 (0,8)	159 ± 8 (1,0)	312 ± 1 (0,9)
	2.5	119 ± 11 (1,0)	12 ± 2 (0,8)	173 ± 9 (1,1)	335 ± 4 (0,9)
	1.25	120 ± 11 (1,0)	15 ± 1 (0,9)	145 ± 1 (0,9)	316 ± 32 (0,9)
	0.625	125 ± 6 (1,0)	21 ± 2 (1,3)	150 ± 1 (0,9)	305 ± 24 (0,9)
	Controle +	606 ± 39 ^b	794 ± 40 ^b	2092 ± 148 ^c	1142 ± 140 ^d

Legenda: M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL/placa); Controle + = Controle positivo - ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamina (NPD - 50 µL / placa - TA97a, TA98); ^cazida sódica (50 µL/placa - TA100); ^dmitomicina (10 µL/placa - TA102), na ausência de S9 (-S9).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 7 - Resultados do Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) – Blend
(TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a - S9	TA98 - S9	TA 100 - S9	TA 102 - S9
Blend (1,2mg/0,1 mL)	0.0 ^a	37 ± 4	8 ± 3	202 ± 60	150 ± 15
	6	43 ± 7 (1,1)	8 ± 0 (1,0)	144 ± 13 (0,7)	136 ± 11 (0,9)
	5	40 ± 6 (1,0)	5 ± 1 (0,5)	147 ± 11 (0,7)	161 ± 10 (1,0)
	2.5	46 ± 7 (1,2)	7 ± 3 (0,9)	135 ± 15 (0,6)	149 ± 23 (0,9)
	1.2	46 ± 6 (1,2)	4 ± 1 (0,6)	236 ± 24 (1,1)	117 ± 58 (0,7)
	0.9	42 ± 1 (1,1)	8 ± 2 (1,0)	258 ± 11 (1,2)	109 ± 96 (0,7)
	Controle +	633 ± 37 ^b	695 ± 49 ^b	2310 ± 126 ^c	720 ± 195 ^d

Legenda: M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: dimetilsulfóxido (DMSO - 100 µL / placa); Controle + = Controle positivo - ^b4-nitro-*o*- fenilenodiamina (NPD - 50 µL/ placa – TA97a, TA98); ^cazida sódica (50 µL/placa - TA100); ^dmitomicina (10 µL/placa - TA102), na ausência de S9 (-S9).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 8 - Resultados do Teste Ames sem ativação metabólica (-S9) – Mistura: Finasterida + Blend
(TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
Blend 1,2mg/0,1mL	Finasterida 50mg/mL	TA 97a	TA98	TA 100	TA 102
		- S9	- S9	- S9	- S9
0.0 ^a		92 ± 14	14 ± 2	288 ± 59	221 ± 42
6	5	69 ± 53 (0,7)	24 ± 10 (1,6)	256 ± 23 (0,8)	252 ± 18 (1,1)
5	3,75	112 ± 15 (1,2)	21 ± 2 (1,4)	285 ± 42 (0,9)	224 ± 15 (1,0)
2,5	2,5	128 ± 12 (1,3)	15 ± 2 (1,0)	306 ± 19 (1,0)	266 ± 44 (1,2)
1,2	1,25	99 ± 41 (1,0)	22 ± 5 (1,5)	259 ± 24 (0,8)	242 ± 10 (1,0)
0,9	0,625	116 ± 7 (1,2)	19 ± 4 (1,2)	242 ± 25 (0,8)	203 ± 46 (0,9)
Controle +		1119 ± 197 ^b	1223 ± 201 ^b	1871 ± 263 ^c	1097 ± 328 ^c

Legenda: M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: polietileno glicol 400 (PEG 400 - 100 µL/placa); Controle + = Controle positivo - 4-nitro-*o*- fenilenodiamina (NPD - 50 µL/placa – TA97a, TA98); ^cazida sódica (50 µL/placa - TA100); ^dmitomicina (10 µL/placa - TA102), na ausência de S9 (-S9).

Fonte: Elaboração própria.

Ao observar o número de revertentes por placas nos volumes usados, nos ensaios sem ativação metabólica, os fármacos testados isolados e em mistura não se apresentaram mutagênicos a nenhuma das linhagens testadas.

8.4 Teste de Ames – Mistura: Finasterida + *Blend* (+S9)

O resultado obtido com ativação metabólica realizado com a mistura Finasterida + *Blend* (nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio sem ativação metabólica, tabela 8) é mostrado na tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) – Mistura Finasterida + *Blend* (TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a + S9	TA98 + S9	TA 100 + S9	TA 102 + S9
<i>Blend</i> 1,2mg/0,1mL	<i>Finasterida</i> 50mg/mL				
0.0 ^a		155 ± 49	36 ± 2	136 ± 4	266 ± 27
6	5	639 ± 112 (4,1)	516 ± 72 (14,3)	638 ± 40 (4,6)	823 ± 173 (3,0)
5	3,75	346 ± 60 (2,2)	558 ± 71 (15,5)	558 ± 114 (4,0)	522 ± 157 (1,9)
2,5	2,5	496 ± 15 (3,1)	400 ± 99 (11,1)	348 ± 21 (2,5)	530 ± 109 (1,9)
1,2	1,25	341 ± 60 (2,1)	364 ± 76 (10,1)	330 ± 29 (2,4)	571 ± 30 (2,1)
0,9	0,625	242 ± 31 (1,5)	167 ± 126 (4,6)	302 ± 11 (2,2)	462 ± 76 (1,7)
Controle +		444 ± 41 ^b	381 ± 72 ^b (10,5)	848 ± 24 ^b (6,2)	460 ± 37 ^c (1,7)

Legenda: M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: polietileno glicol 400 (PEG 400 - 100 µL/placa); Controle + = Controle positivo: ^b2-aminoantraceno (50 µL/placa – TA97a, TA98, TA100); ^c2-aminofluoreno (50 µL/placa - TA102), na presença de S9 (+S9).

Fonte: Elaboração própria.

Ao observar o número de revertentes por placas nos volumes usados, nos ensaios com ativação metabólica, os fármacos testados em mistura apresentaram mutagenicidade para todas as linhagens testadas. Note que dentre os controles positivos, o aminofluoreno não atingiu o valor mínimo de índice de mutagenicidade $IM \geq 2,0$, tendo sido substituído para aminoantraceno nos ensaios posteriores.

