



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARINA RANGEL FERRO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO MATERNO
COM PARACETAMOL SOBRE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS EM DIFERENTES IDADES DA PROLE
MASCULINA DE RATAS**

Londrina
2019

MARINA RANGEL FERRO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO MATERNO
COM PARACETAMOL SOBRE PARÂMETROS
REPRODUTIVOS EM DIFERENTES IDADES DA PROLE
MASCULINA DE RATAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Daniela Cristina Ceccatto Gerardin

Londrina
2019

MARINA RANGEL FERRO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO MATERNO COM
PARACETAMOL SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS EM
DIFERENTES IDADES DA PROLE MASCULINA DE RATAS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Andressa de Freitas Mendes Dionísio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Por não haver maneira de retribuir, agradeço à minha família pelo suporte emocional e apoio incondicional.

Às minhas professoras e professores, um imenso obrigada. Agradeço a dedicação e a contribuição para a minha formação que certamente não acaba por aqui. À minha orientadora, mais uma vez, obrigada. Obrigada pela oportunidade que me concedeu e por ter me ajudado nos primeiros passos que dei em direção à academia.

Aos meus colegas de laboratório e de departamento, agradeço o companheirismo. Agradeço com absoluta certeza de que nada seria possível sem o auxílio, sacrifício e carinho de vocês.

Ciente de que uma andorinha só não faz verão, meu especial agradecimento ao Jeberson e ao Rodrigo. Vocês se tornaram meus parceiros, confidentes e companheiros de viagens que levarei para a vida.

Como não poderia deixar de ser, agradeço aos animais pelas vidas utilizadas na realização deste trabalho. Espero, se possível, ter honrado-as pela certeza de que não foram vidas em vão.

Agradeço à CAPES e CNPq (306522/2017-9) pelo apoio financeiro.

PEREIRA, Marina Rangel Ferro. **Avaliação dos efeitos do tratamento materno com paracetamol sobre parâmetros reprodutivos em diferentes idades da prole masculina de ratas**. 2019. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O Paracetamol (acetaminofeno) é um medicamento amplamente usado durante os períodos de gestação e lactação no tratamento de dor e febre visto que é considerado seguro para o desenvolvimento dos fetos. Sabe-se que o feto é exposto a esse fármaco, pois este é capaz de atravessar a barreira hematoplacentária, e cerca de 2% da dose administrada na mãe é transferida ao bebê pelo leite materno de mulheres lactantes. Dados epidemiológicos indicam que o tratamento materno com paracetamol durante a gestação aumenta a incidência de criptorquidismo, além de diminuir a distância anogenital e a produção de testosterona, podendo agir como um desregulador endócrino. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento materno com paracetamol durante os períodos gestacionais e gestacionais/lactacionais pode alterar parâmetros reprodutivos e comportamentais na prole masculina de ratas. Ratas Wistar foram diariamente tratadas por meio de gavagem com água e paracetamol 350 mg/kg/dia durante o período de gestação (CTRG e PARG) ou período de gestação/lactação (CTRGL and PARGL). Foram observadas diferenças estatísticas significativa na histomorfometria testicular (aumento do volume e comprimento total dos túbulos seminíferos) e aumento do peso dos testículos no grupo PARG, comparado ao seu grupo de controle. O paracetamol também afetou o comportamento copulatório e aumentou os níveis de testosterona plasmática no DPN 120 (grupos PARG e PARGL). A prostaglandina E₂ é responsável pela masculinização do hipotálamo no período intrauterino de desenvolvimento. Considerando que o paracetamol é um inibidor da produção dessa prostaglandina no sistema nervoso central, sugere-se que esse fármaco possa ter impactado a diferenciação sexual hipotalâmica, alterando o comportamento sexual masculino na vida adulta. Esse processo também é responsável pela produção adequada de hormônios a partir da puberdade. Com isso, sugere-se que o paracetamol tenha prejudicado núcleos hipotalâmicos responsáveis pela produção de hormônios e que, portanto, não tenha ocorrido um mecanismo de feedback adequado produzido pela testosterona na hipófise e hipotálamo, levando às alterações vistas na histomorfometria testicular e aumento da testosterona plasmática.

Palavras chave: Histomorfometria. Comportamento. Prostaglandina. Testosterona

PEREIRA, Marina Rangel Ferro. **Evaluation of the effects of maternal paracetamol treatment on reproductive parameters at different ages of male offspring of rats.** 2019. 52 p. Dissertation (Master's degree in Physiological Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Paracetamol (acetaminophen) is a medication largely used during gestation and lactation periods for the treatment of pain and fever since it is considered safe for the fetuses development. It is known that the fetus can be exposed to this drug due to its ability to cross hematoplacental barrier and approximately 2% of the dose administered to the mother is transferred to the baby by maternal milk. Epidemiologic data indicate that the maternal treatment with paracetamol during gestation increases the incidence of cryptorchidism, and decreases anogenital distance and testosterone production. Therefore, the present study aimed to evaluate if maternal treatment with paracetamol during gestational and gestational/lactational periods can alter reproductive and behavioral parameters in male offspring. Female Wistar rats were daily treated by gavage with water and paracetamol 350 mg/kg/day during gestation (CTRG and PARG) or gestation/lactation period (CTRGL and PARGL). There were significant differences on histomorphometry (increased volume and total length of seminiferous tubules) and it increased the weight of testes in PARG group, compared to its control group. Paracetamol also impaired the copulatory behavior and increased testosterone levels at PND 120 (PARG and PARGL groups). PGE₂ is responsible for the masculinization of the hypothalamus in the intrauterine period and paracetamol acts as an inhibitor in the central nervous system. In this sense, it is suggested that paracetamol might have impaired sexual hypothalamic differentiation during gestational period, altering the copulatory behavior in adulthood. and the feedback mechanism produced by testosterone on the hypothalamus and pituitary. This process is also responsible for the production of hormones on puberty. Therefore, it is suggested that paracetamol might have impaired hypothalamic nuclei and no adequate feedback mechanism was seen on the hypothalamus and pituitary.

Keywords: Histomorphometry. Behavior. Prostaglandina. Testosterone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química do paracetamol	12
Figura 2 - Diagrama esquemático da via da enzima ciclooxigenase.....	13
Figura 3 - Delineamento experimental da prole masculina.....	18
Figura 4 - Representação esquemática da vista superior da arena do teste de incentivo social	20
Figura 5 - Ganho de peso corporal das mães tratadas com paracetamol dos diferentes grupos experimentais	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corpóreo, DAG relativa e descolamento do prepúcio dos diferentes grupos experimentais.....	27
Tabela 2 - Comportamento sexual dos diferentes grupos experimentais no DPN 90.....	29
Tabela 3 - Peso dos órgãos dos diferentes grupos experimentais no DPN 21 e 50.....	30
Tabela 4 - Peso de órgãos dos diferentes grupos experimentais no DPN 120	31
Tabela 5 - Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 21	33
Tabela 6 - Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 50	33
Tabela 7 - Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 120	34
Tabela 8 - Dosagem de testosterona plasmática dos diferentes grupos experimentais nos DPN 21, 50 e 120	36
Tabela 9 - Contagem espermática dos diferentes grupos experimentais no DPN 120.....	38
Tabela 10 - Morfologia e motilidade espermática dos diferentes grupos experimentais no DPN 120	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINE	Anti-inflamatório Não Esteroidal
COX	Ciclo-oxigenase
CTRG	Controle Gestacional
CTRGL	Controle Gestacional/Lactacional
CTTS	Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos
DAG	Distância Anogenital
DG	Dia Gestacional
DL	Dia Lactacional
DOHaD	Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença
DPN	Dia Pós-Natal
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	Food and Drug Administration
OECD/OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico/ Organisation for Economic Cooperation and Development
PDE	Produção Diária de Espermatozóide
APO	Área Pré Óptica
SDT	Síndrome de Disgenesia Testicular
TS	Túbulo Seminífero
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VTTS	Volume Total dos Túbulos Seminíferos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivo específico	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Animais e tratamento.....	16
3.2.	Avaliação da toxicidade materna	17
3.3	Parâmetros analisados na prole masculina	17
3.3.1	Delineamento experimental.....	18
3.3.2	Peso corporal	18
3.3.3	Desenvolvimento físico	19
3.3.4	Avaliação do comportamento sexual (DPN 90).....	19
3.3.4.1	Comportamento copulatório.....	19
3.3.4.2	Teste de motivação sexual.....	20
3.3.5	Coleta de tecidos e órgãos nos DPN 21, 50 e 120.....	21
3.3.6	Parâmetros biométricos e análise histológica dos testículos	22
3.3.7	Quantificação de testosterona plasmática.....	23
3.3.8	Parâmetros espermáticos	23
3.3.8.1	Contagem no ducto deferente e motilidade espermática.....	23
3.3.8.2	Contagem espermática.....	24
3.3.8.3	Morfologia espermática.....	24
3.4.	Análise estatística	25
4	RESULTADOS	26
4.1	Peso corpóreo materno	26
4.2	Peso corpóreo da prole masculina	27
4.3	Comportamento sexual da prole masculina no DPN 90.....	28
4.4	Peso dos órgãos da prole masculina de ratos.....	30
4.5	Parâmetros biométricos testiculares da prole masculina de ratos.....	32

4.6	Dosagem de testosterona plasmática	35
4.7	Parâmetros espermáticos	37
4.7.1	Contagem espermática.....	37
4.7.2	Morfologia e motilidade espermática	39
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS	51
	Anexo 1.....	52

1. INTRODUÇÃO

O paracetamol - ou acetaminofeno - (Figura 1) foi primeiramente introduzido no mercado em 1955 para o tratamento de febre. Porém, passou a ser o fármaco de primeira escolha para o tratamento de dor por longos períodos, uma vez que causava poucos efeitos adversos, como gastrite e úlcera, que podem ser causadas pelos anti-inflamatórios que possuem grande atividade periférica (Jozwiak-Bebenista and Nowak, 2014).

