UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

SÉRGIO CLEMENTINO DA COSTA

Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de *Danio rerio.*

RECIFE
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
SÉRGIO CLEMENTINO DA COSTA

Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de *Danio rerio.*

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador:
Professor Dr. Pabyton Gonçalves Cadena
Co orientadora:
Professora Drª. Marilia Ribeiro Sales Cadena

RECIFE
2018

SÉRGIO CLEMENTINO DA COSTA

Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de *Danio rerio*

Aprovado em: 28 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

_____

Profa. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim (1° Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

_____

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra (2° Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

_____

Prof. Dr. Paulo Eleutério de Souza (Suplente)
Departamento de Biologia da UFRPE

À minha família, em especial à minha esposa, Manuelita, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho e presença incansável, não medindo esforço para me ajudar ao longo do período de elaboração desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força nos momentos difíceis da vida chegando a mais uma realização;

Ao professor Pabyton Gonçalves Cadena, pela oportunidade no meu ingresso no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), pela confiança, motivação e seus constantes ensinamentos;

A todos os meus familiares, em especial a minha sogra Dona Raquel pelo apoio e motivação nesta jornada;

A todos os membros do laboratório, pela ajuda e apoio nos momentos mais críticos, em especial a Ericka Queiroz, pela atenção e ajuda nas análises estatísticas sempre que precisei;

Aos amigos da Guarda Civil Municipal do Recife (GCMR), em especial Insp. Antonino, André, Bruno, Jamerson e Kayquy pelo companheirismo e apoio nos momentos mais apertados;

À UFRPE por me fornece a estrutura necessária para a realização do trabalho, fazendo parte da construção dos meus conhecimentos;

Aos integrantes da banca examinadora, por ter aceitado o convite e pela atenção dada ao trabalho.

Obrigado!

"Seu futuro ainda não foi escrito, não existe, nem o de ninguém. Seu futuro é o que você quiser fazer dele, portanto faça-o bem".

Dr. Emmett Brown,

-De volta para o futuro III

RESUMO

A finasterida e a testosterona são hormônios que possuem ação anti-androgênica (inibição da 5α-redutase) e androgênica respectivamente, que podem agir como disruptores endócrinos causando efeitos negativos aos animais aquáticos e suas proles. A finasterida foi desenvolvida inicialmente para tratar a hiperplasia prostática benigna, porém, foi apresentada como uma grande descoberta no tratamento da Alopecia androgenética (calvície), já a testosterona é o hormônio responsável pelas características sexuais secundárias e tem como metabólito mais ativo a di-hidrotestosterona, principal responsável pela calvície. Entretanto, a finasterida assim como a testosterona são comumente usadas em diversas situações, tanto por homens no tratamento contra a perda de cabelo (finasterida) ou na reversão sexual de peixes (testosterona), o que eleva as presenças desses hormônios no ambiente aquático. Uma vez no ambiente tanto a finasterida como a testosterona passam a ter ação de disruptores endócrinos, sendo um dos mais potentes poluentes aquáticos. Por possui propriedades hidrofóbicas que reduz suas biodisponibilidades, tais hormônios podem ser complexados a ciclodextrinas (CDs) o que reduzir esta limitação, logo sua utilização em complexos de inclusão aumentaria sua solubilidade e absorção, podendo alterar uma ou mais vias hormonais. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos do complexo de inclusão Finasterida β-ciclodextrina (β-CD) e Testosterona β-ciclodextrina (β-CD), através da exposição crônica em concentrações subletais sob os e embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). Os embriões foram expostos por períodos de 96 horas pós-fertilização para a avaliação da mortalidade, efeitos teratogênicos e frequência cardíaca. Os grupos foram divididos em: controle, finasterida (FIN) e testosterona (T) livres nas concentrações de 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L, e finasterida (FIN-β-CD) e testosterona (T-β-CD) complexadas a β-CD nas concentrações de 280 e 4480 ng/L. Os adultos foram expostos por um período de 60 dias para a avaliar alterações comportamentais e sobrevivência diária relacionadas a exposição de finasterida (FIN) e testosterona (T) livres e complexadas (β-CD) nas concentrações 280 e 4480 ng/L. Os embriões, não apresentaram mortalidade nas concentrações de 280 - 4480 ng/L em todo os todos os grupos expostos. Efeitos teratogênicos, de forma semelhante também não foram observados nos grupos nas diferentes concentrações. Nas frequências cardíacas dos embriões, foram constatadas variações significativas ($p <$

0,05) quando comparadas ao grupo controle em todos os grupos expostos. Os adultos expostos às concentrações de finasterida e testosterona livres e complexadas apresentaram modificações ($p < 0,05$) na frequência de exibição de comportamentos ativos como Nadar lento e Nadar rápido, como também nos comportamentos agonísticos. Conclui-se então, que em testes com os embriões, FIN e FIN-β-CD assim como T e T- β-CD, podem modificar suas frequências cardíacas e que a exposição dos adultos aos mesmo hormônios promoveram uma redução na sua capacidade locomotora e um aumento na agressividade dos animais.
PALAVRAS-CHAVE: Anti-androgênica, peixes, hormônios, Complexo de inclusão, Comportamento animal, Disruptor endócrino, Efeitos toxícos.

ABSTRACT

Finasteride and testosterone are hormones that have anti-androgenic action (inhibition of 5α-reductase) and androgen respectively, which can act as endocrine disruptors causing negative effects on aquatic animals and their offspring. Finasteride was initially developed to treat benign prostatic hyperplasia, however, was presented as a major discovery in the treatment of androgenetic alopecia (baldness) already the testosterone is the hormone responsible for secondary sexual characteristics and has the most active metabolite the dihydrotestosterone, main responsible for baldness. However, finasteride as well as testosterone are commonly used in various situations, both by men in the treatment against hair loss (finasteride) or sexual reversal of fish (testosterone), which increases the presence of these hormones in the aquatic environment. Once in the environment both finasteride and testosterone begin to have action of endocrine disruptors, being one of the most powerful aquatic pollutants. Because it has hydrophobic properties which reduces their bioavailability, such hormones can be complexed to cyclodextrins (CDs) to reduce this limitation, therefore its use in inclusion complexes would increase its solubility and absorption, and may change one or more hormonal pathways. In view of the foregoing, the present study aims to evaluate the toxic effects of the inclusion complex Finasteride β-cyclodextrin (β-CD) and Testosterone β-cyclodextrin (β-CD), through chronic exposure to sublethal concentrations under the embryos and adults of the zebrafish (Danio rerio). The work was aimed to evaluate the toxic effects of finasteride and testosterone free and complexed into cyclodextrin on the physiological and behavioral parameters of embryos and adults of the *Danio rerio* fish. The embryos were exposed for periods of 96 hours post-fertilization for the evaluation of mortality, teratogenic effects, and heart rate. The groups were divided into control, free finasteride (FIN) and testosterone (T) at the concentrations of 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L, and finasteride (FIN-β-CD) and testosterone (T-β-CD) complexed into β-CD at concentrations of 280 and 4480 ng/L. Adults were exposed for a period of 60 days to evaluate behavioral changes and daily survival related to exposure to free finasteride (FIN) and testosterone (T) complexed into β-CD at concentrations 280 and 4480 ng/L. The embryos did not exhibit mortality at concentrations of 280 - 4480 ng/L in the all groups exposed. Similarly, it was not observed teratogenic effects in the groups exposed to different concentrations. In the heart frequencies of the embryos, significant variations were observed ($p < 0.05$) when compared to the control group. Adults exposed to free and

complexed finasteride and testosterone had significant alterations ($p < 0.05$) in the most active behaviors such as slow swim and fast swim, as well as in agonistic behaviors. It can be concluded that in tests with embryos, FIN and FIN-β-CD as well T and T- β-CD, may interfere in the heart rate and the exposure of adults to the same hormones promoted a reduction in their locomotor capacity and can increase in the aggressiveness of the animals.

KEY WORDS: Anti-androgenic, fishes, hormones, Inclusion complex, Animal behavior, Endocrine disruptor, Toxic effects.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da α- β-γ-ciclodextrina e suas dimensões. Fonte: Adaptado de Loftsson e Brewster, 2004.....20

Figura 2. Complexos de inclusão Finasterida-Ciclodextrinas. Fonte Adaptado de Mady e Aly, 2017.. 21

Figura 3. Morfologia externa do *Danio rerio.* Fonte. Próprio autor. 23

Figura 4. Ciclo de vida do zebrafish (Danio rerio) do embrião ao animal adulto. Fonte: Próprio autor. 24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.a. Propriedades físico-químicas da Finasterida (Fonte: Pubchem) 17

Tabela 2.a. Propriedades físico-químicas da Testosterona (Fonte: Pubchem) 19

Tabela 1. Efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* expostos à Finasterida e testosterona livres em teste de toxicidade aguda. 39

Tabela 2. Efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* expostos à Finasterida e testosterona complexadas a ciclodextrina.. 40

Tabela 3. Eventos comportamentais exibidos por *D. rerio*. O negrito enfatiza os efeitos significativos. Nadar lento, Nadar rápido, Flutuar, Descansar, Natação inclinada, Capturar, Forragear, Afugentar, Fuga, Saltar, Movimento circulatório, Perseguir, Ataque, Afastar e Respiração aérea, agrupados nas Categorias: Locomoção, Alimentação, Social e Resposta ao Estresse. 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF - Afastar

AG - Afugentar

AS - Saltar

AT - Ataque

CA - Capturar

CD - Ciclodextrina

CG - Coagulação

DCA - Deformação da cauda

DCL - Deformação da coluna

DE – Descansar

DEs - Disruptores endócrinos

EM - Emergir

EP - Edema de pericárdio

ESV - Edema de saco vitelínico

FIN- Finasterida

FL - Flutuar

FO - Forragear

FU - Fuga

HPF - Hora pós-fertilização

MC - Movimento circulatório

NI - Nadar inclinado

NL - Nadar lento

NR - Nadar rápido

PE - Perseguir

POA - Processo oxidativo avançado

RA - Respiração aérea

SE – Sistema endócrino

T - Testosterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1. Disruptores endócrinos 16
2.2. Finasterida 16
2.3. Testosterona 18
2.4. Ciclodextrinas e o sistema de formação de Complexos de inclusão 20
2.4.1. Estrutura das ciclodextrinas 20
2.4.2.Histórico 21
2.4.3.Toxicidade das ciclodextrinas 22
2.4.4 Caracterização dos complexos de inclusão 22
2.5. Complexos de inclusão Finasterida-β-Ciclodextrinas e Testosterona-β Ciclodextrina 23
2.6. Peixes como modelo animal 24
2.6.1. *Danio rerio*: Caracteristicas e importância. 24
3. OBJETIVOS ..... **Erro! Indicador não definido.**
3.1 Geral 27
3.2 Específicos 27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 28
Capitulo 1 ..... **Erro! Indicador não definido.**

1. INTRODUÇÃO

Dentre os produtos químicos que são classificados como poluentes ambientais, os Disruptores Endócrinos (DE) são "substâncias exógenas que alteram as funções do sistema endócrino e, consequentemente, causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto ou nas suas populações (SOEIRO; FERREIRA, 2014). Podem ser encontrados no ambiente em concentrações de µg/L e ng/L (BILA; DEZOTTI, 2007; LOPES et al., 2010), o que seria suficiente para causar interferência ao sistema endócrino dos animais (JEAN-CLAUDE; AMIARD-TRIQUET, 2015). A exposição a um DE pode alterar uma ou mais vias hormonais e essas interrupções na homeostase pode resultar em interferência na reprodução, crescimento, sobrevivência e alterações comportamentais (COOKE et al., 2013). Tais efeitos não apenas estariam presentes em organismos aquáticos como também nos organismos terrestres em qualquer nível de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (COSTA e OLIVI, 2008) resultando em um risco considerável, em particular aos organismos mais sensíveis.