Frente ao inesperado resultado de mutagenicidade da mistura testada em presença de ativação metabólica, excluiu-se a participação da finasterida em virtude do composto ser biotransformado (hidroxilação e oxidação) por enzimas microssomais (CYP3A4) a produtos não tóxicos, eliminados parte pelas fezes e pela urina conjugados ao ácido glicurônico. Como inexitem na literatura ensaios do *blend* sob o parâmetro da mutagenicidade (*Salmonella*/microssoma), optou-se por testar

isoladamente o *blend* em presença de ativação metabólica, conforme mostra a tabela 10.

Tabela 10 - Resultados do Teste Ames com ativação metabólica (+S9) – *Blend*
(TA97a; TA98; TA100; TA102).

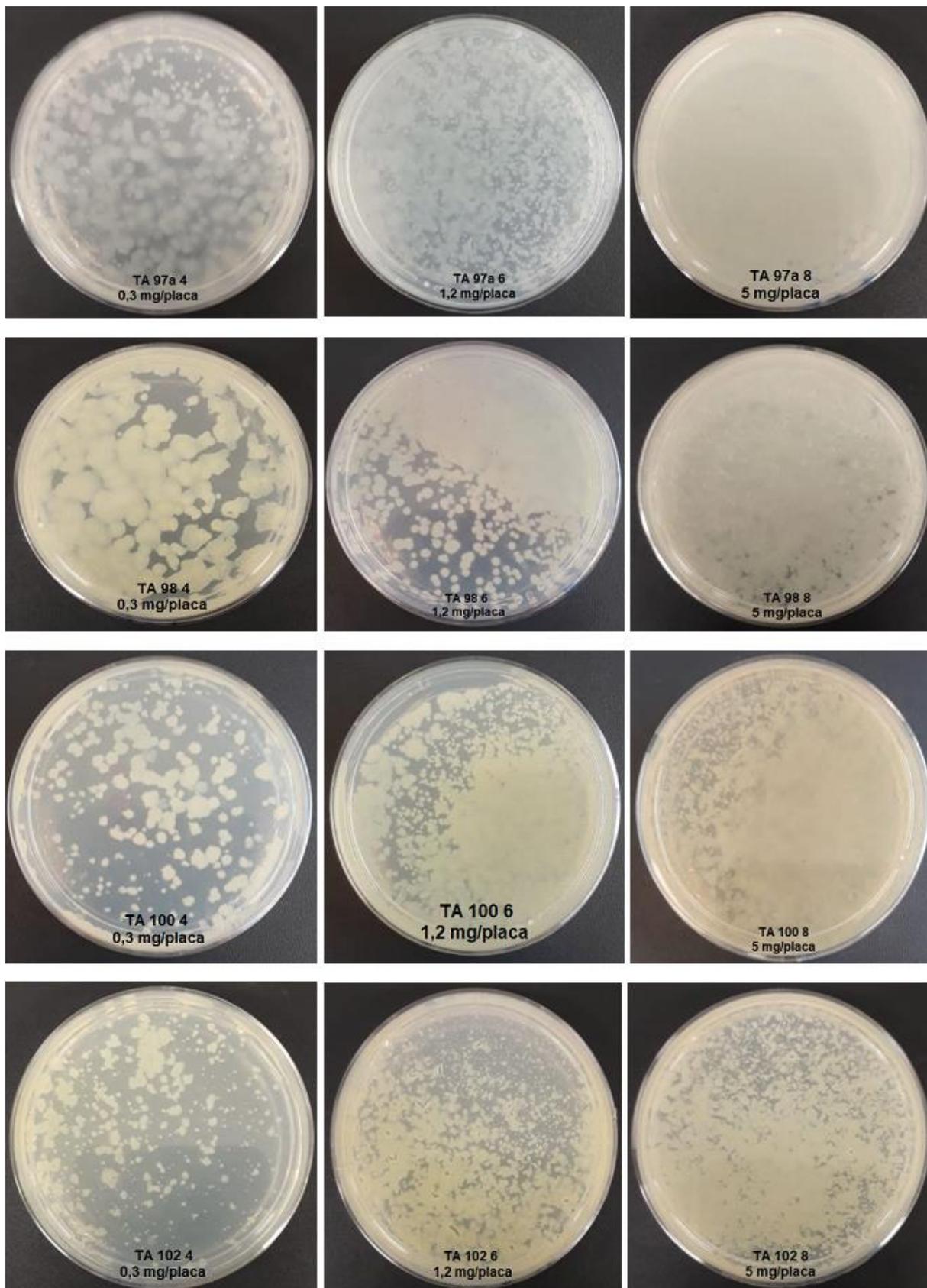
<i>Tratamento</i> <i>mg/placa</i>		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a + S9	TA98 + S9	TA 100 + S9	TA 102 + S9
<i>Blend</i> (1,2mg/0,1 mL)	<i>0.0^a</i>	103 ± 15	29 ± 15	150 ± 25	193 ± 35
	<i>5</i>	NC	NC	NC	NC
	<i>2,5</i>	NC	NC	NC	NC
	<i>1,2</i>	NC	322 ± 33 (11,1)	NC	NC
	<i>0,6</i>	NC	311 ± 213 (10,7)	752 ± 316 (5,0)	918 ± 179 (4,7)
	<i>0,3</i>	409 ± 35 (3,9)	NC	265 ± 86 (1,7)	642 ± 102 (3,3)
	Controle +	2054 ± 42 ^b	1550 ± 138 ^b	2396 ± 292 ^b	399 ± 6 ^b

Legenda: M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: polietileno glicol 400 (PEG 400 - 100 µL / placa); Controle + = Controle positivo: ^b2-aminoantraceno (50 µL/placa – TA97a, TA98, TA100 e TA102), na presença de S9 (+S9). NC, não foi possível a contagem das colônias.

Fonte: Elaboração própria.

Observe que foi muito expressiva a quantidade de placas em que a contagem de colônias não foi possível (NC), pois resultou na formação de um tapete de colônias apenas nas placas que continham o *blend*, como mostra a Figura 13.