O mecanismo de ação do paracetamol não é bem estabelecido. Portanto, foram criadas três teorias sobre seu modo de ação e acredita-se que este fármaco possa agir por meio de uma ou de mais de uma dessas vias concomitantemente: (1) através da inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX); (2) através de uma possível ativação de fibras descendentes serotoninérgicas, que são fibras inibitórias de dor; (3) agindo como um pró-fármaco (Anderson, 2008). Considerando que o paracetamol, em doses terapêuticas, tem atividade inibitória fraca nas enzimas COX-1 e COX-2, é suposto que o alvo terapêutico deste fármaco seja uma isoforma da COX-1 que atua no sistema nervoso central, estabelecida como COX-3. Essa enzima é responsável pela produção de prostaglandinas, causando sensação de dor e elevação da temperatura corporal (Figura 2) (Botting et al., 2016). A terceira teoria, no entanto, vem sendo explorada recentemente, visto que um dos metabólitos do paracetamol, o ácido graxo n-araquinoilaminofenol (AM404), pode agir como um agonista através de receptores canabinóides na Área Pré-Óptica do hipotálamo (APO), levando à ativação das fibras descendentes serotoninérgicas e à queda da temperatura corpórea (Anderson, 2008).

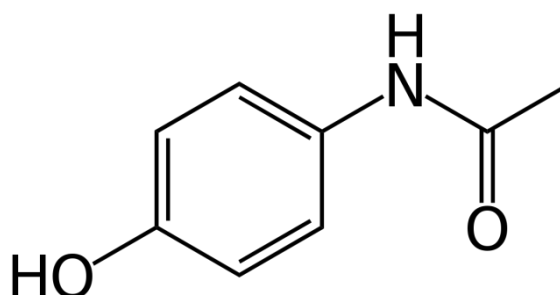
Aproximadamente 90% das mulheres usam medicamentos durante a gravidez sendo o paracetamol a droga analgésica e antipirética mais utilizada em todos os trimestres de gestação e no período de lactação por apresentar baixa indução de reações adversas quando comparado a outros analgésicos (Werler et al., 2005). Grande parte destes medicamentos não foi submetida a testes clínicos randomizados, já que frequentemente as mulheres grávidas são excluídas desses ensaios devido a questões éticas (Lupattelli et al., 2014; Servey and Chang, 2014).

A preocupação quanto à exposição materna à xenobióticos, isto é, compostos químicos estranhos ao organismo humano, tem aumentado, uma vez que estes compostos podem atuar como desreguladores hormonais. Sabe-se que o feto é exposto a esse fármaco, pois é capaz de atravessar a barreira hematoplacentária, e cerca de 2% da dose administrada na mãe é transferida ao bebê pelo leite materno (Notarianni et al., 1987). Apesar do feto e do recém-nascido estarem expostos em suas fases iniciais de desenvolvimento, o paracetamol não está

relacionado com efeitos teratogênicos, sendo considerado seguro para a mãe e para o bebê (Thiele et al., 2013; Werler et al., 2005).

A partir de 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a classificação de fator de risco desenvolvido pela *Food and Drug Administration* (FDA), na qual os fármacos são divididos em cinco categorias (A – E) de acordo com o risco de causar danos ao feto durante a gestação, baseando-se em estudos em humanos ou animais. Na categoria A, os fármacos passam por estudos controlados e conclui-se que não há risco para o feto no primeiro trimestre de gestação e tampouco evidências que haja risco nos outros dois trimestres. Em contrapartida, na categoria E, são feitos estudos controlados em humanos ou animais em que o fármaco leva a anormalidades fetais. O paracetamol encontra-se categoria B de risco na gestação, que segundo a FDA, são aqueles medicamentos cujos estudos realizados em animais não apresentaram risco à prole, porém não foram confirmados em estudos controlados em mulheres grávidas (FDA, 2015).

Figura 1. Estrutura química do paracetamol



Ainda que classificado como categoria B, dados epidemiológicos indicam que o tratamento materno com paracetamol durante a gestação aumenta a incidência de criptorquidismo (uma condição caracterizada pela ausência de um ou ambos os testículos na bolsa escrotal) nos bebês (Kristensen et al., 2012). Isso implica em um ambiente desfavorável para as células germinativas masculinas, podendo afetar a fertilidade em vida adulta pela produção de espermatozoides de má qualidade, além de aumentar a chance de câncer testicular (Berkowitz and Lapinski, 1996). Além disso, a exposição ao paracetamol via placenta está relacionada com uma redução da distância anogenital (DAG) em humanos (Lind et al., 2017), bem como em roedores machos (Kristensen et al., 2011). A DAG é um marcador

importante da atividade androgênica e pode ser usada para avaliar os efeitos de uma liberação de andrógenos desregulada na vida intrauterina (Dean and Sharpe, 2013). O paracetamol também é capaz de diminuir os níveis de testosterona plasmática em ratos e camundongos machos (Kristensen et al., 2012; Van Den Driesche et al., 2015).

Um novo ramo da ciência denominado Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD) relaciona a associação entre a influência de fatores ambientais, como a exposição a desreguladores endócrinos, na vida intrauterina ou nas fases iniciais de desenvolvimento com o surgimento de doenças crônicas ao longo da vida (El-Heis and Godfrey, 2015). A diminuição da produção ou da ação do hormônio testosterona no desenvolvimento embrionário e na primeira infância podem atuar como um fator comum para levar a diversos sintomas na vida adulta, como o câncer testicular e hipospádia (Skakkebaek et al., 2001).

Figura 2. Diagrama esquemático da via da enzima ciclo-oxigenase.

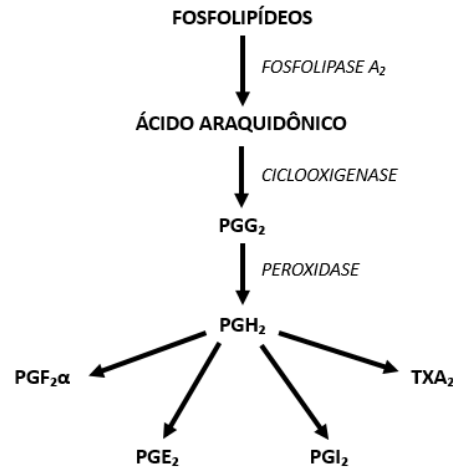


Diagrama esquemático da via da enzima ciclo-oxigenase. PGG₂: Prostaglandina G₂. PGH₂: Prostaglandina H₂. PGF₂α: Prostaglandina F₂α. PGE₂: Prostaglandina E₂. PGI₂: Prostaglandina I₂. TXA₂: Tromboxano A₂.

Os hormônios são de extrema importância no cérebro em desenvolvimento e podem, inclusive, modular as respostas comportamentais na vida adulta (Lenz and McCarthy, 2010). Em condições fisiológicas, a testosterona produzida pelo testículo de roedores no período perinatal é transportada ao sistema nervoso central através do plasma e tem um importante papel na diferenciação sexual hipotalâmica, que assegura que o cérebro do animal vai

condizer com as sinalizações hormonais que este vai receber na vida adulta (De Vries and Simerly, 2002). Uma vez no cérebro, a testosterona é convertida em estradiol pela enzima aromatase (P450) e este estradiol é responsável por masculinizar e defeminizar o hipotálamo masculino no período perinatal (Roselli and Resko, 1993). Não somente, o estradiol age como um indutor da prostaglandina E₂ (PGE₂) no sistema nervoso central, que também é fundamental para o processo de masculinização do hipotálamo (Amateau and McCarthy, 2002).