Algumas substâncias de uso constante devem receber atenção especial como os antibióticos e hormônios (SANTOS et al., 2004). Neste caso, os hormônios esteroides são um grupo de compostos que controlam diversas funções do sistema endócrino. Os principais e mais potentes andrógenos são a testosterona e a 5α-di-hi drotestosterona (DHT), metabolito mediado pela 5α-redutase, principal responsável pela alopécia androgenética (calvície). As isoenzimas de ação antiandrogênica finasterida (Proscar e Propecia) e dutasteride (Avodart) foram desenvolvidas inicialmente para o tratamento da hiperplasia prostática benigna, contudo, tornou-se uma das principais opções no combate a alopécia androgenética (calvície), ficando entre os 200 fármacos mais vendidas nos EUA em 2010 (VERISPAN VONA, 2010), devido os efeitos inibidores da 5α-redutase que reduz em até 70% os níveis do DHT. Devido ao grande uso da testosterona e da finasterida, já podem ser encontradas no ambiente devido ao descarte inadequado. A finasterida mesmo possuindo baixa solubilidade em água pode ser encontrada em concentrações de 280 ng/L (FICK et al., 2010), já a testosterona em concentrações de 320 ng/L (SHORE; GUREVICH; SHEMESH, 1993).

Devido à baixa solubilidade aquosa desses andrógenos e anti-androgênicos, o que reduz sua biodisponibilidade e consequentemente seu efeito farmacológico, a complexação com ciclodextrinas vem sendo proposta (LEE; LOUX-TURNER;

OLIVEIRA, 2015). Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por monômetros de glicose unidos por ligações glicosídicas α-1,4 apresentando estrutura em forma de cone com interior hidrofóbico e exterior hidrofílico que possui a capacidade de formar complexos de inclusão com fármacos hidrofóbicos aumentando a sua biodisponibilidade (LOFTSSON, 2015). Diante de um possível uso de complexos de inclusão com fármacos pela indústria farmacêutica e consequente descarte destes novos produtos no ambiente. Se faz necessário novos estudos toxicológicos para a avaliar o impacto que esta substância tem sobre populações de animais aquáticos.

Os estudos toxicológicos em animais aquáticos são uma importante ferramenta para a compreensão do efeito desses compostos na biota aquática, para tal, os peixes constituem uma das classes de vertebrados mais utilizada em pesquisas, por serem excelentes organismos-modelos. No Brasil a espécie mais utilizada é o *zebrafish* (*Danio rerio*) (COSTA E OLIVI, 2008), uma vez que possuem semelhanças fisiológicas com os seres humanos a níveis de biologia molecular e embriológica das células germinativas (DAMMSKI; MÜLLER, 2011).

Neste aspecto, o nosso estudo se o apresenta com um importante objetivo de analisar os efeitos tóxicos dos complexos de inclusão finasterida-ciclodextrina e testosterona-ciclodextrina bem como as formas livres destes hormônios nos parâmetros biológicos do *zebrafish* (*Danio rerio*) em duas fazes do desenvolvimento (embrião e adultos) como modelo *in vivo*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DISRUPTORES ENDOCRINOS

O sistema endócrino (SE) é essencial para a saúde de humanos e animais, é responsável pelo desenvolvimento do organismo e manutenção das funções dos diferentes órgãos e tecidos (JEAN-CLAUDE; AMIARD-TRIQUET, 2015). O SE usa hormônios para controlar respostas que não precisam ser imediatas, mas devem ser duradouras, como crescimento, taxa metabólica, desenvolvimento sexual e reprodução (LU; ZHU; ZHU, 2017), diante disto, os possíveis efeitos adversos nesse sistema podem não ser observados de imediato, podendo ter impactos a longo prazo não só sobre a nossa saúde como também a saúde dos animais. Dentre os poluentes químicos que podem causar os efeitos adversos ao SE, destacam-se os disruptores endócrinos (DE) que são substancias antropogênicas presentes em quantidades mínimas no meio ambiente (BILA; DEZOTTI, 2007; YANG et al., 2015).

Os DEs são produtos químicos que interferem nos sistemas hormonais e produzem efeitos adversos no desenvolvimento, reprodução, neurológicos e imunológicos em mamíferos (YANG et al., 2015) além da desregulação hormonal nos peixes no ambiente aquático (AHMADIVAND et al., 2015). Originalmente os efeitos da exposição aos DE foram associados à ocorrência de distúrbios em várias espécies selvagens.

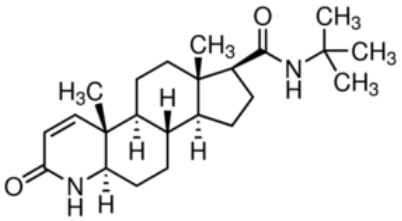
Nas últimas décadas, tem se intensificado estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos focados nos efeitos dos DE em animais (BITTENCOURT et. al., 2018; SOARES et. al., 2016) e humanos (LU; ZHU; ZHU, 2017). O que de fato é justificável, uma vez que nos últimos 50 anos tem-se verificado um aumento significativo da incidência de doenças associadas a distúrbios endócrinos, como distúrbios reprodutivos, de obesidade, diabetes e cânceres (PONTELLI; NUNES; OLIVEIRA, 2016). Além disso, a rápida velocidade deste aumento não explicada por mecanismos genéticos nem por diagnósticos levantou a possibilidade de existirem fatores ambientais intervenientes (SOEIRO; FERREIRA, 2014).

2.2. FINASTERIDA

A finasterida (Tabela 1) é um hormônio de ação anti-androgênica (MILÃO; WEID, 2009). É um sólido cristalino branco com o peso molecular de 372,55 g/mol, tem fórmula molecular $C_{23}H_{36}N_2O_2$ e apresenta-se como, N-(2-metil-2-propil)-3-oxo-4-aza-5α-androst-1-eno-17B carboxamida (ASBAHR et al., 2009). Sendo o primeiro

inibidor de 5α-redutase (5α-R) a ser aprovado clinicamente para uso em homens no tratamento da hiperplasia benigna da próstata (HBP) em 1992 e para o tratamento da alopecia androgenética em 1997 (FINN et al., 2006). As aplicações clínicas da finasterida tem como base sua capacidade de prevenir a conversão de testosterona para di-hidrotrestosterona (DHT).

Tabela 1.a. Propriedades físico-químicas da Finasterida (Fonte: Pubchem, 2017)

Finasterida - Estrutura química	
	
Fórmula molecular	$C_{23} H_{36} O_2$
Peso molecular	372,55 g / mol
Ponto de fusão	260,35 ° C
Solubilidade em água	0,043 mg/mL (25 ° C)

A finasterida (Propecia ou Proscar) tem como mecanismo de ação a inibição da 5α-R tipo 1 e 2, entretanto com maior afinidade pelo tipo 2 (FINN et al., 2006), enzima responsável pela conversão da testosterona (T) em di-hidrotrestosterona (DHT). Os altos níveis de DHT principalmente em homens adultos é o principal responsável pela alopecia androgenética (REBORA, 2004). Funcionando como um azasteróide, a finasterida quando administrada por via oral, diminui os níveis plasmáticos de di-hidrotestosterona em 60 a 70% (CAROLINA; ASBAHR, 2008), consequentemente sua ação reduz os níveis de DHT no couro cabeludo.

No entanto, por se tratar de um hormônio, a finasterida uma vez no meio ambiente pode desenvolver ações de disruptores endócrinos, um dos mais fortes poluentes da biota aquática. Isto seria suficiente para causar diversos efeitos aos organismos aquáticos como, ações androgênicas em peixes fêmeas, tais como o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos (GHISELLI E JARDIM, 2007), feminização dos peixes machos (VYMAZAL et al., 2015) ou alterações comportamentais (SANTOS et al., 2016). Além do mais, por ser uma substância anti-androgênica, estudos mostram que a finasterida não só afeta os níveis reduzidos de 5α-R da testosterona, como também de outros metabólitos e precursores, o que

sugere que este medicamento tenha uma consequência ampla nos níveis de esteroides neuroativos dos pacientes (MELCANGI et al., 2017).

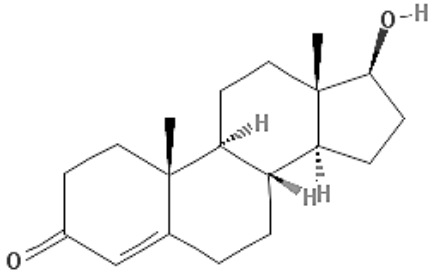
De acordo com Finn et al. (2006) através de sua capacidade de inibir a formação de esteroides neuroativos, a finasterida pode alterar as funções e o comportamento do cérebro, interferindo em uma série de funções fisiológicas. Tais como, a ação sobre receptores visuais modulando sua sensibilidade e afetando comportamentos reprodutivos associada à visão durante a estação de acasalamento (SHAO et al., 2014). Segundo Lee et al. (2015) a exposição á finasterida propõe que a 5α-R pode estar envolvida na biossíntese de esteroides e na sinalização de andrógenos, via DHT, em peixe.

É válido ressaltar que estas informações são uma parte da realidade, sendo o número real possivelmente bem maior, já que alguns dos efeitos podem se confundir com sintomas de outros fatores. Uma vez que, os resíduos hormonais produzidos pelo uso de medicamentos têm sua entrada diária no meio ambiente, que mesmo em baixas concentrações podem ser perigosos para a biota aquática.

2.3. TESTOSTERONA

A testosterona (Tabela 2) é um hormônio andrógeno, principal responsável pelo desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas (HOLSCHBACK, 2017). É sintetizado a partir do colesterol por uma sequência enzimática dentro células de Leydig, localizadas nos testículos. Sendo sua produção modulada pelo hormônio luteinizante (LH) (AHMED et al., 2016). A testosterona pode ser convertida em metabolitos biologicamente ativos em determinados tecidos (SANTOS, 2013), como a di-hidrotestosterona (DHT) convertida pela 5α-R, que se liga com maior afinidade aos receptores androgênicos da testosterona, ativando a expressão gênica de forma mais eficiente (PUBCHEM, 2017), porém, podendo causar efeitos agonistas indesejáveis.