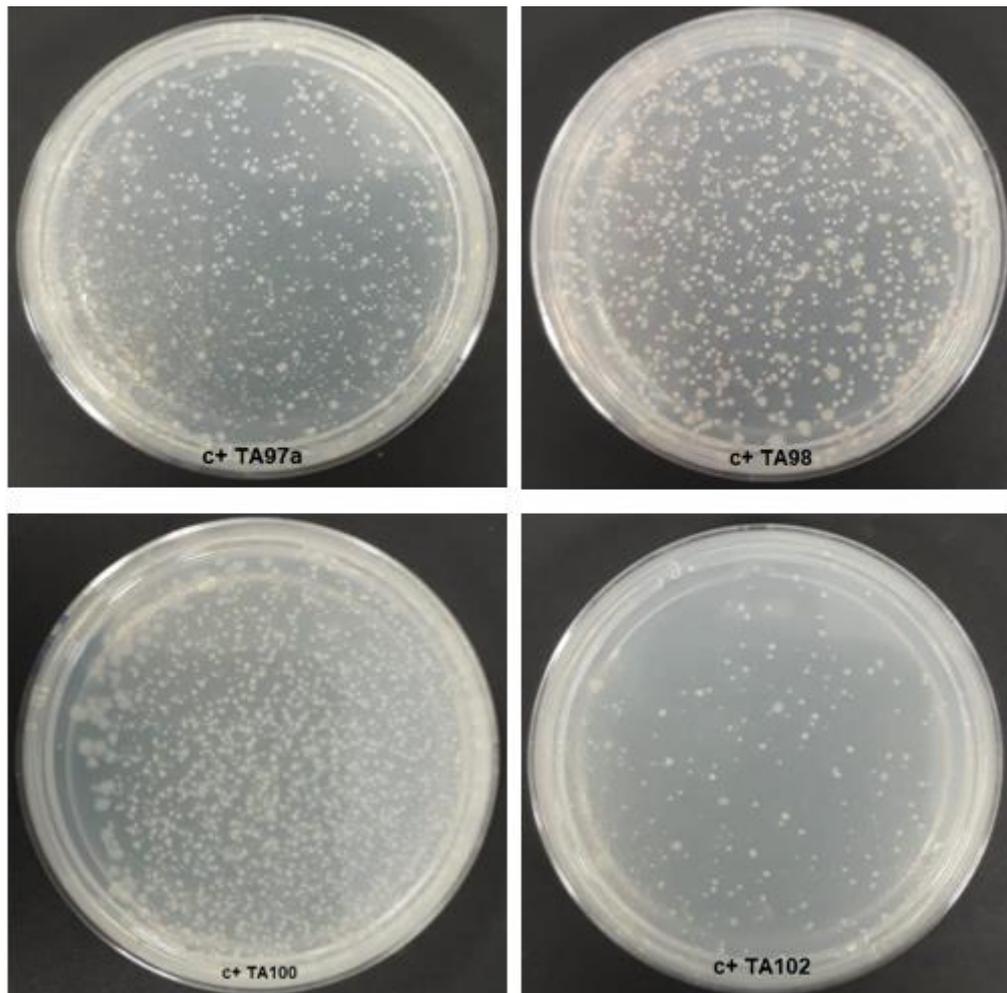
Figura 13 - Revertentes menor e maior concentração (+S9) – *Blend*
(TA97a; TA98; TA 100 e TA102).



Fonte: Elaboração própria.

O fato da formação do “tapete” de colônias nas placas não ter acontecido com as placas dos controles (Figura 14) mostra que não se trata de um evento causado por contaminação por fungos (confirmados por coloração de gram, resultados não mostrados), mas de uma característica do próprio *blend* quando exposto ao sistema microsomal.

Figura 14 - Controle positivo (c+) das linhagens com ativação metabólica (+S9) – *Blend* (TA97a; TA98; TA100; TA102).



Fonte: Elaboração própria.

No sentido de buscar a concentração segura do *blend* isoladamente, o teste foi realizado na presença de ativação metabólica em concentrações menores para se obter uma curva dose-resposta até completa ausência de mutagenicidade, e, em seguida realizar o teste com a mistura.

8.5 Cálculo para a definição das concentrações em nanogramas do *blend*:

Para encontrar uma concentração segura, não mutagênica para o parâmetro do Teste de Ames, trabalhamos com diluições. O *blend* é de 1,2%, ou seja, contém 1,2 g dissolvido em 100 mL, no entanto em teste anterior esta concentração se mostrou extremamente mutagênica, conforme mostrou a tabela 10. Para este novo teste trabalhamos com duas diluições para chegar em concentrações em nanogramas.

Para as primeiras concentrações foi feito a diluição de 1000µL do *blend* em 99000 µL de água estéril, em balão volumétrico e foi realizado a pipetagem das placas 4, 5 e 6 e como não convém trabalhar com pipetagens menores, desta primeira diluição, tomou-se 1000µL e foi novamente diluído em 99000µL de água estéril também em balão volumétrico e desta diluição foi realizado a pipetagem das placas 6 e 7, conforme exibido abaixo:

	1,2 g	100 mL
placas 4	0,12 mg/placa	1000 µL
placas 5	0,012 mg/placa	100 µL
placas 6	0,0012 mg/placa	10 µL
placas 7	0,00012 mg/placa	100 µL
placas 8	0,000012 mg/placa	10 µL

8.6 Teste de Ames – *Blend* e Mistura em nanogramas (+S9)

A partir dos resultados anteriores que se apresentaram mutagênicos, novos testes foram realizados em concentrações menores e com ativação metabólica para o fármaco *blend*. Nos testes realizados com a mistura, foi mantida a concentração do finasterida em 50 mg/mL em todas as placas teste, conforme resultados mostrados nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Resultados do Teste de Ames com Ativação Metabólica (+S9) - *Blend* (diluição) (TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a + S9	TA98 + S9	TA 100 + S9	TA 102 + S9
Blend (1,2mg/0,1 mL)	0,0^a	102 ± 14	14 ± 2	14 ± 2	142 ± 45
	0,12	204 ± 36 (1,9)	9 ± 5 (0,6)	9 ± 5 (0,6)	174 ± 22 (1,2)
	0,012	191 ± 40 (1,8)	17 ± 1 (1,2)	17 ± 1 (1,2)	194 ± 26 (1,3)
	0,0012	111 ± 7 (1,0)	13 ± 2 (0,9)	13 ± 2 (0,9)	222 ± 20 (1,5)
	0,00012	167 ± 12 (1,6)	17 ± 4 (1,2)	17 ± 4 (1,2)	222 ± 12 (1,5)
	0,000012	177 ± 71 (1,7)	15 ± 1 (1,0)	15 ± 1 (1,0)	188 ± 21 (1,3)
	Controle +	1424 ± 44 ^b	138 ± 53 ^b	2396 ± 292 ^b	312 ± 11 ^b

Legenda: M ± DV = desvio médio e padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: polietileno glicol 400 (PEG 400 - 100 µL / placa); Controle + = Controle positivo: ^b2-aminoantraceno (50 µL/placa - TA97a, TA98, TA100 e TA102), na presença de S9 (+S9).

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 12: Resultados do Teste de Ames com Ativação Metabólica (+S9) – Mistura: Finasterida + *Blend* (diluição) (TA97a; TA98; TA100; TA102).