Tendo em vista a importância da testosterona no período de desenvolvimento do sistema nervoso central e também no sistema reprodutor masculino, esse trabalho justifica-se pela escassez de pesquisas envolvendo a exposição do feto ao paracetamol via placenta e leite materno e seus efeitos na infância, adolescência e vida adulta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se o tratamento materno com paracetamol durante a gestação ou gestação/lactação pode alterar os parâmetros reprodutivos em diferentes idades da prole masculina de ratas, mimetizando a infância, adolescência e vida adulta.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar parâmetros de desenvolvimento: peso corpóreo, DAG e descolamento do prepúcio.
- Avaliar parâmetros físicos: peso de órgãos reprodutivos, fígado, adrenais, rins e hipófise.
- Avaliar parâmetros testiculares: peso do órgão e histomorfometria.
- Avaliar parâmetros hormonais: dosagem da concentração de testosterona plasmática.
- Avaliar parâmetros comportamentais: comportamento sexual.
- Avaliar parâmetros espermáticos: contagem, morfologia, motilidade e concentração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e Tratamento

Ratos Wistar machos e fêmeas (75 dias) da colônia da Universidade Estadual de Londrina (UEL) foram usados como geração parental. Foram mantidos em um ambiente controlado com temperatura a 21 ± 2 °C; 12 horas de ciclo claro /escuro (luzes acesas às 6:00 horas) e tiveram acesso livre a ração regular (Nuvilab™) e água de torneira. Os ratos foram acasalados (2 fêmeas e 1 macho por gaiola) e caso houvesse presença de espermatozoide no estragaço vaginal realizado na manhã seguinte, a prenhez seria positivada e considerado este o Dia Gestacional (DG) 0. As ratas Wistar prenhas foram alocadas individualmente em gaiolas e separadas em quatro grupos experimentais (n = 10 - 14 fêmeas/grupo):

- Grupo Controle Gestacional (CTRG): recebeu água de torneira diariamente, por gavagem, do DG 6 ao DG 21.

- Grupo Paracetamol Gestacional (PARG): recebeu paracetamol 350 mg/kg/dia, por gavagem, diariamente do DG 6 ao DG 21.

- Grupo de Controle Gestacional Lactacional (CTRGL): recebeu água de torneira diariamente, por gavagem, do DG 6 ao Dia Lactacional (DL) 21.

- Grupo Paracetamol Gestacional Lactacional (PARGL): recebeu paracetamol 350 mg/kg/dia, diariamente, por gavagem, do DG 6 ao DL 21.

As ratas prenhas foram tratadas diariamente das 12:00 às 14:00 horas. A dose de 350 mg/kg/dia foi preparada com um comprimido de Tylenol® 750 mg em 2,5 ml de água de torneira. A dose foi escolhida baseada em um estudo que descreve efeitos tardios nas proles de rato expostos ao paracetamol através da placenta e do leite materno (KRISTENSEN et al., 2011). Além disso, o período de tratamento foi escolhido baseado Guideline OECD / OECD (426) – Estudo de Neurotoxicidade de Desenvolvimento, que recomenda o início do tratamento

no período pós-implantação, que representa DG6 em ratos, a visto que substâncias que interferem na produção de prostaglandinas podem comprometer a fase de implantação (Ren-Zhu et al., 1998).

No dia Pós-Natal 1 (DPN 1), filhotes foram contados e pesados. No DPN 4, o número de filhotes por ninhada foi reduzido a dez, mantendo, preferencialmente cinco filhotes machos e cinco fêmeas. Nenhum filhote da mesma ninhada foi usado para o mesmo protocolo e, portanto, cada ninhada representa uma unidade experimental. Os filhotes remanescentes foram usados em outros estudos de nosso grupo de pesquisa.

3.2. Avaliação da toxicidade materna

O peso corporal materno foi medido a cada três dias durante o período de tratamento para determinar a administração do volume assim como sinais de toxicidade, tais como lacrimejamento, piloereção e padrões respiratórios incomuns.

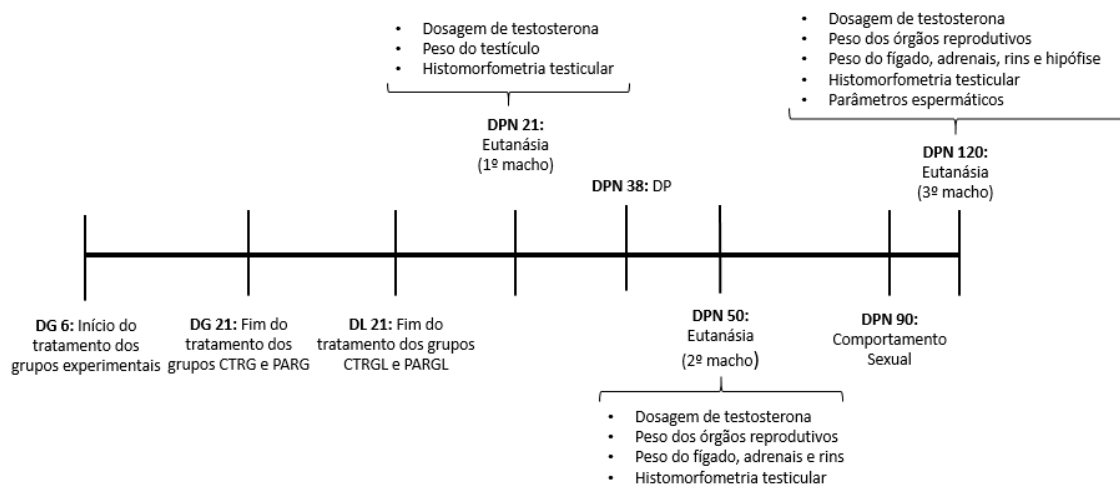
3.3. Parâmetros analisados na prole masculina

Foram utilizados três machos por ninhada para a avaliação de diferentes parâmetros, sendo que cada macho foi eutanasiado em idades diferentes. O primeiro macho de cada ninhada foi eutanasiado no DPN 21, para mimetizar a primeira infância. O segundo macho de cada ninhada foi eutanasiado no DPN 50, para mimetizar a puberdade e o terceiro, na vida adulta, no DPN 120.

3.3.1. Delineamento experimental

Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da UEL (CEUA: 7900.217.82. 80/2017) e estão representados no diagrama abaixo (Figura 3).

Figura 3. Delineamento experimental



Delineamento experimental. DG: Dia Gestacional. CTRG: Controle Gestacional. PARG: Paracetamol Gestacional. DL: Dia Lactacional. CTRGL: Controle Gestacional Lactacional. PARGL: Paracetamol Gestacional Lactacional. DPN: Dia Pós Natal. DAG: Distância Anogenital. DP: Descolamento Prepucial.

3.3.2 Peso corporal

O peso corporal dos filhotes foi medido a cada três dias até o dia da eutanásia (DPN 21, 50 ou 120) e o ganho de peso foi estimado subtraindo o peso no dia da eutanásia do peso no DPN 1.

3.3.3 Desenvolvimento físico

A DAG, distância do ânus ao tubérculo genital, foi obtida através de um paquímetro. A medida foi normalizada através de sua divisão pela raiz cúbica do peso corporal (Gallavan et al., 1999), e foi obtida no DPN 1 e 21.

A partir de DPN 38, a separação prepucial (como indicador do início da maturidade sexual) foi verificada diariamente no terceiro rato (Korenbroet et al., 1977).

3.3.4 Avaliação do comportamento sexual (DPN 90)

No PND 90, todas as avaliações comportamentais foram executadas durante a fase escura do ciclo invertido de claro/escuro, sob luz vermelha. Foi permitido aos animais um período de adaptação de 15 dias no ciclo invertido claro/escuro antes do início das avaliações. As observações foram feitas três horas depois do início de escuridão e foram gravadas por uma câmera de vídeo, ligada ao monitor em uma sala adjacente (Gerardin et al., 2006).

3.3.4.1 Comportamento copulatório

Para a avaliação do comportamento copulatório no DPN 90, um macho foi colocado em uma gaiola de Plexiglas e, após 5 minutos, uma fêmea em estro natural foi introduzida na gaiola. Durante 30 minutos, as latências e números de intromissões e ejaculações foram observados. Se um macho não realizasse comportamento de monta dentro de 10 minutos, a avaliação era interrompida e repetida no dia seguinte. Se um macho falhasse novamente na segunda avaliação, ele era considerado sexualmente inativo.