Tabela 2.a. Propriedades físico-químicas da Testosterona (Fonte: Pubchem, 2017)

Testosterona – Estrutura química	
	
Fórmula molecular	$C_{19}H_{28}O_2$
Peso molecular	288.431 g/mol
Ponto de fusão	155,0 ° C
Solubilidade em água	Insolúvel

A testosterona e seus derivados são utilizados nos mais diversos casos, como no tratamento de síndromes da menopausa, próstata e de mama, aplicação na piscicultura, para reversão sexual de peixes, reposição hormonal em mulheres (PRAVEENA et al., 2016; FARI e RUSSO, 2017). Logo, o seu o uso indiscriminado resulta na produção de resíduos acima dos limites biologicamente aceitáveis no meio ambiente (CARVALHO, 2014). Por não sofre fotólise nem tão pouco possuir em sua estrutura grupos funcionais que se hidrolisam em condições ambientais (PUBCHEM, 2014), a maior preocupação em relação ao uso inadequado destes hormônios refere-se a sua bioacumulação no meio ambiente e organismos aquáticos.

Não é novidade que a exposição de animais aquáticos a hormônios é um problema, estudos como o de Guillette em 1995 mostraram que espécies de jovens jacarés que viveram em lagos poluídos da florida apresentaram anomalias no sistema reprodutivo como diminuição do pênis. Sendo a causa dessas anomalias a presença de substâncias anti-andrógenicas. De acordo com Ghiselli e Jardim (2007), exposição a andrógenos pode provocar em peixes fêmeas o desenvolvimento de testículos, produzindo assim indivíduos que crescem e funcionam reprodutivamente como machos. Além disso, estudos concluíram que a concentração de hormônios nos rios provocou efeitos adversos na espécie de peixe *Pimephales promelas* diminuindo a mobilidade dos espermatozoides (MURACK et al., 2011).

2.4. CICLODEXTRINAS E O SISTEMA DE FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO.

2.4.1 ESTRUTURA DAS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) (figura 1) são oligossacarídeos cíclicos cristalinos, constituídos por um número variável de unidades de glicose, unidas por ligações α-(1,4), suas formas naturais são as α-, β- e γ-ciclodextrinas (UEKAMA; HIRAYAMA; IRIE, 1998). Também conhecidas como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger (DEL VALLE, 2004), as CDs são formadas durante a ação das enzimas glicosiltransferases (CGTases) sobre o amido (VEIGA; PECORELLI; RIBEIRO, 2006). São moléculas, homogêneas em forma de anel com uma cavidade interna hidrofóbica de dimensões médias (1,5 nm x 0,7 nm x 0,8 nm) e uma superfície hidrofílica, devido a presença de OH (FETT, 1999). A estrutura espacial cônica (figura 3) e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes oligossacarídeos cíclicos propriedades físico-químicas únicas, sendo capazes de solubilizar-se em meio aquoso e ao mesmo tempo encapsular no interior da sua cavidade moléculas hidrofóbicas (CADENA et al., 2009; DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007).

A solubilidade das CDs (α-, β- e γ-) está diretamente relacionada com a temperatura, além disso apresentam solubilidade em água de forma distinta, com α-CD e γ-CD relativamente altas apresentando 14,5g e 23,2g por 100mL respectivamente, enquanto a β-CD é de apenas 1,85g por 100 mL a 25ºC (DEL VALLE, 2004), sendo em alguns casos, inferior à da molécula hóspede (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). Além das CDs naturais, os derivados semissintéticos ou CDs modificadas surgiram como promissores para a formação de complexos de inclusão na tentativa de melhorar ou alterar suas estruturas adequando a vários setores (VENTURINI et al., 2008). Atualmente, existem centenas desses derivados, mas apenas alguns são de interesse farmacêutico, entre eles os com maior capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; GUEDES et al., 2008).

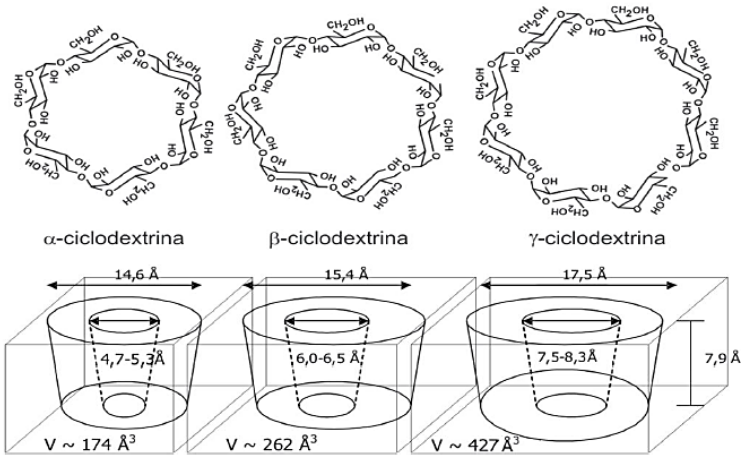


Figura 1. Estrutura de α-, β- e γ-ciclodextrina e suas dimensões. Fonte: Adaptado de Loftsson e Brewster, 2004.

2.4.2 HISTÓRICO

As ciclodextrinas (CDs) foram descobertas há aproximadamente 127 anos, quando as primeiras CDs foram isoladas por A. Viliers em 1891 (FETT, 1999; GUEDES et al., 2008). Entretanto, foi Franz Schardinger que entre 1903 e 1911, realizou uma abordagem mais ampla, nesta incluía seu preparo, isolamento e caracterização das CDs (LOFTSSON e DUCHÊNE, 2007). Entre os anos de 1935 a 1955 as estruturas químicas, propriedades físico-químicas e habilidades de formar complexos de inclusão das ciclodextrinas foram confirmadas por Freudenberg, French e Cramer (UEKAMA et. al, 1998).

No decorrer do século estudos mais aprofundados envolvendo as CDs foram sendo desenvolvidos por freudenberg, que propôs o mecanismo de formação das CDs por ação enzimática da glicosiltransferase (CGtase) sobre o amido (CLAKER et. al, 1988). A partir da década de 60 o domínio do método de preparação de CDs em escalas laboratoriais mais as informações sobre sua estrutura e propriedades físico-químicas, levaram a estudos mais detalhados (VENTURINI et al., 2008). Em 1970, através de um grande esforço tecnológico com um forte investimento em pesquisa, além da desmitificação da toxicidade das CDs viabilizaram sua produção e consequentemente aplicação farmacêutica (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007; VENTURINI et al., 2008).

2.4.3. TOXICIDADE DAS CICLODEXTRINAS

De acordo com Davis e Brewster (2004) as ciclodextrinas são praticamente atóxicas e sua toxicidade vai depender de sua via de administração. Estudos de toxicidade com CD demonstraram que a administração por via oral apresentam uma toxicidade muito baixa (DEL VALLE, 2004), isso se dá devido à baixa absorção do trato gastrointestinal, uma vez que ciclodextrinas naturais além de produzidas pelo amido, são metabolizadas ao nível do cólon e do ceco pelas bactérias da flora intestinal (SALTÃO; VEIGA, 2001).

De acordo com Veiga, Pecorelli e Ribeiro (2006) a toxicidade das CDs poderá torna-se um problema se a via de administração dos complexos não for a adequada para um determinado tipo de CD. Entretanto, como já mencionado, desde a década de 70 estudos toxicológicos com ciclodextrinas demonstraram sua baixa toxicidade (VENTURINI et al., 2008), atualmente foram listadas pela Food and Drug Administration (FDA) que reconhece as ciclodextrinas como seguras de acordo com a GRAS (ATUL et al.,2017).

2.4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO

Os complexos de inclusão (figura 2) é a capacidade de encapsulação de moléculas. É formado quando uma molécula convidada é hospedada dentro de uma molécula hospedeira (CD) através de suas cavidades hidrofílica e hidrofóbica (DEL VALLE, 2004; CELEBIOGLU et al., 2016).

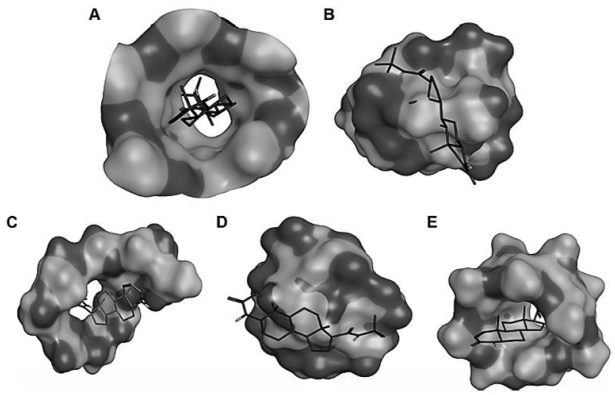


Figura 2. Complexos de inclusão Finasterida (centrol) em Ciclodextrinas. (Fonte: Adaptado de Mady e Aly 2017)

As CDs possuem a propriedade de formar os complexos de inclusão com uma grande variedade de moléculas. Porém, em virtude de cada CD apresentar capacidade própria para formar os complexos de inclusão com moléculas específicas, a formação dos complexos é determinada pelas características das moléculas hospedes adequadas as características hidrofóbicas e ao tamanho da CD (OLIVEIRA; SANTOS; COELHO, 2009). Em virtude disto, uma das condições mínimas para a formação dos complexos de inclusão é a compatibilidade geométrica entre as moléculas hóspede e hospedeira (SALTÃO; VEIGA, 2001).

De acordo com Blanco Garcia (2016), os complexos são utilizados principalmente em produtos farmacêuticos. Tendo como objetivo melhorar as características farmacológicas das substâncias, como estabilidade, biodisponibilidade e diminuindo a volatilidade, aumentando assim suas propriedades sem diminuir seu potencial (LOFTSSON, 2015). Atualmente há um número considerável de medicamentos que possuem em suas estruturas, complexos de inclusão com diferentes tipos de CDs (DA CUNHA FILHO; SÁ-BARRETO, 2007). O que faz dos complexos de inclusão um dos meios de pesquisas mais estudados na indústria farmacêutica, aumentando o número de publicações relativas a CDs sistematicamente nos últimos anos.

2.5. COMPLEXOS DE INCLUSÃO FINASTERIDA-β-CICLODEXTRINA E TESTOSTERONA-β-CICLODEXTRINA.

A finasterida por ser um hormônio, apresenta pouca solubilidade em água, boa permeabilidade estando na classe II do Sistema de classificação biofarmacêutica (SCB) (MADY; ALY, 2017) e uma ótima solubilidade em solventes orgânicos polares, como etanol, metanol e clorofórmio. Tem uma biodisponibilidade média de 63% (MADY; ALY, 2017) e solubilidade em meio aquoso à temperatura ambiente na ordem de 0,043 mg/mL (LOFTSSON, 2006). Sua propriedade hidrofóbica reduz sua biodisponibilidade, o que pode ser resolvida através da formação complexos de inclusão finasterida-β-ciclodextrinas (LEE; LOUX-TURNER; OLIVEIRA, 2015; MADY; ALY, 2017).