Tratamento mg/placa		Número de revertentes (M ± DP) / placa e (IM)			
		TA 97a + S9	TA98 + S9	TA 100 + S9	TA 102 + S9
Finasterida 50mg/mL	Blend 1,2mg/0,1 mL				
0,0^a		120 ± 31	30 ± 4	200 ± 1	212 ± 32
5 mg/placa	0,12	167 ± 38 (1,3)	45 ± 6 (1,4)	135 ± 13 (0,6)	212 ± 14 (0,9)
	0,012	180 ± 33 (1,4)	67 ± 19 (2,1)	375 ± 52 (1,0)	198 ± 30 (0,9)
	0,0012	127 ± 31 (1,0)	56 ± 16 (1,8)	351 ± 68 (1,7)	238 ± 10 (1,1)
	0,00012	154 ± 21 (1,2)	64 ± 6 (2,0)	280 ± 81 (1,4)	233 ± 27 (1,0)
	0,000012	150 ± 22 (1,2)	72 ± 11 (2,3)	444 ± 87 (2,2)	218 ± 28 (1,0)
Controle +		1296 ± 44 ^b	1114 ± 78 ^b	1588 ± 78 ^b	312 ± 11 ^b

Legenda: M ± DV = desvio médio e padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^aControle negativo: polietileno glicol 400 (PEG 400 - 100 µL / placa); Controle + = Controle positivo: ^b2-aminoantraceno (50 µL/placa - TA97a, TA98, TA100 e TA102), na presença de S9 (+S9).

Fonte: Elaboração própria.

Observando o número de revertentes por placas nos volumes usados, nos ensaios com ativação metabólica, o *blend* não apresentou mutagenicidade, porém quando em mistura com finasterida os resultados foram mutagênicos para a cepa TA98 podendo indicar alguma interação ou até mesmo pela fragilidade desta linhagem.

Desses resultados é importante ressaltar que a interpretação do teste de Ames para mutagenicidade positiva leva em consideração que é suficiente uma única cepa mostrar-se mutagênica, em qualquer concentração e com ou sem ativação metabólica.

9 DISCUSSÃO

Os dois medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento farmacológico da AAG são o minoxidil (tópico) e a finasterida (oral), considerados como padrão-ouro (IAMSUMANG; LEERUNYAKUL; SUCHONWANIT, 2020). Assim como o FDA, a Anvisa designa a alopecia como doença cosmética (GENSURE, 2018) e, como consequência, estimula o uso *off label* de novos tratamentos para evitar a progressão da queda e, ao mesmo tempo, promover o crescimento dos cabelos.

Em 2008, Fernandes e Sinorini relataram que o processo de microagulhamento estimulava e liberava fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsáveis pela regulação fisiológica das células da papila dérmica e da neoangiogênese. Na mesma direção, Kubanov e colaboradores (2017) demonstraram que a redução da expressão de VEGF na pele do couro cabeludo influenciava no quadro de AAG em homens e mulheres, em detrimento de outros fatores que prevalecem no acometimento da patologia principalmente em homens. Em adição, Gentile e Garcovich (2019) demonstraram que os fatores de crescimento obtidos pelas plaquetas (PRP) influenciavam no crescimento do cabelo através da proliferação celular para prolongar a fase anágena, induzir o crescimento e proliferação celular, estimular o desenvolvimento do folículo capilar e suprimir a apoptose folicular. Dessa forma, acrescentar fatores de crescimento (ALDAG *et al.*, 2016) ao tratamento tradicional de AAG passou a ser uma opção médica *off label* muito atraente, administrada através de intradermoterapia, microagulhamento com o uso de canetas ou de *rollers* e através de uma técnica denominada Microinfusão de Medicamentos na Pele (MMP®).

Por escassez de dados na literatura, este estudo foi conduzido com a finalidade de se conhecer o potencial mutagênico da associação finasterida + *blend* para inferir a segurança de tal uso. A discussão que se segue leva em consideração os resultados obtidos da Toxicidade preliminar e do Teste de Ames (sem e com ativação metabólica).

No teste de toxicidade preliminar da finasterida, as concentrações testadas entre 0,625 – 5,0 mg/placa não apresentaram toxicidade à cepa testada (TA100) e, por coerência às informações técnicas (CAYMAN, 2019) atestando que a finasterida

não é mutagênica (sem e com ativação metabólica) sob este parâmetro, assumimos esta condição no presente estudo. Além disso, o referido fármaco é utilizado há muitos anos em humanos para tratamentos de hiperplasia benigna da próstata (HBP) (GOODMAN *et al.*, 2019) e AAG, tendo, portanto, sua eficácia e segurança comprovadas e regulamentadas pelos órgãos reguladores. Já o *blend* constituído pelos fatores de crescimento IGF, bFGF, VEGF e pelo complexo glicina-histidina-lisina:cobre, GHK:Cu (1:1) apresentou toxicidade à cepa TA100 a partir da concentração de 2,5 mg/placa. Verificar a toxicidade preliminar dos compostos antes de submetê-los ao teste de Ames (sem e com ativação metabólica) é uma etapa importante que leva em consideração a viabilidade das cepas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Na ausência de ativação metabólica nenhum composto (finasterida, *blend* ou mistura) mostrou-se mutagênico nas concentrações estudadas, em que pese a ocorrência de certa toxicidade como para a finasterida na maior concentração (5,0 mg/placa) na cepa TA97a. No teste do *blend*, a toxicidade também foi observada em algumas concentrações (já apontada a partir de 2,5 mg/placa em TA100), mas agora na concentração de 1,2 mg/placa em TA98. Essas toxicidades podem ter influenciado em algum grau na inibição do crescimento de colônias nas cepas testadas quando expostas à mistura (finasterida + *blend*), conferindo não mutagenicidade à mistura.

A performance de ensaios *in vitro* é descrita em termos de sensibilidade (proporção de carcinógenos genotóxicos que produzem resultados positivos em um dado ensaio) e especificidade (proporção de não-carcinógenos – e idealmente não-genotóxicos carcinógenos – que produzem resultados negativos) (COOPER; SARACCI; COLE, 1979). O teste de Ames exhibe razoável especificidade (77%), e pobre sensibilidade (60%) (KIRKLAND *et al.*, 2005; WALMSLEY; BILLINTON, 2011).

Quando a mistura foi testada na presença de enzimas metabolizadoras, todas as cepas tornaram-se potencialmente mutagênicas pelo parâmetro do teste de Ames. A finasterida é biotransformada por enzimas microsossomais CYP3A4 para formar dois metabólitos ω -hidroxifinasterida e finasterida- ω -ácido-óico (HUSKEY *et al.*, 1995) e posteriormente eliminada conjugada ao ácido glicurônico (LUNDAHL *et al.*, 2009). O fato de não se ter conhecimento da formação de metabólitos intermediários na reação de biotransformação isenta a participação da finasterida na mutagenicidade apresentada pela mistura.