3.3.4.2 Teste de motivação sexual

Os mesmos animais avaliados para comportamento copulatório foram submetidos ao teste de motivação sexual (Ågmo, 2003). Neste teste, foi utilizada uma arena retangular com 50 x 50 x 100 cm (altura x largura x comprimento) com duas aberturas que se comunicam com duas pequenas arenas de 25 cm² (Figura 3). As pequenas arenas ficam diagonalmente opostas uma à outra e a comunicação com a arena principal é fechada com uma malha de arame. Uma fêmea em estro natural foi colocada em uma das pequenas arenas (zona da fêmea) e um macho sexualmente ativo foi colocado na outra (zona do macho). O piso da arena principal contém duas divisões de 25 cm² (zonas) em frente a cada abertura das arenas pequenas, chamadas de zonas de incentivo da fêmea e do macho, respectivamente. O macho experimental foi colocado no centro da arena principal e observado por 20 minutos. O número de visitas e o tempo total gasto em visitas a cada zona foi quantificado, e um score de preferência foi calculada da seguinte forma: (tempo gasto na zona da fêmea/tempo total gasto em ambas as zonas de incentivo) x 100.

Figura 4. Representação esquemática da vista superior da arena do teste de motivação sexual.

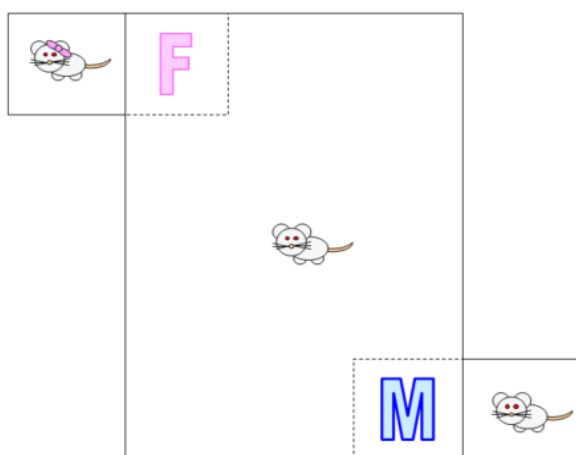


Ilustração: André Demambre Bacchi

Representação esquemática da vista superior da arena do teste de motivação sexual. F e M representam as zonas de incentivo da fêmea e do macho, respectivamente.

3.3.5 Coleta de tecidos e órgãos nos DPN 21, 50 e 120

No DPN 21, um filhote por ninhada foi eutanasiado por decapitação (10 filhotes/grupo) e as amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de testosterona plasmática conforme descrito no item 3.3.7. Depois disso, os testículos foram removidos, seus pesos foram determinados e o testículo direito foi fixado em solução Bouin para análise histomorfométrica conforme descrito no item 3.3.6.

No DPN 50, outro macho da ninhada foi eutanasiado por decapitação (n=10/grupo) e as amostras de sangue também foram coletadas para a quantificação de testosterona plasmática conforme descrito no item 3.3.7. Os órgãos reprodutivos (testículos, epidídimo, próstata, e vesículas seminais), rim, fígado e adrenais foram removidos, e seus pesos foram determinados. O testículo direito foi fixado em solução de Bouin para análise histomorfométrica conforme descrito no item 3.3.6.

No DPN 120, o terceiro macho da ninhada foi eutanasiado (n = 8-14/grupo) por decapitação e as amostras de sangue foram coletadas para a quantificação de testosterona plasmática conforme descrito no item 3.3.7. Os testículos, epidídimo, próstata, vesículas seminais (cheias/vazias), rins, adrenais, ducto deferente, fígado e hipófise foram removidos e pesados. O testículo direito foi fixado em solução de Bouin para análise histomorfométrica conforme descrito no item 3.3.6. O DPN 120 foi escolhido a fim de que o estoque espermático fosse renovado, e, portanto, o canal deferente direito, testículos direitos e epidídimo fossem utilizados para parâmetros espermáticos conforme descrito no item 3.3.8.

3.3.6. Parâmetros biométricos e análise histológica dos testículos

Os testículos direitos foram fixados em solução de Bouin por 24 horas antes de serem armazenados em etanol 70° para análise histomorfológica. Os testículos foram desidratados em concentrações de etanol crescentes, e incluídos em parafina. As peças foram seccionadas a 7 µm separados por 70 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados num microscópio de luz.

O diâmetro tubular médio foi medido usando Motic Images Plus 2.0 software (Motic Inc., Xiamen, China) no microscópio Eclipse E200 (Nikon, Tokyo, Japan) conectado a uma câmera digital Moticom-5 (Motic Inc., Xiamen, China) no aumento de 100×. Quinze secções transversais com perfis redondos ou arredondados de túbulos seminíferos foram escolhidas aleatoriamente por animal.

A composição de dados volumétricos do parênquima testicular foi obtida utilizando-se uma lente com uma grade de contagem de 100 pontos de intersecção colocada na ocular do microscópio óptico. Um total de 10 campos foram escolhidos aleatoriamente por animal no aumento de 400× e as intersecções foram quantificados.

O volume de cada componente do testículo foi determinado como o produto da densidade de volume e o volume do testículo. Devido à densidade do testículo ser quase 1.0 (~1.03– 4), para cálculos morfométricos subsequentes, o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume (França and Godinho, 2003).

O comprimento total dos tubos seminíferos (CTTS) em metros por testículo foi estimado a partir do volume ocupado pelos tubos seminíferos e a medida do diâmetro tubular obtida para cada animal, de acordo com a seguinte fórmula:

$$CTTS = VTTS/\pi R^2$$

V_{TTS} = volume total dos tubos seminíferos; πR^2 = área de corte transversal dos tubos seminíferos (diâmetro tubular = $R/2$) (Attal et al., 1963).

3.3.7 *Quantificação de testosterona plasmática*

Os ratos foram eutanasiados por decapitação (DPN 21, 50 e 120) e amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina, sempre no mesmo horário. Imediatamente após a coleta, amostras de sangue foram centrifugadas (2500 rpm por 20 min a 4°C) e o plasma foi congelado para posterior análise. A testosterona plasmática foi medida por imunoenensaio de quimioluminescência de micropartículas (2nd Generation Architect Testosterone), onde o coeficiente de variação intra-ensaio e a sensibilidade foram 4.6% e 0015 nmol/l, respectivamente.

3.3.8 *Parâmetros espermáticos*

3.3.8.1 *Contagem no ducto deferente e motilidade espermática*

Os espermatozoides do ducto deferente direito foram obtidos e diluídos em 500 μ L de solução GV HEPES pré-aquecida a 37°C (Favareto et al., 2011; Perobelli et al., 2010). Uma alíquota de 10 μ l foi colocada em uma câmara Makler (Irvine) e analisada sob um microscópio de luz (OSM-223287, Olympus) no aumento de 400x. Cem espermatozoides por animal foram avaliados e foram classificados como móveis ou imóveis (Perobelli et al., 2010). A contagem no ducto (milhão/ml) foi avaliada logo após a análise de motilidade espermática. Os espermatozoides foram contados em 10 quadrados aleatórios (0.1 mm x 0.1 mm), em quatro campos diferentes e então a média foi obtida (Seed et al., 1996).

3.3.8.2 *Contagem espermática*

Os testículos esquerdos foram descapsulados e os segmentos da cabeça/corpo e cauda do epidídimo foram separados. Espermátides do testículo resistentes à homogeneização (estágio 19 de espermiogênese) e os espermatozoides no epidídimo da cabeça/corpo e epidídimo da cauda foram avaliados conforme descrito anteriormente em uma câmara de Neubauer (Fernandes et al., 2007; Robb et al., 1978). Para calcular a produção diária de espermatozoides (PDE), o número de espermátides no estágio 19 foi dividido por 6.1, que é o número de dias do ciclo em que estão presentes no epitélio seminífero. O tempo de passagem dos espermatozoides através do epidídimo foi determinado dividindo-se o número de espermatozoides em cada segmento pela PDE (Fernandes et al., 2007; Robb et al., 1978).

3.3.8.3 *Morfologia espermática*

A avaliação da morfologia espermática foi feita de acordo com Fernandes et al. (2007). Os espermatozóides foram retirados do canal deferente esquerdo por lavagem com 1 ml de formol-salina (10%) e esfregaços foram preparados em lâminas histológicas e foram deixadas para secar por 90 min. 200 espermatozóides por animal foram analisados num microscópio óptico (400×ampliação). Anormalidades morfológicas foram classificadas em duas categorias gerais: morfologia da cabeça (sem a curvatura característica ou isolada); e morfologia da cauda (quebrada ou isolada) (Fernandes et al., 2007; Seed et al., 1996).