De acordo com Mady e Aly (2017) o complexo de inclusão com β-CD proporciona maior eficiência de complexação e melhorar a solubilidade da finasterida e, portanto, aumenta a sua biodisponibilidade, o mesmo acontecendo com os parâmetros farmacocinéticos, com uma maior taxa de absorção quando comparado

com o fármaco sozinho. Entretanto, de acordo com Lee et al. (2015) a finasterida apresentou riscos a populações de peixes e até mesmo morte com uma exposição de 5000 µg/L, muito acima do previsto. Porém pouco se sabe sobre sua forma complexada, visto que fármacos complexados a ciclodextrinas podem desenvolver algumas propriedades desfavoráveis.

Diante disto, é preciso determinar ensaios biológicos para entendermos os efeitos desses complexos de inclusão envolvendo a finasterida- β-CD. Uma vez que, estudos em animais fornecem evidências de um papel fundamental do 5α-R na fisiologia erétil (TRAISH, 2014) além das vias de sinalização dos mamíferos se comportarem de forma semelhante em peixes (VARELA; FIGUERAS; NOVOA, 2017).

2.6 PEIXES COMO MODELO ANIMAL

2.6.1 *Danio rerio*: CARACTERÍSTICAS E IMPORTÂNCIA

O *Brachydanio rerio* (Figura 3) ou simplesmente *Danio rerio* é um peixe teleósteo de ordem ciprinifórme, pertencente à família dos cyprinidae (SCHNEIDER et al., 2009). É um peixe tropical de água doce, nativo do sul da Ásia e originário das partes baixas dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal (DAMMSKI; MÜLLER, 2011). Descrito por Hamilton Buchanan em 1822, é conhecido popularmente no Brasil como peixe zebra, são animais ovíparos de hábitos alimentares onívoros e apresenta uma grande adaptabilidade, podendo sobreviver em diferentes condições ambientais (SILVA et al., 2010).

Figura 3. Morfologia externa do *Danio rerio* (Fonte: Próprio autor).

O *D. rerio* tem como a característica mais marcante o seu padrão de listras pretas e brancas ao longo do corpo e das nadadeiras anal e caudal (DAMMSKI; MÜLLER, 2011) que trazem uma breve semelhança das listras de uma zebra. Possuem corpos alongados e delgados, na forma fusiforme, além de uma cabeça curta que corresponde de 10 a 15% do tamanho total do corpo. O Seu ciclo de vida pode se estender até mil dias (DAMMSKI; MÜLLER, 2011), embora em condições ideias de cativeiro, isso pode ser prolongado para mais de cinco anos (SPENCE, et al. 2007). O zebrafish durante seu desenvolvimento passa pelos estágios larval, juvenil e adultos, quando apresentam um comprimento de 3 a 4 cm (SCHNEIDER et al., 2009) em aproximadamente 90 dias (Figura 4).

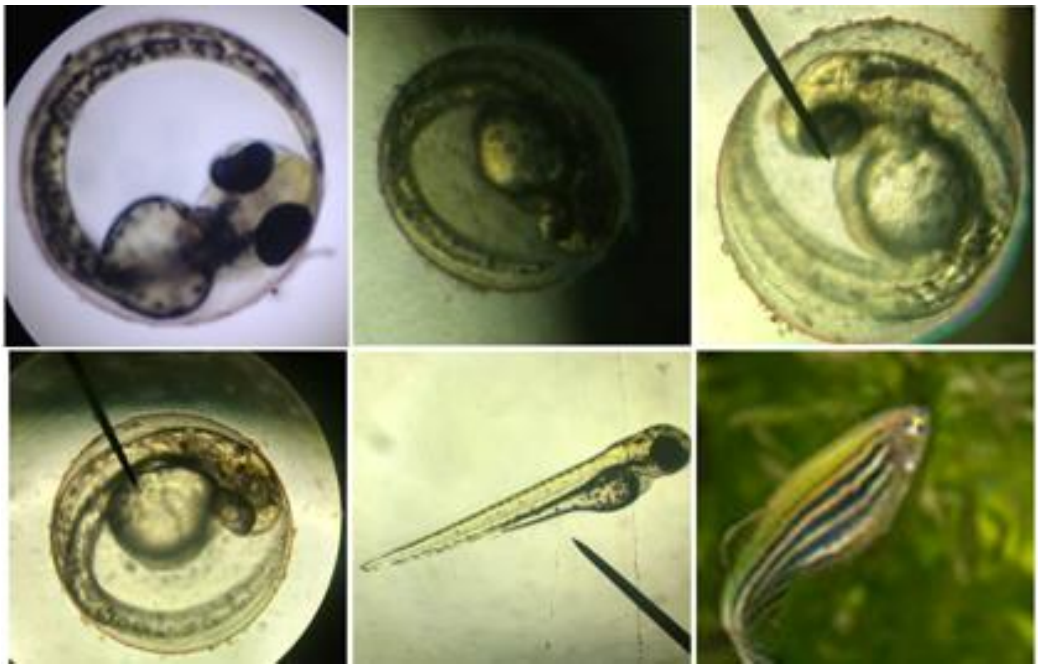


Figura 4. Ciclo de vida do zebrafish (*Danio rerio*) do embrião ao animal adulto. Fonte: Próprio autor.

De acordo com Sant'anna (2009), o zebrafish foi introduzido como modelo em pesquisas genéticas em 1981, pelo pesquisador George Streisinger. Por possuir características ideias para serem usadas em pesquisas relacionadas à humanos, tornou-se rapidamente um popular modelo animal (KALUEFF, 2015). Uma dessas características é sua semelhança fisiológica com mamíferos em virtude de seu genoma possuir um alto grau de similaridade com o genoma dos camundongos e humanos (BARBAZUK et al., 2000; BRIGGS, 2002). De acordo com Howe (2013) o genoma humano apresenta 70% de similaridade e com do *Danio rerio.* Outras

características que colaboram para sua utilização no campo laboratorial é sua facilidade de manipulação genética, sensibilidade a fatores farmacológicos, comportamento robusto, baixo custo (KALUEFF et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2009), seu manejo, facilidade na reprodução e manutenção, além dos métodos de criação já bem estabelecidos (WESTERFIELD, 1994). Segundo Kalueff (2013), é o peixe que fornece o maior número de informações a nível de desenvolvimento, cardiotoxicidade e neurotoxicidade.

Testes de toxicidade são ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas (COSTA e OLIVI, 2008), que podem ser realizados em culturas de células (*in vitro*) ou com organismos vivos (*in vivo*) como peixes, ratos e até seres humanos (PASCHOALINO et al, 2010). Entretanto, os principais animais utilizados nos testes toxicológicos são os peixes, sendo o *Danio rerio* a espécie mais utilizada atualmente (LANTZ-MCPEAK et al., 2015). Uma vez que, apresenta-se como organismo teste de fácil adaptação em laboratório, reprodução contínua e um número de ovos suficiente para os testes toxicológicos propostos (TRAMUJAS et al., 2006). No geral os testes feitos com peixes são concluídos em um período de tempo mais curto quando comparado aos mamíferos (ELLIS et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas à ciclodextrinas sobre os parâmetros biológicos de *zebrafish* (*Danio rerio*).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação de complexos de inclusão finasterida–ciclodextrina e testosterona-ciclodextrina;
- Realizar ensaios toxicológicos em peixes sob exposição à finasterida e testosterona livres e complexadas a ciclodextrina, como também aos medicamentos de uso comercial;
- Realizar testes de toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio*;
- Estudar o efeito crônico da finasterida sob os parâmetros zootécnicos de peixes adultos de *Danio rerio*;
- Estudar como a finasterida e testosterona livres e complexadas pode afetar o comportamento dos animais.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIVAND, S. et al. Effects of (Anti) Androgenic Endocrine Disruptors (DEHP and Butachlor) on Immunoglobulin M (IgM) and leukocytes counts of male rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 94, n. 6, p. 695–700, 2015.

ASBAHR, A. C. C. et al. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HPCD and polymers: Preparation and characterization. Bioorganic and Medicinal Chemistry, v. 17, n. 7, p. 2718–2723, 2009.

BARBAZUK, W. B. et al. The synthenic relationship of the zebrafish and human genomes. Genome Research, v. 10, p. 1351–1358, 2000.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. Quimica Nova, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 59, n. 7, p. 645–666, 2007.

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, v. 282, n. 1, p. R3–R9, 2002.

CADENA, P. G. et al. Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein-??-cyclodextrin inclusion complex. Lipids, v. 44, n. 11, p. 1063–1070, 2009.

CAROLINA, A. N. A.; ASBAHR, C. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BINÁRIOS E TERNÁRIOS Curitiba. 2008.

CELEBIOGLU, A. et al. Polymer-free nanofibers from vanillin/cyclodextrin inclusion complexes: high thermal stability, enhanced solubility and antioxidant property. *Food and Function,* 2016.

COOKE, P.S. et al. Haschek and Rousseaux's Handbook of toxicologic Pathology, Endocrine Disruptors, 3 Ed. Tuskegee, USA, p.1123-1154, 2013.

COSTA, C. R.;OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e Metodos

de avaliação.*Quimica Nova*, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

DA CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R. Zebrafish - Manual de criação em biotério. Zebrafish, p. 107, 2011.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. Process Biochemistry, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

ELLIS, L. D. et al. Use of the zebrafish larvae as a model to study cigarette smoke condensate toxicity. PLoS ONE, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.

FARO, L.; RUSSO, J. A. R.; Testosterona, desejo sexual e conflito de interesse: periódicos biomédicos como espaços privilegiados de expansão do mercado de medicamentos. Horizontes Antropológicos. Ano 23, n. 47, p. 61-92, jan. / abr. 2017.

FETT, R. B. macerans (6, 23),. n. 46, p. 21–32, 1999.

FICK, J. et al. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 58, n. 3, p. 516–523, 2010.

FINN, D. A. et al. A New Look at the 5 á -Reductase Inhibitor Finasteride. v. 12, n. 1, p. 53–76, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no meio ambiente. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GUEDES, F. DE L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve drugs' bioavailability. Rev. Bras. Farm., v. 89, n. 3, p. 220–225, 2008.

HOLSCHBACH, M.A.; HANDA, R.J.; androgen action and stress. Ii endocrine systems and mechanisms in stress control, p.227-235, 2017.

JEAN-CLAUDE, A.; AMIARD-TRIQUET, C. Ecotoxicological risk of endocrine disruptors. Aquatic ecotoxicology, chap. 15, p. 355–382, 2015.

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. Zebrafish, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. Journal of Applied Toxicology, v. 35, n. 3, p. 261–272, 2015.

LEE, M. R.; LOUX-TURNER, J. R.; OLIVEIRA, K. Evaluation of the 5α-reductase inhibitor finasteride on reproduction and gonadal development in medaka, Oryzias latipes. General and Comparative Endocrinology, v. 216, p. 64–76, 2015.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics, v. 329, n. 1–2, p. 1–11, 2007.

LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal - São Paulo. Quimica Nova, v. 33, n. 3, p. 639–643, 2010.

LU, X.; ZHU, Y.; ZHU, T. Endocrine System. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

MADY, F. M.; ALY, U. F. Experimental, molecular docking investigations and bioavailability study on the inclusion complexes of finasteride and cyclodextrins. Drug Design, Development and Therapy, v. 11, p. 1681–1692, 2017.

MELCANGI, R. C. et al. Neuroactive steroid levels and psychiatric and andrological features in post-finasteride patients. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, v. 171, p. 229–235, 2017.

MILÃO; WEID. A utilização da Finasterida no Tratamento da Alopécia Androgenética. 2009.

MURACK, P. J.; PARRISH, J.; BARRY, T. P. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (Pimephales promelas). Aquatic Toxicology, v. 104, n. 1–2, p. 121–125, 2011.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. Revista da Faculdade de Ciências da Saude, v. 6, p. 70–

83, 2009.

PASCHOALINO, M. P. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F.; Os nano materiais e a questão ambiental. Química Nova, Vol. 33, p. 421-430, 2010.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. DE. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? Ciência & Saúde Coletiva, v. 21, n. 3, p. 753–766, 2016.

PRAHALADA, S. et al. Effects of finasteride, a type 2 5-alpha reductase inhibitor, on fetal development in the rhesus monkey (Macaca mulatta). Teratology, v. 55, n. 2, p. 119–131, 1997.

PRAVEENA, S. M. et al. Occurrence of selected estrogenic compounds and estrogenic activity in surface water and sediment of Langat River (Malaysia). *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 188, n. 7, 2016.

PUBCHEM. Finasteride. 2005. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/57363#section=Top>. Acesso em: 26 fev. 2018.

RAFAELA LEÃO SOARES, P. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, Colossoma macropomum. Chemosphere, v. 161, p. 412–421, 2016.

REBORA, A. Pathogenesis of androgenetic alopecia. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 50, n. 5, p. 777–779, 2004.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2001.

SANTOS, B. D. et al. Efeitos de hormônios esteroides de contraceptivos orais combinados sobre os parâmetros comportamentais de *Betta splendens* (Regan, 1909). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 68, n.2 p. 387-396, 2016.

SANTOS, M. R. DOS. Efeito do treinamento físico isolado ou associado à reposição de testosterona em pacientes com insuficiência cardíaca. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Programa de Cardiolog. p. 1–59, 2013.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementation of a New Experimental Animal Model - Zebrafish. Revista HCPA, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009.

SEKI, M. et al. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental toxicology and chemistry / SETAC, v. 23, n. 3, p. 774–781, 2004.

SHAO, Y. T. et al. Androgens Increase Iws Opsin Expression and Red Sensitivity in Male Three-Spined Sticklebacks. *PLoS ONE 9(6)*. v. 9, p. 1-10, 2014.

SHERJE, A. P.; DRAVYAKAR, B. R.; KADAM, D.; JADHAV, M. Cyclodextrin-based nanosponges: A critical review. Carbohydrate Polymers, V. 173, p.37–49, 2017.

SHORE, L. S.; GUREVICH, M.; SHEMESH, M. Estrogen as an environmenal pollutant. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 51, p. 361–366, 1993.

SILVA, B. M.; RAVANELI, M. A. C.; PASCHOALATO, ROSA, C. F. P. TOXICIDADE AGUDA DOS HERBICIDAS DIURON E HEXAZINONA À Danio rerio. 2010. v. 20, UFPR, Curitiba, 2010.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. Biological Reviews, v.83, p. 13–34, 2008.

SPIRITA, S. V; AHILA, A. J.; Stages of Embryonic Development of the Zebrafish Danio rerio (Hamilton). n. June, p. 6–11, 2015.

SOEIRO, P.; FERREIRA, M. Disruptores Endócrinos. p. 1–69, 2014.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chem Rev, v. 98, n. 81, p. 2045–2076 ST–Cyclodextrin Drug Carrier Systems, 1998.

TRAISH, A.M.; 5alpha-reductases in human physiology: an unfolding story, Endocr Pract 18(6) 965-975, 2014.

TRAMUJAS, F.F.; FÁVARO, L.F.; PAUKA, L.M.; SILVA DE ASSIS, H.C. Aspectos reprodutivos do peixe-zebra, *danio rerio*, exposto a doses subletais de deltametrina. Archives of Veterinary Science, v. 11, n. 1, p. 48-53, 2006.

VARELA, M.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Modelling viral infections using zebrafish: Innate immune response and antiviral research. Antiviral Research, v. 139, p. 59–68,

2017.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. Quimica Nova, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

VERISPAN VONA. Top 200 Drugs for 2010 by Sales. disponível em: https://www.drugs.com. Acessado: 10-2015

VYMAZAL, J. Occurrence and removal of estrogens, progesterone and testosterone in three constructed wetlands treating municipal sewage in the Czech Republic, *Science of the Total Enviromment*, v. 536, p. 625 – 631, 2015.

YANG, O. et al. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. Journal of cancer prevention, v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015.

Capítulo 1

Artigo que será submetido a Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia (Qualis A2)

Efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas a ciclodextrina na fisiologia e comportamento de embriões e adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*)

[Toxic effects of finasteride and testosterone free and complexed into cyclodextrin in physiology and behavior of embryos and adults of *zebrafish* (*Danio rerio*)]

Resumo

Objetivo-se a avaliação dos efeitos tóxicos da finasterida e testosterona livres e complexadas sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais de embriões e adultos do peixe *Danio rerio*. Os embriões foram expostos por períodos de 96 horas pós-fertilização para a avaliação da mortalidade, efeitos teratogênicos e frequência cardíaca. Os grupos foram divididos em: controle, finasterida (FIN) e testosterona (T) livres nas concentrações de 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L, e finasterida (FIN-β-CD) e testosterona (T-β-CD) complexadas a β-CD nas concentrações de 280 e 4480 ng/L. Os adultos foram expostos por um período de 60 dias para a avaliar alterações comportamentais e sobrevivência diária relacionadas a exposição de finasterida (FIN) e testosterona (T) livres e complexadas (β-CD) nas concentrações 280 e 4480 ng/L. Não foram apresentadas alterações, mortalidades ou efeitos teratogênicos nos embriões nas concentrações de 280 - 4480 ng/L para todos os grupos. Efeitos teratogênicos, de forma semelhante também não foram observados nos grupos nas diferentes concentrações. Nas frequências cardíacas dos embriões, foram constatadas variações significativas ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle em todos os grupos expostos. Os adultos expostos às concentrações de finasterida e testosterona livres e complexadas apresentaram modificações ($p < 0,05$) na frequência de exibição de comportamentos ativos como Nadar lento e Nadar rápido, como também nos comportamentos agonísticos. Pode-se concluir que em testes com os embriões, FIN e FIN-β-CD assim como T e T- β-CD, podem modificar a frequência cardíaca e que a exposição dos adultos aos mesmo hormônios promoveram uma redução na sua capacidade locomotora e um aumento na agressividade dos animais.

Palavras-chave: Anti-androgênico, peixes, hormônios, Complexo de inclusão, Comportamento animal, Disruptor endócrino, Efeitos tóxicos.

Abstract

The work was aimed to evaluate the toxic effects of finasteride and testosterone free and complexed into cyclodextrin on the physiological and behavioral parameters of embryos and adults of the *Danio rerio* fish. The embryos were exposed for periods of 96 hours post-fertilization for the evaluation of mortality, teratogenic effects, and heart rate. The groups were divided into control, free finasteride (FIN) and testosterone (T) at the concentrations of 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L, and finasteride (FIN-β-CD) and testosterone (T-β-CD) complexed into β-CD at concentrations of 280 and 4480 ng/L. Adults were exposed for a period of 60 days to evaluate behavioral changes and daily survival related to exposure to free finasteride (FIN) and testosterone (T) complexed into β-CD at concentrations 280 and 4480 ng/L. The embryos did not exhibit mortality at concentrations of 280 - 4480 ng/L in the all groups exposed. Similarly, it was not observed teratogenic effects in the groups exposed to different concentrations. In the heart frequencies of the embryos, significant variations were observed ($p < 0.05$) when compared to the control group. Adults exposed to free and complexed finasteride and testosterone had significant alterations ($p < 0.05$) in the most active behaviors such as slow swim and fast swim, as well as in agonistic behaviors. It can be concluded that in tests with embryos, FIN and FIN-β-CD as well T and T- β-CD, may interfere in the heart rate and the exposure of adults to the same hormones promoted a reduction in their locomotor capacity and can increase in the aggressiveness of the animals.

Keywords: Anti-androgenic, fishes, hormones, Inclusion complex, Animal behavior, Endocrine disruptor, Toxic effects.

1. Introdução

Dentre os produtos químicos que são classificados como poluentes ambientais, os Disruptores Endócrinos (DE) são substâncias exógenas que alteram as funções do sistema endócrino e, consequentemente, causam efeitos adversos na saúde de um organismo intacto ou nas suas populações (Soeiro; Ferreira, 2014). Podbem ser encontrados no ambiente em concentrações de μg/L e ng/L (Bila e Dezotti, 2007; Lopes *et al*., 2010), o que seria suficiente para causar interferência ao sistema endócrino dos animais (Jean-Claude e Amiard-Triquet, 2015). A exposição a um DE pode alterar uma ou mais vias hormonais e essas interrupções na homeostase pode resultar em interferência na reprodução, crescimento, sobrevivência e alterações comportamentais (Cooke *et al.*, 2013). Tais efeitos não apenas estariam presentes em organismos aquáticos como também nos organismos terrestres em qualquer nível de organização, desde estruturas celulares até indivíduos, populações e comunidades (Costa e Olivi, 2008) resultando em um risco considerável, em particular aos organismos mais sensíveis.

Algumas substâncias de uso constante devem receber atenção especial como os antibióticos e hormônios (Santos *et al*., 2004). Neste caso, os hormônios esteroides são um grupo de compostos que controlam diversas funções do sistema endócrino. Os principais e mais potentes andrógenos são a testosterona e a 5α-di-hidrotestosterona (DHT), metabolito mediado pela 5α-redutase, principal responsável pela alopécia androgenética (calvície). As isoenzimas de ação antiandrogênica finasterida (Proscar e Propecia) e dutasteride (Avodart) foram desenvolvidas inicialmente para o tratamento da hiperplasia prostática benigna, contudo, tornou-se uma das principais opções no combate a alopécia androgenética (calvície), ficando entre os 200 fármacos mais vendidas nos EUA em 2010 (Verispan Vona, 2010), em virtude de seus efeitos inibidores da 5α-redutase que reduz em até 70% os níveis do DHT. Devido ao grande uso da testosterona e da finasterida, ambas já podem ser encontradas no ambiente devido ao descarte inadequado. A finasterida mesmo possuindo baixa solubilidade em água pode ser encontrada em concentrações de 280 ng/L (Fick *et al*., 2010), já a testosterona em concentrações de 320 ng/L (Shore *et al.*, 1993).