Ao testar o *blend* isoladamente, na concentração usual (1,2 mg/100 mL), na presença do sistema de metabolização confirmou-se a mutagenicidade revelando que as enzimas microssomais ativaram os constituintes presentes no *blend*, que por sua vez produziram reversão das bactérias para a sua forma selvagem (+*his*, com índices de mutagenicidade (IM) ≥ 2). O crescimento das colônias foi tão intenso e se deu em todas as cepas testadas (Figura 13), principalmente em placas que continham a maior concentração do *blend*.

Uma explicação para este crescimento inesperado pode surgir de Nylund e Einistö (1993), que publicaram sobre a influência de amostras biológicas e proteínas no teste de Ames/*Salmonella*, uma vez que essas moléculas possuem histidina e fatores de crescimento relacionados à histidina que, por sua vez, podem produzir um resultado falso positivo. Neste estudo trabalhamos com uma mistura que contém fatores de crescimento – IGF, bFGF, VEGF e complexo de cobre glicina-histidinilisina, GHK: Cu (1:1). A presença de histidina no complexo de cobre poderia explicar os resultados obtidos uma vez que o crescimento descontrolado só ocorreu na presença de ativação metabólica, ou seja, após a reação de biotransformação. Além disso, Nylund e Einistö (1993) também alertam sobre a presença de preparações enzimáticas devido à possível quebra de estruturas proteicas e subsequente liberação de histidina livre e dipeptídeos contendo histidina em soluções de teste.

Considerando a forma de administração por Microinfusão de Medicamentos na Pele (MMP®) espera-se que após agir nos tecidos os compostos sejam absorvidos, biotransformados e eliminados, como usualmente acontece com todas as substâncias químicas em organismos vivos (ARBACH; SAMIR & GODOY, 2013), o que tornaria o *blend* um agente indireto para causar mutagenicidade nas concentrações estudadas, pois inevitavelmente seria exposto a um arsenal enzimático, incluindo as enzimas microssomais. Neste cenário todas as mutações (*frameshift* ou substituição) previstas genotipicamente nas linhagens *Salmonella*/microssoma estariam contempladas pelo *blend*. Segundo Arigony, De Oliveira e Machado (2013) o dano ao DNA é um dos fatores mais importantes que podem comprometer a homeostase, resultando em doenças crônicas e certos tipos de câncer. Até mesmo componentes endógenos, como os micronutrientes, podem impactar negativamente o DNA, como já observado em desequilíbrio causado por excesso ou deficiência de micronutrientes no corpo, incluindo o cobre (BERGSTROM *et al.*, 2012), ressaltando que cobre é um dos compostos do *blend*.

Novos ensaios do *blend* foram realizados com concentrações menores, entre 0,12 - 0,000012 mg/placa na presença de ativação metabólica (+S9) e nesta etapa nenhum efeito mutagênico foi observado nas cepas testadas (tabela 11). Nos testes com a mistura se manteve as concentrações do *blend* testado isoladamente e uma concentração fixa de finasterida (5 mg/placa), e nesta fase efeitos mutagênicos foram observados mesmo em concentrações mais baixas na linhagem TA98 (tabela 12), sensível a mutação por deslocamento no quadro de leitura (MARON; AMES, 1983). A linhagem TA98 é um *hisD3052-1* alelo *frameshift* de *Salmonella typhimurium*, tem a adição do plasmídeo pKM101 para aumentar a sensibilidade do mutágeno (DeMARINI, 2000), possui uma exclusão em *uvrB* ($\Delta uvvB$) incluindo os genes do nitrato redutase e da biotina (*chl*, *bio*). O alelo *hisD3052* é um alvo para reversão e as mutações podem ser categorizadas em cinco grupos gerais: *hotspot*, deleções, duplicações, inserções e complexo (DeMARINI *et al.*, 1998). A Linhagem TA100 é um *hisG46* que codifica a primeira enzima em sua biossíntese, resulta na substituição de prolina para leucina (G:C – A:T) sendo marcadores para agentes mutágenos que causam substituição de pares de bases (MARON; AMES, 1983). Os achados de Jurado, Duram e Puevo (1993) mostram que ainda, que a linhagem TA100 possui um histórico de resposta mutagênica mais sensível que a TA98.

Entretanto, deve-se tomar muito cuidado na extrapolação de dados obtidos de ensaios *in vitro*, pois outros compostos que ocorrem naturalmente nos organismos de mamíferos, como a cisteína e a glutatona, o mais importante antioxidante do nosso organismo também foi mutagênico (GLATT; PROTIC-SABLJIC; OESCH, 1983).

Embora os testes tenham demonstrado mutagenicidade indireta nos primeiros ensaios, dependente de ativação metabólica, da mistura e do *blend* para as cepas TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* e no último ensaio da mistura para a cepa TA98 deve-se ressaltar que o teste *in vitro* em bactéria é o primeiro teste na avaliação de toxicidade de substâncias, com uma bateria extensa de outros testes *in vitro*, *in vivo*, em mamíferos – agudo, sub-agudo, crônico – tendo que reunir evidências comprovadas oriundas de estudos com animais e de ocorrência em humanos para se imputar determinada substância como mutagênica (WALMSLEY; BILLINTON, 2011). Ou seja, a administração isolada do *blend* ou em combinação não pode ser interpretada como mutagênica para o uso humano.

10 CONCLUSÃO

O *blend* comercial estudado não mostrou ser um mutágeno direto, por não apresentar mutagenicidade na ausência de ativação metabólica. Entretanto, na presença de ativação metabólica, concentrações $\geq 1,2$ mg/placa do *blend* resultaram em falso-positivo de mutagenicidade por conter em sua composição, histidina no complexo de cobre, que foi completamente atenuado em concentrações de 0,12 a 0,000012 mg/placa, consideradas seguras. Mesmo em concentrações seguras do *blend*, a associação com a finasterida induziu mutação reversa nas cepas TA98 e TA100 (+S9), cujas evidências da literatura, pode ter sido causada pelo metabólito finasterida- ω -ácido-óico.