3.4 Análise estatística

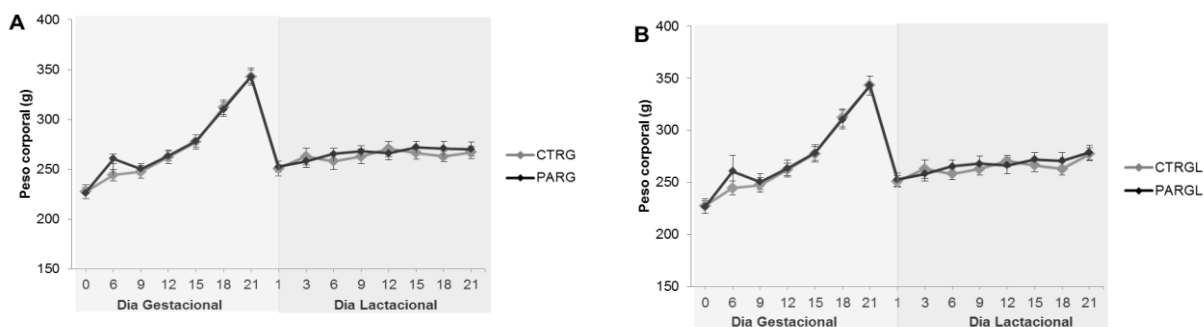
Inicialmente, uma análise exploratória foi realizada para avaliar distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Teste de Levene) de cada variável. Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram transformadas a fim de se obter os critérios para análise paramétrica, com dados sendo apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância foram analisadas por teste- *t* Student. Em contrapartida, para outras variáveis o teste de Mann-Whitney U foi utilizado para a apresentação de dados não paramétricos, apresentados como mediana (1° - 3° quartil). Para análise do peso corporal, foi aplicado o teste RMANOVA e o peso dos órgãos foi analisado por ANCOVA com o peso corpóreo como covariável. Os parâmetros espermáticos foram comparados pelo teste exato de Fisher. A fim de detectar possíveis alterações dependentes de período do tratamento, CTRG foi comparado somente com PARG, enquanto CTRGL foi comparado somente com o grupo PARGL. Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Peso corpóreo materno*

Os tratamentos com paracetamol durante os períodos gestacional ou gestacional/lactacional não influenciaram sobre o ganho de peso corporal das ratas. RMANOVA mostrou que os grupos PARG e PARGL não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos CTRG e CTRGL respectivamente (Figura 5). Assim como, nenhum dos grupos experimentais apresentou sinais visíveis de toxicidade.

Figura 5. Ganho de peso corporal das mães tratadas com paracetamol dos diferentes grupos experimentais.



Ratas tratadas durante os períodos gestacional (A) e gestacional-lactacional (B) (n=10/grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, $p > 0,05$ (RMANOVA). CTRG (Grupo Controle Gestacional): água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350 mg/kg/dia.

4.2. Peso corpóreo da prole masculina

Não houve diferença estatística no peso corporal dos filhotes expostos ao paracetamol (Tabela 1) quando comparado com seus respectivos grupos de controle (RMANOVA, $p>0.05$). Além disso, a Tabela 1 mostra a DAG relativa (DPN 1 e 21) e descolamento do prepúcio comparados por teste-*t* Student e nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos expostos ao paracetamol e seus respectivos grupos controle ($p>0.05$).

Tabela 1. Peso corpóreo, DAG relativa e descolamento do prepúcio dos diferentes grupos experimentais.

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Ganho de peso DPN 21 (g)	38,95 ± 2,41	37,36 ± 1,21	37,88 ± 1,53	39,72 ± 1,87
Ganho de peso DPN 50 (g)	207,71 ± 9,64	217,98 ± 4,33	204,25 ± 7,95	207,77 ± 9,55
Ganho de peso DPN 120 (g)	399,53 ± 8,99	404,20 ± 17,18	417,89 ± 12,28	384,86 ± 10,15
DAG relativa DPN 1 (mm/g^{1/3}) #	1,56 ± 0,03	1,64 ± 0,03	1,57 ± 0,02	1,60 ± 0,03
DAG relativa DPN 21 (mm/g^{1/3}) #	3,36 ± 0,07	3,17 ± 0,08	3,22 ± 0,08	3,36 ± 0,10
Descolamento do Prepúcio (dias) #	48,20 ± 0,76	47,80 ± 0,87	48,40 ± 0,99	49,10 ± 0,81

Dados estão apresentados em média ± EPM. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. $p>0.05$, comparado ao seu respectivo controle pelo teste RMANOVA ou teste-*t* Student independente#. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia. DAG: Distância Anogenital.

4.3. Comportamento sexual da prole masculina no DPN 90

Os resultados de comportamento sexual estão apresentados na Tabela 2. Houve uma redução significativa na latência (em segundos) para a primeira ejaculação [$t(13)=2.28$; $p=0.04$] e um aumento no número de ejaculações nos animais PARG comparado ao CTRG [$t(13)=2.64$; $p=0.021$]. No grupo PARGL, o teste- t Student revelou uma redução significativa na latência para a primeira intromissão pós-ejaculação [$t(14)=2.61$; $p=0.021$] quando comparado ao CTRGL. Não houve diferença no número de animais considerados sexualmente inativos (teste de Fischer, $p>0.05$). Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros analisados no teste de incentivo social (Tabela 2).

Tabela 2. Comportamento sexual dos diferentes grupos experimentais no DPN 90.

Comportamento Copulatório	CTRG	PARG	CTRGL	PARGL
Latência para a primeira intromissão (s)	210,87 ± 61,30 {8/10}	116,78 ± 13,70 {9/10}	156,00 ± 28,73 {9/10}	162,13 ± 24,99 {8/11}
Nº de intromissões até a primeira ejaculação	19,37 ± 2,80 {8/10}	23,11 ± 5,38 {9/10}	#17,00 (13,00-17,00) {9/10}	#18,50 (13,75-33,5) {8/11}
Latencia para a primeira ejaculação (s)	935,26 ± 132,25 {7/10}	558,75 ± 102,46 {8/10}*	630,75 ± 58,88 {8/10}	734,25 ± 120,27 {8/11}
Latencia para a primeira intromissão pós ejaculação (s)	473,50 ± 30,21 {6/10}	454,12 ± 44,95 {8/10}	444,25 ± 21,32 {8/10}	532,13 ± 26,10 {8/11}*
Nº de intromissões pós ejaculação	12,50 ± 2,81 {6/10}	18,63 ± 1,98 {8/10}	16,37 ± 2,13 {8/10}	17,12 ± 1,39 {8/11}
Nº de ejaculações	#2,00 (1,00-2,00) {7/10}	#2,00 (2,00-2,25) {8/10}*	#2,00 (2,00-3,00) {8/10}	#2,00 (1,75-2,00) {8/11}
SIM	CTR [8]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Tempo na zona do macho (s)	287,00 ± 49,81	203,60 ± 17,04	307,30 ± 37,81	217,30 ± 25,44
Tempo na zona da fêmea (s)	558,13 ± 62,16	625,40 ± 37,30	538,40 ± 61,55	634,40 ± 50,30
Nº de visitas na zona do macho	22,38 ± 1,70	21,00 ± 1,20	20,50 ± 1,88	19,60 ± 1,98
Nº de visitas na zona da fêmea	25,63 ± 2,46	28,90 ± 1,83	22,40 ± 2,43	23,30 ± 2,43
Score de Preferência	65,61 ± 6,02	74,92 ± 2,55	62,48 ± 4,95	73,86 ± 3,02

Dados estão apresentados em média ± EPM pelo test-*t* Student independente ou mediana (1° – 3° quartil)[#] (Mann-Whitney), **p*<0.05 com o número de animais que realizaram o comportamento pelo número total de animais no grupo entre chaves. Números em chave representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

4.4. Peso dos órgãos da prole masculina de ratas

A Tabela 3 mostra o peso dos testículos no DPN 21, além dos pesos dos órgãos reprodutivos, rins, adrenais e fígado no DPN 50. A Tabela 4 mostra o peso dos órgãos reprodutivos (testículos, próstata, epidídimos e vesícula seminal cheia), adrenais, fígado, rins e hipófise dos animais no DPN 120. ANCOVA com o peso corpóreo final como covariante foi usada para comparar o peso absoluto dos órgãos. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos e seus respectivos controles no DPN 21 e 50 ($p>0.05$). Em contrapartida, a Tabela 4 mostra um aumento no peso dos testículos em animais PARG quando comparado ao CTRG no DPN 120. Não houve diferença nos pesos dos rins, adrenais e fígados entre grupos quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($p>0.05$).

Tabela 3. Peso dos órgãos dos diferentes grupos experimentais no DPN 21 e 50.

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Peso absoluto DPN 21				
Testículos (g)	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,03
Peso absoluto DPN 50				
Testículos (g)	2,15 ± 0,06	2,10 ± 0,05	2,01 ± 0,11	2,05 ± 0,07
Epidídimos (g)	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Prostata (g)	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Vesícula seminal cheia (g)	0,23 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,03
Rins (g)	1,80 ± 0,08	1,88 ± 0,09	1,74 ± 0,09	2,03 ± 0,17
Fígado (g)	9,54 ± 0,59	10,12 ± 0,24	9,00 ± 0,58	9,76 ± 0,47
Adrenais (mg)	40,23 ± 1,27	37,52 ± 0,98	34,05 ± 1,14	37,58 ± 1,66

Dados estão apresentados em média ± EPM. $p>0.05$ quando comparados ao seu grupo controle por ANCOVA com o peso corpóreo final como covariável. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

Tabela 4. Peso de órgãos dos diferentes grupos experimentais no DPN 120.