Devido à baixa solubilidade aquosa desses andrógenos e anti-androgênicos, o que reduz sua biodisponibilidade e consequentemente seu efeito farmacológico, a complexação com ciclodextrinas vem sendo proposta (Lee *et al.*, 2015). Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por monômetros de glicose unidos por ligações glicosídicas α-1,4 apresentando estrutura em forma de cone com interior hidrofóbico e exterior hidrofílico que possui a capacidade de formar complexos de inclusão com fármacos hidrofóbicos aumentando a sua biodisponibilidade (Loftsson, 2015). Diante de um possível uso de complexos de inclusão com fármacos pela indústria farmacêutica e consequente descarte destes novos produtos no ambiente. Se faz necessário novos estudos toxicológicos para a avaliar o impacto que esta substância tem sobre populações de animais aquáticos.

Os estudos toxicológicos em animais aquáticos são uma importante ferramenta para a compreensão do efeito desses compostos na biota aquática, para tal, os peixes constituem uma das classes de vertebrados mais utilizada em pesquisas, por serem excelentes organismos-modelos. No Brasil a espécie mais utilizada é o *zebrafish* (*Danio rerio*) (Costa e Olivi, 2008), uma vez que possuem semelhanças fisiológicas com os seres humanos a níveis de biologia molecular e embriológica das células germinativas (Dammski e Muller, 2011).

Neste aspecto, o presente trabalho se oferece como um importante ensaio que teve como objetivo analisar os efeitos tóxicos dos complexos de inclusão finasterida-ciclodextrina e testosterona-ciclodextrina bem como as formas livres destes hormônios nos parâmetros

biológicos do *zebrafish* (*Danio rerio*) em duas fazes do desenvolvimento (embrião e adultos) como modelo *in vivo*.

2. Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE. Todos os animais (*Danio rerio*) foram adquiridos em criadouro comercial (Recife Aquarius). Os protocolos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFRPE, Licença 013/2017. No laboratório, os animais foram aclimatados por 15 dias, sendo acondicionados em aquários aerados, com filtro canister JEBO 835, a temperatura ambiente (25 °C), alimentados com ração comercial extrusada (45% de proteína bruta) uma vez ao dia (*ad libitum*). Os aquários utilizados nos experimentos para os embriões foram reservatórios de poliestireno estéreis, com capacidade de 80 mL cada. Foi realizada a manutenção diária da água dos aquários e os resíduos gerados durante o experimento passaram por tratamento por processo oxidativo avançado (POA) em reator utilizando foto-oxidação UV e H_2O_2 antes do descarte. A finasterida (FIN) e a testosterona (T) foram adquiridas na Farmácia Dona da Fórmula (Recife, BRA) e a β-ciclodextrina (β-CD) (Lote 1228922 44606048) foi obtida da SIGMA (St Luiz, USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

Para a formação dos complexos de inclusão Finasterida- β-ciclodextrina e Testosterona-β-ciclodextrina, primeiramente ocorreu a solubilização de 0,02 g dos hormônios em álcool absoluto obtendo uma concentração de 200 mg/L. Depois 1 mL de cada solução foi diluída em 200 mL de água destilada obtendo a concentração nominal de 1 mg/L com evaporação do álcool sendo chamada esta de soluções de trabalho. Ainda, é chamada de finasterida (FIN) e testosterona (T) livres as formas puras dos hormônios. Para a formação dos complexos de inclusão foi utilizada a técnica de co-precipitação (Del Valle, 2004) entre a finasterida e a β-Ciclodextrina (FIN-β-CD) e a testosterona e a β-Ciclodextrina (T-β-CD) em meio aquoso. A solução alcoólica dos hormônios foi diluída em solução aquosa de β-ciclodextrina na proporção de 1:1 em mol mantendo a mesma concentração dos hormônios livres, sendo também está, a solução de trabalho. A soluções foram armazenadas sobre refrigeração (4 °C) e constantemente renovadas para posterior uso.

Para os ensaios toxicológicos com embriões de Danio rerio, animais adultos do sexo masculino/feminino foram separados e alimentados com ração extrusada duas vezes ao dia nos 5 dias que antecederam o acasalamento. Para a reprodução, os animais foram separados em aquários de desova macho/fêmea com proporção 2:1 respectivamente (Westerfield, 2000), com fotoperíodo natural. Os ovos gerados de cada fêmea foram cuidadosamente coletados dentro de

1 hora após a fertilização (hpf) (Seki et al., 2004) e OCDE Nº 236 (2013). Os ovos fertilizados (fase de desenvolvimento da blástula) foram utilizados para formação dos grupos experimentais, os ovos não fertilizados que não sofreram clivagem ou apresentaram irregularidades foram removidos da pesquisa.

Os ovos fecundados foram divididos em 11 grupos (10 animais x 3 repetições por grupo) colocados em reservatório com capacidade de 80 mL, com temperatura controlada de 25 ± 1 °C e pH de 7,5 ± 0,5. O desenvolvimento embrionário e larval de *D. rerio* foi avaliado sob exposição hormonal e conduzido a partir do estágio de embrião até larva por 96 h. As concentrações utilizadas para os grupos experimentais foram: controle (Grupo C) sem adição de hormônio livre ou complexado, Finasterida livre a 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L (Grupo F1 a F5), Testosterona livre a 280, 560, 1120, 2240, 4480 ng/L (Grupo T1 a T5). Para os estudos com os hormônios em sua forma complexada FIN-β-CD e T-β-CD, as concentrações utilizadas foram: 280 e 4480 ng/L para ambos os hormônios. As concentrações foram selecionadas de acordo com as concentrações ambientais encontradas por Fick (2010) e Shore (1993).

Para a análise do desenvolvimento embrionário de *D. rerio*, as fases embrionárias foram identificadas de acordo com Spirita e Ahila (2015). Efeitos teratogênicos como edema de pericárdio (Ep), edema de saco vitelínico (Esv), deformação da coluna (Dcl), deformação da cauda (Dca) e coagulação (Cg), além da frequência cardíaca (Yang *et al*., 2016) e mortalidade foram avaliados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 hpf. De acordo com a metodologia de Spirita e Ahila (2015) foi avaliado o desenvolvimento dos embriões de *D. rerio*. Através da utilização de microscópio BIO2B SSI com lâmpada de LED, os embriões foram fotografados, para identificar possíveis alterações morfológicas (Spirita e Ahila, 2015). A frequência cardíaca dos embriões foi mesurada por contagem manual dos batimentos cardíacos em microscópio óptico (aumento de 40 e 100 vezes).

Os ensaios toxicológicos com os animais adultos foram conduzidos pela divisão em 9 grupos com 10 animais cada, em aquários com 8 L, alimentados com ração extrusada 45% de proteína bruta (ad libitum), com manutenção periódica, com troca de água 3 vezes na semana. Os peixes foram expostos em teste de toxicidade crônica durante 60 dias, o pH e o oxigênio foram aferidos com medidor portátil durante todo o experimento, além dos kits comerciais da marca Alcom Labtest, para nitrito e amônia. Neste experimento foram avaliados os seguintes parâmetros: comportamento e sobrevivência diária.

Para a avaliação do comportamento dos animais, foi utilizado o etograma desenvolvido por Bittencourt (2018) para a coleta dos dados comportamentais do *Danio rerio* adulto. Para a análise comportamental, o método de varredura instantânea (scan sampling) descrito por

Altmann (1974) foi utilizado por 30 minutos intercalando 1 minuto de observação e 1 minuto de intervalo (Soares, *et al.* 2016). Para as análises estatísticas, utilizou-se o software Origin Pro Academic 2015 (Origem Lab. Northampton, MA, EUA). Os dados foram apresentados na forma de média ± desvio padrão. Os resultados foram analisados por one-Way ANOVA. Quando a diferença foi significativa, as médias foram comparadas através do teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Os resultados da exposição química dos embriões a finasterida (FIN) e testosterona (T) livres e complexadas, seguindo as normas da OCDE nº 236 (2013) são mostrados nas Tab. 1 e 2. Nelas são apresentados os resultados da mortalidade, efeitos teratogênicos e frequência cardíaca para cada grupo exposto em razão da hora pós-fertilização (hpf). Durante as análises (24-96 hpf) do desenvolvimento embrionário do *D. rerio*, a mortalidade do grupo controle não excedeu 10%, estando de acordo com a OCDE nº 236 (2013) para validar nosso teste.

No período de 96 hpf de exposição química aos dois hormônios tanto em sua forma livre como na forma complexada, não observamos mortalidade nos animais expostos. Na avaliação dos efeitos teratogênicos sobre os embriões para cada concentração (280 - 4480 ng/L), não foram observados efeitos significativos ($p > 0,05$) em relação ao aparecimento de edemas e deformações quando comparados ao grupo controle. Estes resultados indicam que as concentrações encontradas no ambiente (abaixo de 320 ng/L) não exercem efeito letal e não possuem a capacidade de causar os efeitos teratogênicos propostos neste estudo.

Os efeitos subletais da exposição química aos hormônios em relação a frequência cardíaca também foram avaliados, sendo os resultados apresentados nas Tab. 1 e 2. Durante todo o tempo de exposição a FIN e T, foram observados nas animais diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a frequência cardíaca de forma não dependente da concentração. Os mesmos efeitos foram observados nos animais expostos aos hormônios complexados (FIN-β-CD e T-β-CD).

Os comportamentos exibidos pelos animais adultos são apresentados na Tab. 3. Nos animais expostos as concentrações de finasterida livre (FIN) e complexada (FIN-β-CD) foram observadas modificações ($p < 0,05$) na frequência de eventos na categoria Locomoção. Como podemos observar na Tab. 3, os comportamentos Nadar lento e Nadar rápido, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) de exibição nos grupos expostos à FIN e FIN-β-CD 4480 ng/L. Para a categoria Social, é possível observar que a exposição a FIN e FIN-β-CD reduziram ($p < 0,05$) a frequência de exibição do comportamento Perseguir. Ainda, quando os animais expostos a menor das concentrações de FIN e FIN-β-CD (280 ng/L) houve aumento ($p < 0,05$) na

exibição dos comportamentos de Fuga e Ataque. Isto indica que tanto a forma livre e complexada de FIN, exerceram toxicidade semelhante nos animais, interferindo nos comportamentos mais ativos e agressivos.

Tabela 1. Efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* expostos à Finasterida (FIN) livre e complexada (FIN- β-CD) em teste de toxicidade aguda. O negrito enfatiza os efeitos significativos.