REFERÊNCIAS

- ALDAG, C.; NOGUEIRA, TEIXEIRA D.; LEVENTHAL P.S. Skin rejuvenation using cosmetic products containing growth factors, cytokines, and matrikines: a review of the literature. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 9, p. 411-419, 2016.
- ALMEIDA, H. M.; MARQUES, H. M. C. Physicochemical characterization of finasteride: PEG 6000 and finasteride: Kollidon K25 solid dispersions, and finasteride: β - cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, p. 397-406, 2011.
- ALONSO, L.; FUCHS, E. The hair cycle. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 391-393, 2006.
- AMES, B. N.; DURSTON, W. E.; YAMASAKI, E.; LEE, F. D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, p. 2281-2285, 1973.
- ARBACHE; SAMIR & GODOY, C. E. Microinfusion of drugs into the skin with tattoo equipment. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 5, p. 70-74, 2013.
- ARIGONY, A. L.; DE OLIVEIRA, I. M.; MACHADO, M. *et al.* The influence of micronutrients in cell culture: a reflection on viability and genomic stability. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- BARSANTI, L. **Saiba tudo sobre os cabelos: estética, recuperação capilar e prevenção da calvície**. São Paulo: Elevação, 2009.
- BERGSTROM, T.; ERSSON, C.; BERGMAN, F.; MOLLER, L. Vitamins at physiological levels cause oxidation to the DNA nucleoside deoxyguanosine and to DNA - alone or in synergism with metals. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 511-517, 2012.
- BHASIN, S. Androgen Effects in Mammals. *In*: HENRY, H. L.; NORMAN, A. W. **Encyclopedia of Hormones**. Maryland Heights: Academic Press, p. 70-83, 2003.
- BIENOVA, M. A rationally designed topical agent for androgenetic alopecia: first clinical experience. **Dermatologic Surgery**, v. 28, n. 8, p. 678-85, 2005.
- BLUME-PEYTAVI, U. *et al.* Comparison of the efficacy and safety of topical Minoxidil and topical alfatradiol in the treatment of androgenetic alopecia in women. **Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, p. 391-395, 1997.
- BLUMEYER, A.; TOSTI, A., *et al.* Evidence Based (s3) guideline for the treatment of Androgenetic alopecia in women and in men. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, p. 1-36, 2011.

BRENNER, F. M.; SOARES, I. F. Alopecia androgenética masculina. **Revista de Ciências Médicas Campinas**, v. 18, n. 3, p.153-161, 2009.

BRUEGGEMEIER, R. W.; MILLER, D.D.; DALTON, J.T. Estrogen, Progestins and Androgens. *In*: WILLIAMS, D. A. *et al.* **Foyes's Principles of Medicinal Chemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 9, p. 685-717, 2002.

CALLAND, R. M. **Cosmiatria em dermatologia: usos e aplicações**. São Paulo: Roca, 2007.

CASH T.F. The psychosocial consequences of androgenetic alopecia: a review of the research literature. **British Journal Dermatology**, v. 141, n. 3, p. 398-405, 1999.

CAYMAN CHEMICAL COMPANY. **Material Safety Data Sheet: Finasteride**. Revision: 05/13/2019. Disponível em: <https://www.caymanchem.com/msdss/14938m.pdf>. Acesso em: 02 July 2020.

CHON, S.Y. *et al.* Chemotherapy-induced alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 67, n. 1, p. 37–47, 2012.

FARMACOPEIA portuguesa 9.8. Lisboa: INFARMED, 2010.

CONTIN, L. A. Male androgenetic alopecia treated with microneedling alone or associated with injectable minoxidil by microinfusion of drugs into the skin. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 8, n. 2, p. 158-61, 2016.

COOPER, J. A.; SARACCI, R.; COLE, P. Describing the validity of carcinogen screening tests. **British Journal of Cancer**, v. 39, p. 87–89, 1979.

COSTA, A. F. B. **Microagulhamento para tratamento da alopecia androgenética masculina**. 2016. Monografia (Especialista em Biomedicina Estética) - Recife, Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa e Centro de capacitação Profissional, Recife 01 de julho de 2016.

CZUBATKA, IU., KIMEĆ, ML., *et al.* Assessment of the usefulness of dihydrotestosterone in the diagnostics of patients with androgenetic alopecia. **Postępy Dermatology and Alergology**, p. 207-213, 2014.

DEMARINI, D. M. Influência do reparo de DNA em espectros de mutação em Salmonella. **Elsevier**, v. 450, n. 1-2, p. 5-17, 2000.

DEMARINI, D. M.; SHELTON, M. L.; ABU-SHAKRA, A.; SZAKMARY, A.; LEVINE, J. G. Espectros de mutações espontâneas de frameshift no alelo his D3052 de *Salmonella typhimurium* em quatro fundos de reparo de DNA. **Genetics**, v. 149, n. 1, p. 17-36, 1998.

DUARTE, N. C. B. **Estudo de pré-formulação para o desenvolvimento de sistemas sólidos à base de minoxidil sulfato**. 44 f., il. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília. 2015.

ELLIS, J. A.; SINCLAIR, R.; HARRAP, S. B. Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 4, n. 22, p. 1-11, 2002.

FERNANDES, D.; SIGNORINI, M. Combating photoaging with percutaneous Collagen Induction. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 192-199, 2008.

FISCHER, T. W., TRÜEB, R. M., *et al.* Topical melatonin for treatment of Androgenetic Alopecia. **International Journal of Trichology**, p. 236-245, 2012.

FRANKLIN, M. E., ZAGRABBE, K., BENAVIDES, K. L. Trichotillomania and its treatment: a review and recommendations. **Expert Review Neurotherapeutics**, v. 11, n. 8, p. 1165–1174, 2011.

GENSURE, ROBERT. **Pharmacological Treatment of Alopecia**. 2018.

GENTILE, P.; GARCOVICH, S. Advances in Regenerative Stem Cell Therapy in Androgenetic Alopecia and Hair Loss: Wnt path, Growth-Factor, and Mesenchymal Stem Cell Signaling Impact Analysis on the Cell Growth and Hair Follicle Development. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 466, 2019.

GIRMAN, C. J. *et al.* Patient-Perceived Importance of Negative Effects of Androgenetic Alopecia in Women. **Journal of Women's Health & Gender-based Medicine**, v. 8, n. 8, p. 1091-1095, 1999.

GLATT, H.; PROTÍĆ-SABLJIĆ, M.; OESCH, F. **Mutagenicity of glutathione and cysteine in the Ames test**. *Science*, New Series, Vol. 220, No. 4600, pp. 961-963. May 27, 1983. Published by: American Association for the Advancement of Science Stable.URL: <http://www.jstor.org/stable/1690643> Accessed: 18-09-2016 08:47UTC

GOODMAN, P. J. *et al.* Long-Term Effects of Finasteride on Prostate Cancer Mortality. **New England Journal of Medicine**, v. 380, p. 393-394, 2019.

GORDON, K. A., TOSTI, A. Alopecia: evaluation and treatment. Clinical. **Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 4, n. 101-106, 2011.