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Peso absoluto				
Testículos (g)	3,03 ± 0,07	3,27 ± 0,07*	3,25 ± 0,10	3,27 ± 0,08
Prostata (g)	0,44 ± 0,03	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Epidídimos (g)	1,14 ± 0,03	1,22 ± 0,04	1,19 ± 0,04	1,16 ± 0,02
Vesícula seminal cheia (g)	1,38 ± 0,08	1,31 ± 0,06	1,26 ± 0,08	1,25 ± 0,03
Vesícula seminal vazia (g)	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,03	0,42 ± 0,02
Ducto deferente (mg)	107,94 ± 5,21	109,57 ± 5,02	105,95 ± 2,75	104,29 ± 4,13
Rins (g)	2,60 ± 0,07	2,57 ± 0,09	2,73 ± 0,09	2,54 ± 0,08
Fígado	13,85 ± 0,55	13,24 ± 0,63	13,98 ± 0,62	12,57 ± 0,61
Adrenais (mg)	49,66 ± 3,54	49,62 ± 2,11	51,91 ± 3,16	48,21 ± 1,56
Hipófise (mg)	9,93 ± 0,43	8,10 ± 0,76	10,33 ± 0,50	8,78 ± 0,47

Dados estão apresentados em média ± EPM. *p<0.05 quando comparados ao seu grupo controle por ANCOVA com o peso corpóreo final como covariável. Números em colchetes representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

4.5 Parâmetros biométricos testiculares da prole masculina de ratos

Os parâmetros biométricos analisados estão apresentados na Tabela 5 (DPN 21) e Tabela 6 (DPN 50). Não houve diferença estatística entre os grupos paracetamol e seus respectivos grupos controle em nenhum parâmetro avaliado. Em contrapartida, no DPN 120, houve um aumento no volume ($t(14)=2.44$; $p=0.029$) e no comprimento total dos tubos seminíferos ($t(14)=3.43$; $p=0.04$) nos animais do grupo PARG comparados ao CTRG, como mostrado na Tabela 7.

Tabela 5. Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 21.

	CTR [7]	PARG [7]	CTRGL [9]	PARGL [6]
Volume Testicular (ml)	#0,08 (0,07 – 0,11)	#0,08 (0,08 – 0,09)	0,08 ± 0,005	0,08 ± 0,003
Volume do conteúdo intersticial (ml)	#0,37 (0,33 – 0,49)	#0,39 (0,35 – 0,42)	0,34 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	#0,44 (0,42 – 0,63)	#0,45 (0,42 – 0,46)	0,44 ± 0,04	0,46 ± 0,02
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	#95,68 (89,89 – 103,37)	#96,63 (95,22 – 98,99)	95,59 ± 1,41	92,48 ± 0,58
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	6,93 ± 0,38	5,99 ± 0,27	6,17 ± 0,42	6,92 ± 0,37

Dados estão apresentados em média ± EPM (test-t student) ou mediana (1° – 3° quartil) # (Mann-Whitney). p>0.05, em que números em chave representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

Tabela 6. Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 50.

	CTRGL [8]	PARG [7]	CTRGL [7]	PARGL [8]
Volume Testicular (ml)	1,02 ± 0,04	0,92 ± 0,03	0,89 ± 0,06	0,98 ± 0,03
Volume do conteúdo intersticial (ml)	3,92 ± 0,18	3,61 ± 0,22	3,42 ± 0,26	3,57 ± 0,20
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	#6,48 (5,66 – 6,96)	#5,52 (5,42 – 5,80)	5,52 ± 0,43	6,28 ± 0,17
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	#234,86 (222,63 – 239,93)	#222,43 (220,87- 223,71)	233,02 ± 9,05	234,13 ± 6,58
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	15,47 ± 1,28	14,64 ± 4,22	12,92 ± 0,66	14,77 ± 0,76

Dados estão apresentados em média ± EPM (test-t student) ou mediana (1° – 3° quartil) # (Mann-Whitney). p>0.05, em que números em chave representam o número de animais/grupo. CTRGL (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

Tabela 7. Parâmetros biométricos dos testículos dos diferentes grupos experimentais no DPN 120.

	CTR [8]	PARG [8]	CTRGL [8]	PARGL [8]
Volume Testicular (ml)	1,40 ± 0,04	1,51 ± 0,04	1,56 ± 0,04	1,52 ± 0,05
Volume do conteúdo intersticial (ml)	0,92 ± 0,04	0,94 ± 0,05	1,02 ± 0,03	1,02 ± 0,06
Volume dos túbulos seminíferos (ml)	0,48 ± 0,02	0,57 ± 0,03*	0,54 ± 0,02	0,51 ± 0,03
Diâmetro dos túbulos seminíferos (µm)	230,00 ± 2,51	228,14 ± 2,10	231,91 ± 4,43	232,21 ± 6,34
Comprimento total dos túbulos seminíferos (m)	11,53 ± 0,69	14,00 ± 0,71*	13,00 ± 0,80	12,26 ± 1,10

Dados estão apresentados em média ± EPM (test-t student). *p<0.05, em que números em colchetes representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

4.6. Dosagem de testosterona plasmática

Houve um aumento das concentrações da testosterona plasmática no DPN 120 no grupo PARG ($t(21)=2.17$; $p=0.042$) e PARGL ($t(20)=2.17$; $p=0.047$). Em contrapartida, não houve diferença estatística entre os grupos nos DPN 21 e 50 quando comparados aos seus respectivos grupos controle ($p>0.05$), como mostrado na Tabela 8.

Tabela 8. Dosagem de testosterona plasmática dos diferentes grupos experimentais nos DPN 21, 50 e 120.

Testosterona (ng/ml)	CTRG	PARG	CTRGL	PARGL
DPN 21	#12,98 (12,98 – 15,08) [8]	#14,86 (12,98 – 18,76) [10]	17,43 ± 1,89 [9]	19,97 ± 3,86 [8]
DPN 50	285,07 ± 53,20 [10]	188,66 ± 58,42 [9]	178,85 ± 44,96 [10]	265,86 ± 31,38 [9]
DPN 120	#159,07 (108,52 – 189,72) [10]	#311,74 (165,36 – 577,63)*[12]	166,85 ± 33,82 [11]	299,08 ± 52,54* [11]

Dados estão apresentados em média ± EPM (test-t student) ou mediana (1° – 3° quartil)[#] (Mann-Whitney). *p<0.05 em que números em colchetes representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia. DPN: Dia Pós Natal.

4.7. Parâmetros espermáticos no DPN 120

4.7.1. Contagem espermática

A contagem espermática nos testículos, epidídimos e ductos deferentes estão demonstrados na Tabela 9. Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros analisados (*test-t student*, $p > 0.05$).

Tabela 9. Contagem espermática dos diferentes grupos experimentais no DPN 120.

Parâmetros	CTRG [11]	PARG [13]	CTRGL [14]	PARGL [13]
Nº de espermátides (10 ⁶ /testículo)	179,61 ± 17,1	188,04 ± 11,53	188,67 ± 16,62	198,67 ± 11,98
Nº de espermátides (10 ⁶ /g/testículo)	152,26 ± 17,99	135,24 ± 7,81	137,87 ± 11,99	148,26 ± 9,21
Produção Espermática Diária	29,44 ± 2,79	30,82 ± 1,89	30,93 ± 2,72	32,56 ± 1,96
Nº de espermatozóides (10 ⁶ /cabeça + corpo do epidídimo)	78,27 ± 7,03	88,13 ± 9,08	82,13 ± 8,41	85,43 ± 8,83
Nº de espermatozóides (10 ⁶ /g/cabeça + corpo do epidídimo)	284,80 ± 25,44	307,85 ± 23,71	309,12 ± 28,17	308,45 ± 25,61
Nº of spermatozoides (10 ⁶ /cauda do epidídimo)	126,11 ± 11,82	110,87 ± 7,51	103,28 ± 10,30	104,4 ± 7,8
Nº of spermatozóides (10 ⁶ /g/cauda do epidídimo)	550,95 ± 39,07	500,89 ± 24,86	463,39 ± 36,26	492,37 ± 21,18
Tempo de trânsito espermático (dias) pela cabeça/corpo do epidídimo	#10,1 (8,5-10,9)	#9,27 (8,1-14,4)	10,42 ± 0,84	9,59 ± 0,66
Tempo de trânsito espermático pela cauda do epidídimo (dias)	#17,8 (15,0-23,7)	#16,3 (11,9-19,0)	15,49 ± 0,90	15,81 ± 1,18
Contagem no ducto(10 ⁶ /ml)	36,95 ± 3,62	38,46 ± 5,04	33,1 ± 3,27	36,56 ± 4,86

Dados estão apresentados em média ± EPM (test-t student) ou mediana (1° – 3° quartil)[#] (Mann-Whitney). p>0.05 em que números em chave representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia. DPN: Dia Pós Natal.