			Finasterida (ng/L)					β-CD-Finasterida (ng/L)	
Tempo	Efeito	Controle	280	560	1120	2240	4480	280	4480
24 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	75,45 ± 5,6	**77,6 ± 7,7***	**61,5 ± 7,8***	**46,6 ± 3,1***	82,8 ± 4,5	**82,4 ± 7,0***	**85,2 ± 4,8***	96,8 ± 17,0
48 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	159,5 ± 10,9	**131,7 ± 10,1***	**130,2 ± 16,0***	**72,6 ± 2,4***	**128,8 ± 13,5***	**131,3 ± 9,2***	**123,1 ± 8,1***	**142,7 ± 7,1***
72 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	181,6 ± 13,9	**166,5 ± 12,8***	**167,0 ± 14,6***	**155,0 ± 7,0***	**172,1 ± 16,5***	186,8 ± 13,7	**171,8 ± 7,6***	184,5 ± 8,8
96 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	228,6 ± 12,8	**215,5 ± 28,5***	**199,0 ± 9,4***	**188,0 ± 5,2***	**195,9 ± 13,4***	**194,1 ± 9,2***	217,7 ± 7,8	224,1 ±13,9

*Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle: Ep- Edema de pericárdio, Esv- Edema de saco vitelínicos, Dcl- Deformação de coluna, Dca- Deformação de cauda, Cg- Coagulação e FC- Frequência cardíaca.

Tabela 2. Efeitos teratogênicos e frequência cardíaca dos embriões de *Danio rerio* expostos à Testosterona (T) livre e complexada (T-β-CD*)* em teste de toxicidade aguda. O negrito enfatiza os efeitos significativos.

			Testosterona (ng/L)					β-CD-Testosterona (ng/L)	
Tempo	Efeito	Controle	280	560	1120	2240	4480	280	4480
24 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	75,45 ± 5,6	59,9 ± 9,3	49,5 ± 6,7	**68,5 ± 3,9***	**119,2 ± 18,0***	**111,0 ± 13,5***	101,9 ± 10,1	100,7 ± 8,0
48 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	159,5 ± 10,9	**149,5 ± 12,5***	**156,7 ± 5,5***	**158,6 ± 6,9***	174,7± 15,6	168,4± 13,6	154 ± 11,3	**141,9 ± 7,3***
72 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	181,6 ± 13,9	185,2± 10,2	172,7 ± 8,3	186,7 ± 10,7	**192,7 ± 16,7***	**196,0 ± 21,6***	185,0 ± 6,8	188,0 ± 12,3
96 hpf	Mortalidade (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ep (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Esv (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dcl (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dca (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cg (%)	0	0		0	0	0	0	0
	FC (bpm/min)	228,6 ± 12,8	**240,8 ± 8,8***	**250,7 ± 14,0***	**203,8 ± 7,4***	225,2 ± 15,3	**253,4 ± 14,4***	226,4 ± 7,6	**239,2 ± 18,4***

*Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle: Ep- Edema de pericárdio, Esv- Edema de saco vitelín0icos, Dcl- Deformação de coluna, Dca- Deformação de cauda, Cg- Coagulação e FC- Frequência cardíaca.

Para os animais expostos à testosterona livre (T) e complexada (T-β-CD), na categoria Locomoção, podemos observar (Tab. 3.) que os animais expostos à concentração de 280 ng/L aumentaram ($p < 0,05$) a exibição do comportamento Nadar lento e reduziram ($p < 0,05$) a exibição do comportamento Nadar rápido. Já nos animais expostos à 4480 ng/L foi observado um aumento ($p < 0,05$) na frequência de exibição do comportamento Descansar. Isto indica uma relação da redução dos comportamentos ativos com o aumento da concentração tanto na forma livre quanto complexada de T. Na categoria Alimentação, foi visualizado que os animais expostos à T se mostraram mais ativos na procura por alimentos do que os expostos T-β-CD. Na categoria Social, podemos observar que as concentrações de T e T-β-CD interferiram de forma significativa ($p < 0,05$) nos comportamentos sociais. Os grupos apresentaram redução do comportamento Perseguir nos animais expostos às duas concentrações de T e aumento do comportamento Ataque nas duas concentrações de T-β-CD.

Para os grupos expostos à β-ciclodextrina (β-CD), podemos observar na categoria Locomoção que os animais aumentaram ($p < 0,05$) a exibição do comportamento Nadar lento e reduziram ($p < 0,05$) a exibição do comportamento Nadar rápido. Já na categoria Social, foi observado uma redução da frequência dos comportamentos Perseguir, Fuga e Ataque, o que mostra menos agressividade nos animais expostos.

234 **Tabela 3.** Eventos comportamentais exibidos por *D. rerio*. O negrito enfatiza os efeitos significativos. Nadar lento, Nadar rápido, Flutuar, Descansar, Natação inclinada, Capturar, Forragear,
235 Afugentar, Fuga, Saltar, Movimento circulatório, Perseguir, Ataque, Afastar e Respiração aérea, agrupados nas Categorias: Locomoção, Alimentação, Social e Resposta ao Estresse.

	Finasterida					Testosterona				Ciclodextrina
Comportamentos	Controle	FIN-280 (ng/L)	FIN-4480 (ng/L)	FIN-β-CD-280 (ng/L)	FIN-β-CD-4480 (ng/L)	T-280 (ng/L)	T-4480 (ng/L)	T-β-CD-280 (ng/L)	T-β-CD-4480 (ng/L)	β-CD
Nadar Lento	55,3 ± 19,3	47,1 ± 14,4	**23,7 ± 6,4***	53,7 ± 12,3	62,9 ± 15,2	**70,8 ± 5,2***	66,7 ± 12,4	61,7 ± 11,3	55,5 ± 8,7	**79, 6 ± 7,5***
Nadar Rápido	23,9 ± 17,3	21,6 ± 8,5	16,8 ± 5,2	15,2 ± 6,2	**10,3 ± 4,1***	**12,3 ± 5,4***	16,6 ± 8,0	**4,1 ± 2,6***	**7,5 ± 3,7***	**9,3 ± 7,7***
Flutuar	6,3 ± 12,1	0,8 ± 0,8	0,72 ± 1,3	11,1 ± 8,5	15,2 ± 12,9	1,2 ± 2,5	1,8 ± 1,1	14,6 ± 10,1	11,3 ± 12,3	1,57 ± 2,1
Descansar	0,31 ± 1,1	**1,4 ± 1,5***	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,4	2,26 ± 2,3	0,5 ± 1,4	**4,8 ± 5,5 ***	4,1 ± 2,03	**8,87 ± 8,13***	0,0 ± 0,0
Saltar	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Natação Inclinada	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Movimento Circulatório	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Capturar	2,3 ± 2,6	**0,46 ± 0,32***	0,94 ± 0,9	1,44 ± 0,9	1,28 ± 1,0	1,8 ± 1,14	0,9 ± 1,07	1,34 ± 0,67	2,93 ± 1,74	4,1 ± 1,7
Forragear	0,92 ± 1,03	3,28 ± 4,19	3,58 ± 2,58	**2,97 ± 2,0***	1,02 ± 2,38	**6,6 ± 7,09***	**5,5 ± 3,64***	4,61 ± 6,2	1,74 ± 2,86	1,4 ± 4,5
Afugentar	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,05 ± 0,18	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Perseguir	4,2 ± 2,6	**1,23 ± 1,15***	**0,63 ± 0,88***	**0,97 ± 1,1***	**0,10 ± 0,25***	**1,3 ± 2,03***	**0,56 ± 0,9***	**0,0 ± 0,0***	2,87 ± 2,88	**1,5 ± 1,2***
Fuga	4,67 ± 2,67	**11,9 ± 4,4***	2,47 ± 1,73	6,67 ± 2,85	3,17 ± 1,72	3,49 ± 2,97	**1,74 ± 1,9***	4,5 ± 3,4	4,32 ± 2,4	**1,5 ± 1,2***
Ataque	2,05 ± 1,7	**12,2 ± 4,7***	2,60 ± 1,85	**6,30 ± 3,1***	3,38 ± 1,73	2,5 ± 1,91	1,9 ± 2,05	**5,0 ± 3,7***	**4,9 ± 2,73***	1,0 ± 1,4
Afastar	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	**0,4 ± 0,6***	0,0 ± 0,0	**0,5 ± 0,4***	0,36 ± 0,8	0,2 ± 0,42	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,25	0,0 ± 0,0
Respiração Aérea	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

4. Discussão

Para este estudo, as concentrações de hormônios utilizadas podem ser consideradas como ambientalmente relevantes, uma vez que os hormônios FIN e T podem ser encontrados em concentrações de 280 ng/L (Fick *et al.*, 2010) e 320 ng/L (Shore *et al.*, 1993) no meio ambiente. Adicionalmente, estas concentrações ambientais não exerceram efeito letal nos embriões. Ainda, mesmo com concentrações mais altas, 16 vezes as ambientais (4480 ng/L), os hormônios não atuaram de forma significativa na mortalidade dos embriões da espécie *Danio rerio.* Estes dados estão de acordo com o estudo Lee et al. (2015)**,** que expôs embriões de *Danio rerio* a concentrações de 50 a 5000 mg/L de FIN, e constatou mortalidade nas concentrações mais altas. O mesmo foi observado por Rivero-Wendt *et al*., (2016), que através de estudos com embriões de *Danio rerio* a uma concentração de até 11 mg/L de T, observou morte nas maiores dosagens. Como pode ser observado, os autores usaram concentrações, de pelo menos, 1000.000x superiores as encontradas no ambiente, o que poderia justificar os nossos achados em relação a mortalidade.

Durante o teste de toxicidade aguda em relação aos efeitos subletais como o desenvolvimento embrionário de *Danio rerio,* em todos os grupos expostos a FIN e T assim como FIN- β-CD e T- β-CD, não foi observado efeitos teratogênicos como edema de pericárdio (Ep), edema de saco vitelínico (Esv), deformação da coluna (Dcl), deformação da cauda (Dca) e coagulação (Cg). O que indica que tanto as formas livres como nas complexadas a β-CD, as concentrações previstas no meio ambiente (280 e 320 ng/L) não possuem capacidade de causarem estes efeitos teratogênicos aos embriões. Tais resultados corroboram com o estudo de Lee *et al*. (2015) que através de testes feitos com finasterida na espécie *Oryzias latipes,* as anormalidades no seu desenvolvimento embrionário se manifestaram em concentração de 5000 mg/L, o que é muito acima das encontradas ambientalmente.

Já em relação a frequência cardíaca, os animais expostos aos hormônios tanto em sua forma livre como complexada, apresentaram variações significativas ($p < 0,05$), não dependente da concentração. Tais variações são mencionadas na literatura, porém pouco se sabe sobre os mecanismos que envolvem as disfunções cardiovasculares (Barjhoux *et al.*, 2012). Os receptores de andrógenos distribuem-se amplamente nos tecidos vasculares (Gebara *et al.* 2002), ao que tudo indica, sua presença no sistema cardiovascular pode estar relacionada com as variações da frequência cardíaca observadas. Uma vez que

esteroides anabolizantes, substâncias sintéticas similares a testosterona, parecem atuar de maneira direta sobre o coração (Rocha *et al.* 2007).