GORMLEY, G. J. Finasteride: a clinical review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 49, p. 319-324, 1995.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 726, 2008.

GRUBBS H.; NASSEREDDIN A; MORRISON M. **Embriologia, Cabelo**. [Atualizado em 1 de junho de 2020]. *In*: Stat Pearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): Stat Pearls Publishing; 2020. Disponível em: https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=pt-BR&prev=search&pto=aue&rurl=translate.google.com&sl=en&sp=nmt4&u=https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534794/&usq=ALkJrhiNViajHQuvWF7Ti_8udKJ60bGxcq (Acesso em 01 de junho de 2020).

HABIF, T. P. **Dermatologia clínica: Guia colorido para diagnóstico e tratamento**, 4a ed. Porto Alegre: Artmed, p. 848-851, 2005.

HUNT, N.; MCHALE, S. The psychological impact of alopecia. **British Medical Journal**, v. 331, p. 951-953, 2005.

HURK, C. J. G. *et al.* Impact of alopecia and scalp cooling on the wellbeing of breast cancer patients. **Psycho-Oncology**, v. 19, n. 7, p. 701-709, 2010.

HUSKEY, S. W. *et al.* Identification of human cytochrome P450 isozymes responsible for the in vitro oxidative metabolism of finasteride. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, p. 1126–1135, 1995.

IAMSUMANG, W.; LEERUNYAKUL, K.; SUCHONWANIT, P. Finasteride and Its Potential for the Treatment of Female Pattern Hair Loss: Evidence to Date. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 14, p. 951-959, 2020.

IBERO QUÍMICA MAGISTRAL. **Finasterida**. Disponível em: <https://www.iberquimica.com.br/Arquivos/Insumo/arquivo-143724.pdf> (acesso em 10/09/2020).

INFARMED. **Finasterida 1 mg**. Disponível em: http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=52367&tipo_doc=rcm. (Acesso em 03 de fevereiro de 2020).

INFINITY PHARMA. **Finasterida tratamento hiperplasia prostática benigna**. Disponível em: <https://infinitypharma.com.br/wp-content/uploads/2020/05/Finasterida.pdf> (Acesso em 10/09/2020).

JURADO, J.; DURÁN, E. A.; PUEYO, C. Genetic differences between the standard Ames tester strains TA100 and TA98. **Mutagenesis**, v. 8, n. 6, p. 527–532, 1993.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; HENDERSON, L.; MÜLLER, L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research*, v. 584, n. 1-2, p. 1-256. *Erratum in: Mutation Research*, v. 588, n. 1, p. 70, 2005.

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, p. 16.1- 6.4, 2008/2009.

KRAUSE, K.; FOITZIK, K. **Biology of hair follicle: the basics**. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, n. 25, p. 2–10, 2006.

KUBANOV, A. A.; GALLYAMOVA YU. A.; KORABLEVA, O. A. The Study of Growth Factors in Patients with Androgenic Alopecia. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 10, n. 3, 2017.

LEE, W. S., LEE, H. J. Characteristics of androgenetic alopecia in Asian. **Annals of Dermatology**, n. 3, p. 243-52, 2012.

LOBO, I.; MACHADO, S., SELORES, M. A. Alopecia androgenética na consulta de tricologia do Hospital Geral de Santo António (cidade do Porto, Portugal) entre 2004 e 2006: estudo descritivo com componente analítico. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 83, p. 270-271, 2008.

LUNDAHL, A. *et al.* Identification of finasteride metabolites in human bile and urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, p. 2008–2017, 2009.

MACHADO, C. B. F. **Alopecia androgenética masculina**: revisão e atualização em tratamentos. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Estética), Universidade Tuiuti, Curitiba, p. 2, 2011.

MACHADO, J. L.; VIERA, M. S.; SANTAMARÍA, N. F. O que sabemos sobre os inibidores da 5 alfa redutase? **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 10 n. 2, p. 97-101, 2018.

MAIER, P. S. **Expressão gênica da Aromatase em folículos pilosos do vértice do escalpo de mulheres com ciclos ovulatórios e pacientes com síndrome dos ovários policísticos (PCOS)**: Análise de associação com parâmetros hormonais e metabólicos. 2008. 56f. Dissertação (Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia) – UFRGS, Porto Alegre, 2008.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MARONA, H. R. N.; STORTI, M. P. B.; NETO, V. A. L. Flutamida: Revisão de suas propriedades farmacológicas e físicoquímicas. Métodos de análise em formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 1, p. 37-44, 2004.

MCCOY J.; ZIERING C.; BIOLOGY A.; STE F. Botanical Extracts for the Treatment of Androgenetic Alopecia. **International Journal of Life science and Pharma Research**, v. 2, n. 4, p. 31-38, 2012.

MELLA, J. M. *et al.* Efficacy and safety of finasteride therapy for androgenetic alopecia: a systematic review. **Archives of Dermatology**, v. 146, n. 10, p. 1141-1150, 2010.

MESSENGER, A. Male Androgenetic Alopecia. *In*: BLUME-PEYTAVI, U.; TOSTI, A.; TRÜEB, R. (eds). **Hair Growth and Disorders**. Springer, Berlin: Heidelberg, 2008. p. 159-170.

MIRMIRANI, P. Managing hair loss in midlife women. **Maturitas**, v. 74, n. 2, p.119–122, 2013.

MITEVA, M.; TOSTI, A. Treatment options for alopecia: update, looking to the future. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v. 13, n. 9, p. 1271-1281, 2012.

MOREIRA, R. R. D. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MULINARI-BRENNER, F; SOARES, I. F. Alopecia androgenética masculina: uma atualização. **Revista de Ciências Médicas de Campinas**, v. 18, n. 3, p. 153-161, 2009.

NELIGAN, P. C.; GURTNER, G. C. Enxerto de pele. *In* Cirurgia plástica: princípios. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 321, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NICOL, N. H. Anatomy, and physiology of the skin. **Dermatology Nursing**, v. 17, n. 1, p. 62, 2005.

NYLUND, L.; EINISTÖ, P. Teste de mutagenicidade de amostras contendo proteínas e biológicas usando o teste de incorporação de placas de Ames / Salmonella e o teste de flutuação. **Mutation Research**, v. 272, n. 3, p. 205-214,1992.

ORNELAS J.; SIVAMANI R. K. The Role of Botanical Products in the Treatment of Alopecia. **Hair Therapy & Transplantation**, n. 5, p. 137, 2015.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2008. p. 174, 178, 181.

PAUS, R. *et al.* A Comprehensive Guide for The Recognition and Classification of Distinct Stages of Hair Follicle Morphogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 113, n. 4, p. 523–532, 1999.