4.7.2. Morfologia e motilidade espermática

O teste de Fischer foi realizado para morfologia e motilidade espermática. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos expostos ao paracetamol e seus respectivos controles, conforme demonstrado na Tabela 10 ($p > 0.05$).

Tabela 10. Morfologia e motilidade espermática dos diferentes grupos experimentais no DPN 120.

Parâmetros (%)	CTRG [11]	PARG [13]	CTRGL [14]	PARGL [13]
Espermatozóides normais	76	68	76	74
Espermatozóides anormais	24	32	24	26
Espermatozóides móveis	67	68	62	69
Espermatozóides imóveis	33	32	38	31

Dados estão apresentados porcentagem (teste de Fischer). $p > 0.05$ em que números em chave representam o número de animais/grupo. CTRG (Controle Gestacional): água; PARG (Paracetamol Gestacional): 350 mg/kg/dia; CTRGL (Controle Gestacional Lactacional): água; PARGL (Paracetamol Gestacional Lactacional): 350 mg/kg/dia.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o tratamento materno com paracetamol aumentou o volume e comprimento total dos túbulos seminíferos, levando ao aumento do peso do testículo (grupo PARG). Além disso, alterou o comportamento sexual e aumentou a concentração plasmática de testosterona (grupos PARG e PARGL) na idade adulta.

Os sinais de toxicidade materna são frequentemente utilizados para classificar um fármaco e são fundamentais em estudos de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento (Beyer et al., 2011). A variação de ganho de peso é comumente vista como um sinal de toxicidade. No presente estudo, o tratamento com paracetamol não afetou o ganho de peso materno. Este resultado corrobora com Kristensen et al. (2011), em que ratas tratadas com paracetamol do DG 13 ao 21 (com doses de 150 - 350 mg/kg/dia) não apresentaram alteração no ganho peso, sugerindo que não houve toxicidade maternal na dose escolhida.

No que concerne a prole masculina, o tratamento materno com paracetamol não alterou o peso corporal, a DAG (DPN 1 e 21) e o dia da instalação da puberdade (observado pelo descolamento do prepúcio). A DAG é um indicador de atividade androgênica e pode ser usada para avaliar a ação e liberação androgênica em fases iniciais do desenvolvimento (Dean and Sharpe, 2013). Um estudo que usou a mesma dose de paracetamol do DG 13 ao 21 mostrou uma redução significativa da DAG em ratos com 21 dias de vida intrauterina, sugerindo níveis reduzidos de andrógenos. Contudo, não houve alteração na produção de testosterona pelos testículos fetais (Kristensen et al., 2011). A divergência de resultados pode ter ocorrido devido ao período em que ocorreu a verificação da DAG, já que no estudo de Kristensen et al. (2011), foi realizada uma cesárea no DPN 21 e então a DAG dos filhotes foi medida. Em contrapartida, em nosso estudo, os animais passaram pelo processo de parto e um dia depois, a DAG foi verificada.

Já foi demonstrado que o tratamento materno com paracetamol na dose de 150 mg/kg/dia a partir do DG7 até o DG21 também alterou o comportamento sexual na prole de camundongos machos (Hay-Schmidt et al., 2017). A principal hipótese para explicar a alteração do comportamento sexual no presente estudo está relacionada a um possível mecanismo de ação do paracetamol. O paracetamol possui a capacidade de inibir a COX-3, que é uma variante de enzima COX-1 e atua no sistema nervoso central, levando a diminuição da produção de PGE₂ (Botting and Ayoub, 2005).

A diferenciação sexual hipotalâmica é um processo que se inicia através de um pico de andrógenos que ocorre aproximadamente no DG 18 e um segundo pico ao nascimento, sendo essa fase chamada de ativacional. A testosterona produzida pelos testículos desses animais é transportada pelo plasma até o sistema nervoso central, onde é convertida em estradiol pela enzima aromatase na APO do hipotálamo (Lenz and McCarthy, 2010). Esse estradiol, no período intrauterino é responsável pelos processos de masculinização e defeminização do hipotálamo, importantes para que cérebro do animal seja condizente com os estímulos hormonais que ele receberá após a puberdade. Esses picos de andrógenos que ocorrem no período intrauterino são complementados por um terceiro pico de andrógenos que ocorre na puberdade, sendo chamada de fase ativacional, importante para a ativação do comportamento sexual condizente com o sexo genotípico do animal (Amateau and McCarthy, 2004).

Sabe-se que a PGE₂ tem papel importante na APO para a diferenciação sexual hipotalâmica, sendo que esta é uma área sexualmente dimórfica e bastante responsiva a hormônios, sendo considerada a principal área para a iniciação do comportamento sexual masculino (Amateau and McCarthy, 2004). O estradiol, uma vez presente no sistema nervoso central do feto, é responsável por induzir a atividade da enzima COX, sintetizando PGE₂ (Amateau and McCarthy, 2002) e aumentando os espinhos dendríticos e receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que são importantes para a ativação e manutenção do comportamento

copulatório masculino na vida adulta (Amateau and McCarthy, 2004). Sugere-se, portanto, que o paracetamol prejudicou a diferenciação sexual hipotalâmica e, conseqüentemente, o comportamento sexual da prole masculina através da inibição da COX-3 e pela diminuição da produção de PGE₂. Além disso, Hay-Schmidt et al. (2017) demonstraram que o paracetamol diminuiu os neurônios no núcleo sexualmente dimórfico da APO, comprometendo o comportamento sexual desses camundongos (Lin et al., 2011).

Nossos resultados mostraram aumento no peso dos testículos no DPN 120 em animais PARG, mas não no DPN 21 e 50. Este resultado pode estar relacionado ao aumento do volume e comprimento total dos túbulos seminíferos. O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) é responsável pelo crescimento longitudinal dos túbulos seminíferos e esse processo dá-se, principalmente, no período da infância (Cortes et al., 1987). Entretanto, durante a puberdade há um rápido crescimento do volume testicular devido ao aumento do diâmetro e comprimento dos túbulos por proliferação acentuada das células de Sertoli, espermatogônia, espermatócitos e espermátides (Koskenniemi et al., 2017).

Conforme discutido anteriormente, a diferenciação sexual hipotalâmica durante o período perinatal é importante não somente para o comportamento sexual na vida adulta, mas também para a função reprodutiva, como a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal na puberdade (Weisz and Ward, 1980). O paracetamol foi encontrado em várias estruturas do cérebro, incluindo o hipotálamo (Botting and Ayoub, 2005; Courade et al., 2001). Portanto, sugere-se que o tratamento materno com paracetamol afetou a diferenciação sexual hipotalâmica na prole (período perinatal) e conseqüentemente o padrão de liberação pulsátil de GnRH, que controla o Hormônio Luteinizante (LH) e liberação de FSH (Butte et al., 1979). O comprimento dos túbulos seminíferos está relacionado a um aumento de liberação de FSH, visto que os ratos tratados com FSH no período peripubertal apresentaram um aumento do crescimento longitudinal e peso dos testículos, considerando a relevância do FSH para a

proliferação das células espermáticas através de um aumento da meiose no início da espermatogênese (Leidl et al., 1976). Isto explica nossos resultados referentes ao aumento do CTTS, aumentado o volume dos túbulos seminíferos, e, portanto, o peso dos testículos nos ratos adultos. Os ratos eutanasiados nos DPN 21 e 50 não tinham atingido a puberdade ainda, não sendo possível confirmar a atuação do paracetamol sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas pois o mesmo não havia sido ativado.

Além disso, o aumento das gonadotrofinas leva ao aumento da concentração de testosterona (Butte et al., 1979), que induz um feedback negativo no hipotálamo e na hipófise, consequentemente reduzindo os níveis de testosterona (Ojeda, 2015). Neste estudo, houve um aumento nos níveis de testosterona no DPN 120 em ambos os grupos, e neste sentido, o paracetamol pode ter afetado os núcleos hipotalâmicos e, assim inibindo o feedback negativo. Além do mais, não foram observadas diferenças nos níveis de testosterona no PND 21 e 50, sugerindo que os ratos não entraram na fase ativacional de diferenciação sexual hipotalâmica, visto que nem todos eles atingiram a puberdade no dia da eutanásia (dados não demonstrados). Neste sentido, não houve padrão de liberação pulsátil de GnRH e consequente produção de testosterona.