Nos testes de toxicidade crônica, os resultados indicaram que nos animais expostos as concentrações de finasterida livre (FIN) e complexada (FIN-β-CD) apresentaram alterações quanto ao comportamento natatório, reduzindo seus comportamentos mais ativos e alterando seus comportamentos sociais, aumentando a frequência de exibição dos comportamentos Fuga e Ataque. Assim como os andrógenos podem atuar como neuroreguladores, promovendo distúrbios comportamentais em animais (Wood, 2006), a finasterida através de seus efeitos inibitórios sobre a 5α- redutase, inibe a conversão da progesterona em alopregnanolona (Rahimi-Ardabili *et al.* 2006) que tem ação antidepressiva, e consequentemente diminui seus níveis no cérebro (Nin, 2006). Logo, a finasterida possuindo capacidade depressiva nos homens (Schmutz, 2018), justificaria nossos resultados.

Para os animais expostos à testosterona livre (T) e complexada (T-β-CD), podemos observar na categoria Locomoção, uma relação da redução dos comportamentos ativos e aumento dos inativos, com o aumento da concentração tanto na forma livre quanto complexada de T. De acordo com Rocha (2007), apesar dos esteroides exibirem possíveis melhoras no desempenho físico, doses excessivas podem trazer diversas alterações deletérias, principalmente àquelas relacionadas ao sistema cardiovascular, como insuficiência cardíaca, fibrilação ventricular, tromboses, dentre outras. Na categoria social, os animais apresentaram aumentos significativos nos comportamentos Ataque e Fuga, nas concentrações de T e T-β-CD que podem ser justificados por Munro e Pitcher (1985) que em experimento realizados com peixes da espécie *Aequidens pulcher*, observaram que a testosterona na concentração de 500 µg/L aumentou significativamente a frequência dos comportamentos agonísticos. Entretanto, esse resultado diverge do observado no comportamento Perseguir do nosso experimento, onde ocorreu redução de sua frequência. De acordo com Ferreira (2016), há uma grande divergência na literatura referente à regulação endócrina do comportamento agonístico em peixes, com autores (Maruska, 2015) sugerindo que os níveis plasmáticos de andrógenos não estão correlacionados com o contexto agressivo.

Para os grupos expostos à β-ciclodextrina (β-CD), foi observado diferenças significativas nos comportamentos natatórios e agonísticos. De acordo com Brewster e Loftsson (2007), as CDs apresentam baixa toxicidade, mas devido ao fato de alterarem as propriedades físico-químicas das moléculas complexadas, as CDs podem alterar também

a sua toxicidade. Isto pode justificar os resultados observados no nosso trabalho, pois foram visualizadas diferenças significativas na exibição dos comportamentos ($p < 0,05$) entre os grupos livres e complexados.

5. Conclusões

Diante dos resultados obtidos é possível afirmar que a exposição as concentrações ambientais tanto de FIN e T como FIN-β-CD e T- β-CD, não são capazes de causar a mortalidade e efeitos teratogênicos nos peixes. Ainda, os resultados demonstraram que a T e T- β-CD assim como FIN e FIN-β-CD, podem interferir nos batimentos cardíacos dos embriões como também no comportamento dos adultos da espécie, reduzindo sua capacidade locomotora e aumentando a agressividade dos animais. Em virtude disso, tanto de FIN e T livres e complexadas se apresentam como disruptores endócrinos. Pelos resultados obtidos não podemos indicar diferenças de toxicidade entre as formas livres e complexadas dos hormônios.

6. Referências Bibliográficas

ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods. *Behavior*, v.48, p.227-267, 1974.

AHMADIVAND, S. et al. Effects of (Anti) Androgenic Endocrine Disruptors (DEHP and Butachlor) on Immunoglobulin M (IgM) and leukocytes counts of male rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, n. 6, p. 695–700, 2015.

ASBAHR, A. C. C. et al. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HPCD and polymers: Preparation and characterization. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 2718–2723, 2009.

BARBAZUK, W. B. et al. The synthenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, p. 1351–1358, 2000.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: Efeitos e conseqüências. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BRIGGS, J. P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology.

American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, v. 282, n. 1, p. R3–R9, 2002.

CADENA, P. G. et al. Simple determination of deoxycholic and ursodeoxycholic acids by phenolphthalein-cyclodextrin inclusion complex. **Lipids**, v. 44, n. 11, p. 1063–1070, 2009.

CAROLINA, A. N. A.; ASBAHR, C. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS BINÁRIOS E TERNÁRIOS Curitiba Curitiba. 2008.

COOKE, P.S. et al. Haschek and Rousseaux's Handbook of toxicologic Pathology, Endocrine Disruptors, 3 Ed. Tuskegee, USA, p.1123-1154, 2013.

COSTA, C. R.;OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e Metodos de avaliação.*Quimica Nova*, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.

DA CUNHA FILHO, M. S. S.; SÁ-BARRETO, L. C. L. Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 1–9, 2007.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R. Zebrafish - Manual de criação em biotério. **Zebrafish**, p. 107, 2011.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1033–1046, 2004.

ELLIS, L. D. et al. Use of the zebrafish larvae as a model to study cigarette smoke condensate toxicity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–21, 2014.

FETT, R. B. macerans (6, 23),. n. 46, p. 21–32, 1999.

FICK, J. et al. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 3, p. 516–523, 2010.

FINN, D. A. et al. A New Look at the 5 á -Reductase Inhibitor Finasteride. v. 12, n. 1, p. 53–76, 2006.

GUEDES, F. DE L. et al. Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos Cyclodextrins: as a technological adjuvant to improve drugs' bioavailability. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 3, p. 220–225, 2008.

JEAN-CLAUDE, A.; AMIARD-TRIQUET, C. Ecotoxicological risk of endocrine disruptors. Aquatic ecotoxicology, chap. 15, p. 355–382, 2015.

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 3, p. 261–272, 2015.

LEE, M. R.; LOUX-TURNER, J. R.; OLIVEIRA, K. Evaluation of the 5α-reductase inhibitor finasteride on reproduction and gonadal development in medaka, Oryzias latipes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 216, p. 64–76, 2015.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1–2, p. 1–11, 2007.

LOPES, L. G. et al. Estrogênios em águas naturais e tratadas da região de jaboticabal - São Paulo. **Quimica Nova**, v. 33, n. 3, p. 639–643, 2010.

LU, X.; ZHU, Y.; ZHU, T. **Endocrine System**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

MADY, F. M.; ALY, U. F. Experimental, molecular docking investigations and bioavailability study on the inclusion complexes of finasteride and cyclodextrins. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 11, p. 1681–1692, 2017.

MELCANGI, R. C. et al. Neuroactive steroid levels and psychiatric and andrological features in post-finasteride patients. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 171, p. 229–235, 2017.

MERK. Finasterida. 2013. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=1677512015&pIdAnexo=2479290>. Acesso em: 21 fev. 2018.

MILÃO; WEID. A utilização da Finasterida no Tratamento da Alopécia Androgenética. 2009.

MUNRO A.D.; PITCHER T.J. **Hormones and Behavior.** United Kingdom: Gwynedd, 1985. 19 v.

MURACK, P. J.; PARRISH, J.; BARRY, T. P. Effects of progesterone on sperm motility in fathead minnow (Pimephales promelas). **Aquatic Toxicology**, v. 104, n. 1–2, p. 121–125, 2011.

NIN, Maurício Schüler. **O Papel das Subunidades α-4 e γ-2 do Receptor GABA A no Hipocampo de Ratos no Efeito Antidepressivo da Alopregnanolona.** 2006.

OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals. Section 2: effects on biotic systems test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test**. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. 2013.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saude**, v. 6, p. 70–83, 2009.

SPIRITA, S. V; AHILA, A. J.; Stages of Embryonic Development of the Zebrafish Danio rerio (Hamilton). n. June, p. 6–11, 2015.

PONTELLI, R. C. N.; NUNES, A. A.; OLIVEIRA, S. V. W. B. DE. Impacto na saúde humana de disruptores endócrinos presentes em corpos hídricos: existe associação com a obesidade? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 3, p. 753–766, 2016.

PRAHALADA, S. et al. Effects of finasteride, a type 2 5-alpha reductase inhibitor, on fetal development in the rhesus monkey (Macaca mulatta). **Teratology**, v. 55, n. 2, p. 119–131, 1997.

RAFAELA LEÃO SOARES, P. et al. Acute and chronic toxicity of the benzoylurea pesticide, lufenuron, in the fish, Colossoma macropomum. **Chemosphere**, v. 161, p. 412–421, 2016.

RAHIMI-ARDABILI, Babak et al. **Finasteride induced depression: a prospective study,** v. 6, n. 7, 2006.

REBORA, A. Pathogenesis of androgenetic alopecia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 50, n. 5, p. 777–779, 2004.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2001.

SCHNEIDER, A. C. R. et al. Implementation of a New Experimental Animal Model - Zebrafish. **Revista HCPA**, v. 29, n. 2, p. 100–103, 2009.

SEKI, M. et al. Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 23, n. 3, p. 774–781, 2004.

SHORE, L. S.; GUREVICH, M.; SHEMESH, M. Estrogen as an environmenal pollutant. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 51, p. 361–366, 1993.

SOEIRO, P.; FERREIRA, M. Disruptores Endócrinos. p. 1–69, 2014.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. **Chem Rev**, v. 98, n. 81, p. 2045–2076 ST–Cyclodextrin Drug Carrier Systems, 1998.

VARELA, M.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Modelling viral infections using zebrafish: Innate immune response and antiviral research. **Antiviral Research**, v. 139, p. 59–68,

2017.

VENTURINI, C. D. G. et al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Quimica Nova**, v. 31, n. 2, p. 360–368, 2008.

YANG, O. et al. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. **Journal of cancer prevention**, v. 20, n. 1, p. 12–24, 2015.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. Um peixe modelo. **Pesquisa Fapesp**, Ed. 209, p.16-21, 2013.

Wood RI. Anabolic steroids: **a fatal attraction**? J Neuroendocrinol. 2006; 18(3): 227-8

5. CONLUSÃO

O presente estudo mostrou que os hormônios FIN e T livre e complexados, não modificaram significativamente os parâmetros biológicos avaliados, como mortalidade e efeitos teratogênicos do *Danio rerio.* Entretanto foi possível observar:

- Os resultados demostraram que a FIN e FIN-β-CD assim como T e T- β-CD, podem interferir nos batimentos cardíacos dos embriões;

- Quanto a avaliação comportamental, os resultados demostraram que a FIN e FIN-β-CD assim como T e T- β-CD podem interferi comportamento dos adultos da espécie, reduzindo sua capacidade locomotora e aumentando a agressividade dos animais.

- Devido ao fato da ciclodextrina pura alterar os comportamentos dos adultos recomendamos que os complexos não sejam tratados como melhoramentos das moléculas livres e sim como novos produtos que devem ser avaliados individualmente em relação a sua toxicidade.

- Através dos resultados obtidos não podemos indicar diferenças de toxicidade entre as formas livres e complexadas dos hormônios;