PEREIRA, E., SINCLAIR, R. Adrogenetic Alopecia. **Textbook of Trichology**, n. 11, p. 1-13, 2014.

PEREZ, B. S. H. Ketocazole as an adjunct to finasteride in the treatment of androgenetic alopecia in men. **Medical Hypotheses**, v. 62, n. 1, p. 112-115, 2004.

PHARMASPECIAL. **Fatores de crescimento e peptídeos bioidênticos®** : terapia combinada. Disponível em:

[95 lit fatores de crescimento e peptideos bioidenticos - terapia combinada com protocolos.pdf \(pharmaspecial.com.br\)](#). Acesso em: 01 dez. 2020.

POZEBON, D.; DRESSLER, V.L.; CURTIUS, A. J. Análise de cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 838–846, 1999.

PRICE, V. H. *et al.* Lack of Efficacy of Finasterida in Postmenopausal Women with Androgenetic Alopecia. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 5, p. 768-776, 2000.

RAFI, A. W., KATZ, R. M. Pilot Study of 15 Patients Receiving a New Treatment Regimen for Androgenetic Alopecia: the effects of Atopy on AGA. **ISRN Dermatology**, p. 1-11, 2011.

RANDALL, V. A. Hormonal regulation of hair follicles exhibits a biological paradox. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 2, p. 274-285, 2007.

RATHNAYAKE, D., SINCLAIR, R. Male androgenetic alopecia. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, n. 11, p. 1295-1304, 2010.

RISHIKAYSH, P.; DEV, K.; *et al.* Signaling involved in hair follicle morphogenesis and development. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 15, p.1647-1670, 2014.

RIVITTI. E. A. Alopecia areata: revisão e atualização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, 2005.

ROBBINS, C. R. **Chemical and Phisycal Behavior of Human Hair**. New York: Springer, 2000.

ROSS, E. K.; SHAPIRO, J. Management of Hair Loss. **Dermatologic Clinics**, v. 23, n. 2, p.227-243, 2005.

SANTOS, Z.; AVCI, P.; HAMBLIN, M. R. Drug Discovery for Alopecia: gone today, hair tomorrow. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p.269–92, 2015.

SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. **Anatomy & Physiology**. 6th ed. MCGRAWHILL, 2003.

SEI, M. C. K. Uso da Mesoterapia para Alopecia Androgenética: uma revisão de literatura. **BWS Journal**, v. 3, n. e20060080, p. 1-7, 2020.

SENNETT, R.; RENDL, M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 8, p.917–927, 2012.

- SHAPIRO, J.; THIERS, B. H. **Clínica dermatológica - distúrbios capilares: Conceitos atuais em Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento.** 1 ed. [S.L.]: Di Livros, 2015. p. 253
- SINCLAIR, R. D. Male androgenetic alopecia. **Journal of Men's Health & Gender**, v. 1, n. 4, p.319-327, 2004.
- SINCLAIR, R. D. Male androgenetic alopecia (Part II). **Journal of Men's Health & Gender**, v. 2, n.1, p. 38-44, 2005.
- SPERLING, L. C., SINCLAIR, R. D.; SHABRAWI-CAELEN, L. EL. **Alopecias.** *In* Dermatologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 1093–1112
- STEINER, D. **Alopecia na mulher.** Rio de Janeiro – RJ, 2000.
- STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of The Hair Follicle Cycling. **Physiological Reviews**, n. 81, p. 449-494, 2001.
- STRUMÌA, R. *et al.* Skin signs in anorexia nervosa. **Dermatology**, v. 203, n. 4, p.314–317, 2001.
- SUCCI, I. C. B. **Alopecia areata.** *In*: KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, A. Dermatologia estética. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 185-192
- TOBIN, D. J. Introduction to skin aging. **Journal of Tissue Viability**, n. 16, p. 1-10, 2016.
- TRUEB, Ralph M. Molecular Mechanisms of Androgenetic Alopecia. **Experimental Gerontology**, v. 37, n. 8-9, p. 981-990, 2002.
- UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. S. **Teste de mutagenicidade com Salmonella typhimurium (teste de Ames) como indicador de mutagenicidade em potencial para mamíferos.** *In*: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Editora da Ulbra, ISBN 85-7528-067-08, 2003. p. 12-81
- VALENT, G. **Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água do Estado de São Paulo, através do teste de Ames.** Tese de Doutorado (Ciências Biológicas), Campinas, SP. UNICAMP, p. 134, 1990.
- VARANDA, E. A. *et al.* Mutagenic and cytotoxic activity of na isocoumarin (paepalantine) isolated from paepalanthus vellozioides. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85-95, 1997.
- VARGAS, V. M. F.; MOTTA, W. E. P.; HENRIQUES, J. A. E. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutation Research**, v. 319, p. 31-45, 1993.

VAROTHAI, S.; BERGFELD, W. F. Androgenetic Alopecia: An Evidence-Based Treatment Update. **American Journal of Clinical Dermatology**, n. 15, p. 217-230, 2014.

VICKERS, E. R. An Analysis of the Safety and Efficacy of Topical Zinc-Thymulin to treat Androgenetic Alopecia. **Hair Therapy and Transplantation**, n. 7, p. 147, 2017.

VOGT, A. *et al.* **Biology of the Hair Follicle**. In: BLUME-PEYTAVI, U. *et al.* Hair Growth and Disorders. Berlin: Springer, 2008. p. 1-23

WALMSLEY, R. M.; BILLINTON, N. How accurate is in vitro prediction of carcinogenicity? **British Journal of Pharmacology**, n. 162, p. 1250–1258, 2011.

WEGER, N.; SCHLAKE, T. Igf-I signalling controls the hair growth cycle and the differentiation of hair shafts. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 9, p. 2135-2136, 2006.

WELLE, M. M.; WIENER, D. J. The Hair Follicle: A Comparative Review of Canine Hair Follicle Anatomy and Physiology. **Toxicologic Pathology**, v. 44, n. 4, p. 564-574, 2016.

WILLIAMSON, D; GONZALEZ, M; FINLAY, A. Y. The effect of hair loss on quality of life. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 15, p.137-139, 2001.

YOSHIDA, E. H. *et al.* Evaluation of Betulin Mutagenicity by Salmonella/Microsome Test. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 3, p. 443-447, 2016.

YOUNG, B. *et al.* **Weather's Functional Histology: A Text and Colour Atlas**. 4th ed., Philadelphia: Elsevier, 2015.

ZAIDI, Z.; WALTON, S. **A Manual of Dermatology**. 2nd ed., Jaypee Medical, 2015.