É importante enfatizar que este é o primeiro estudo de avaliação dos parâmetros espermáticos na prole masculina exposta ao paracetamol durante os períodos intrauterinos e lactacional. Apesar do presente estudo ter demonstrado alteração na histologia dos testículos e níveis de testosterona no DPN 120, não houve diferença nos parâmetros espermáticos analisados. Dados da literatura demonstram que as alterações nos parâmetros espermáticos podem acontecer independentemente das concentrações hormonais e parâmetros histomorfométricos dos testículos (Costa et al., 2015; Vieira et al., 2013).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo revelou que o tratamento materno com paracetamol afeta o sistema reprodutivo e comportamento sexual da prole de ratas expostas ao paracetamol devido à uma alteração na produção de testosterona e regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, efeitos estes vistos principalmente no grupo exposto apenas durante a gestação. Sugere-se que essas alterações tenham ocorrido devido à uma diferenciação sexual hipotalâmica comprometida nas fases iniciais de desenvolvimento, comprometendo o comportamento sexual e outros parâmetros reprodutivos na vida adulta.

7. REFERÊNCIAS

- Ågmo, A., 2003. Unconditioned Sexual Incentive Motivation in the Male Norway Rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol.* 117, 3–14. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.117.1.3>
- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2004. Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat. Neurosci.* 7, 643–650. <https://doi.org/10.1038/nn1254>
- Amateau, S.K., McCarthy, M.M., 2002. A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. *J. Neurosci.* 22, 8586–8596. <https://doi.org/22/19/8586> [pii]
- Anderson, B.J., 2008. Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. *Paediatr. Anaesth.* 18, 915–921. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x>
- Attal, J., Courot, M., Richetin, C., Pisselet, C., Attal, J., Courot, M., Richetin, C., Pisselet, C., Testiculaire, D., Établissement, E.T., Spermatogenèse, D.E.L.A., Le, C., Annales, T., 1963. CHEZ LE TAUREAU To cite this version : HAL Id : hal-00896200.
- Berkowitz, G.S., Lapinski, R.H., 1996. Risk factors for cryptorchidism: a nested case-control study. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 10, 39–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3016.1996.tb00024.x>
- Beyer B. K. et al. ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Research.** 92:36–51, 2011.
- Botting, R., Ayoub, S.S., 2005. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 72, 85–87. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.10.005>
- Botting, R.M., Harvey, W., Bartholomew, S., 2016. Mechanism of Action of Acetaminophen : Is There a Cyclooxygenase 3 ? Author (s): Regina M . Botting Source : *Clinical Infectious Diseases* , Vol . 31 , Supplement 5 . A Symposium Marking 4 Millenia of Antipyretic Pharmacotherapy (Oct ., 2000), pp . S20 31.

- Butte, J.C., Moore, J.A., Rakihana, R., 1979. DIHYDROTESTOSTERONE AND ESTRADIOL IN THE ONE-DAY-OLD RAT John C . Butte, Jerome A . Moore, Ryoko Rakihana Department of Biological Sciences, San Francisco State University, San Francisco, California 94132 2343–2349.
- CORTES, D., M??LLER, J., SKAKKEB??K, N.E., 1987. Proliferation of Sertoli cells during development of the human testis assessed by stereological methods. *Int. J. Androl.* 10, 589–596. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00358.x>
- Costa, N.O., Vieira, M.L., Sgarioni, V., Pereira, M.R.F., Montagnini, B.G., Mesquita, S. de F.P., Gerardin, D.C.C., 2015. Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. *Toxicology* 335, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.011>
- Courade, J.P., Besse, D., Delchambre, C., Hanoun, N., Hamon, M., Eschali r, A., Caussade, F., Cloarec, A., 2001. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. *Life Sci.* 69, 1455–1464. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01228-0](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01228-0)
- De Vries, G.J., Simerly, R.B., 2002. Anatomy, Development, and Function of Sexually Dimorphic Neural Circuits in the Mammalian Brain. *Horm. Brain Behav.* 4, 137–191. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-012532104-4/50066-4>
- Dean, A., Sharpe, R.M., 2013. Anogenital distance or digit length ratio as measures of fetal androgen exposure: Relationship to male reproductive development and its disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 2230–2238. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4057>
- El-Heis, S., Godfrey, K., 2015. Developmental origins of health and disease. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 25, 236–238. <https://doi.org/10.1016/j.ogrm.2015.05.005>
- Favareto, A.P.A., Fernandez, C.D.B., da Silva, D.A.F., Anselmo-Franci, J.A., Kempinas, W.D.G., 2011. Persistent Impairment of Testicular Histology and Sperm Motility in Adult Rats Treated with Cisplatin at Peri-Puberty. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109, 85–96. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00688.x>

- FDA, 2015. FDA has reviewed possible risks of pain medicine use during pregnancy. *Drug Saf. Commun.*
- Fernandes, G.S.A., Arena, A.C., Fernandez, C.D.B., Mercadante, A., Barbisan, L.F., Kempinas, W.G., 2007. Reproductive effects in male rats exposed to diuron. *Reprod. Toxicol.* 23, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.09.002>
- França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68, 1554–1561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010652>
- Gallavan, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L., 1999. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.* 13, 383–390. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(99\)00036-2](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(99)00036-2)
- Gerardin, D.C.C., Bernardi, M.M., Moreira, E.G., Pereira, O.C.M., 2006. Neuroendocrine and reproductive aspects of adult male rats exposed neonatally to an antiestrogen. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 618–623. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.03.026>
- Hay-Schmidt, A., Finkielman, O.T.E., Jensen, B.A.H., Høgsbro, C.F., Holm, J.B., Johansen, K.H., Jensen, T.K., Andrade, A.M., Swan, S.H., Bornehag, C.G., Brunak, S., Jegou, B., Kristiansen, K., Kristensen, D.M., 2017. Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. *Reproduction* 154, 145–152. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0165>
- Jozwiak-Bebenista, M., Nowak, J.Z., 2014. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* 71, 11–23. <https://doi.org/0001-6837>
- Korenbrod, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.I., 1977. Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat1. *Biol. Reprod.* 17, 298–303. <https://doi.org/10.1095/biolreprod17.2.298>
- Koskenniemi, J.J., Virtanen, H.E., Toppari, J., 2017. Testicular growth and development in puberty. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 24, 215–224. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000339>

- Kristensen, D.M., Hass, U., Lesn, L., Lottrup, G., Jacobsen, P.R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J.H., Toppari, J., Jensen, T.K., Brunak, S., Skakkebaek, N.E., Nellemann, C., Main, K.M., Jgou, B., Leffers, H., 2011. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum. Reprod.* <https://doi.org/10.1093/humrep/deq323>
- Kristensen, D.M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejuqc-Rainsford, N., Leffers, H., Jégou, B., 2012. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int. J. Androl.* 35, 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x>
- LEIDL, W., BENTLEY, M.I., GASS, G.H., 1976. Longitudinal Growth of the Seminiferous Tubules in LH and FSH Treated Rats. *Andrologia* 8, 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1976.tb02121.x>
- Lenz, K.M., McCarthy, M.M., 2010. Organized for sex - steroid hormones and the developing hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 32, 2096–2104. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07511.x>
- Lin, D., Boyle, M.P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E.S., Perona, P., Anderson, D.J., 2011. Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature* 470, 221–227. <https://doi.org/10.1038/nature09736>
- Lind, D.V., Main, K.M., Kyhl, H.B., Kristensen, D.M., Toppari, J., Andersen, H.R., Andersen, M.S., Skakkebaek, N.E., Jensen, T.K., 2017. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: A cohort study of 1027 mother-child pairs. *Hum. Reprod.* 32, 223–231. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew285>
- Lupattelli, A., Spigset, O., Twigg, M.J., Zagorodnikova, K., Mårdby, A.C., Moretti, M.E., Drozd, M., Panchaud, A., Hämeen-Anttila, K., Rieutord, A., Gjergja Juraski, R., Odalovic D Kennedy, M., Rudolf, G., Juch, H., Passier, A., Björnsdóttir, I., Nordeng, H., 2014. Medication use in pregnancy: A cross-sectional, multinational web-based study. *BMJ Open* 4. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004365>

- Notarianni, L., Oldham, H., Bennett, P., 1987. Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24, 63–67.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1987.tb03137.x>
- Ojeda, S.R., 2015. Release During Sexual Development in the Male Rat.
- Perobelli, J.E., Martinez, M.F., Da Silva Franchi, C.A., Fernandez, C.D.B., De Camargo, J.L.V., De Grava Kempinas, W., 2010. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* 73, 991–1002. <https://doi.org/10.1080/15287391003751802>
- Ren-Zhu, Y., Xiao-Ying, X., Hai-Yang, S., Min-Hui, Z., Shao-Zhen, Q., 1998. Effect of intrauterine injection of chlorpromazin on implantation in the rat. *Contraception* 58, 315–320. [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(98\)00115-2](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(98)00115-2)
- Robb, G.W., Amann, R.P., Killian, G.J., 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.* 54, 103–107.
<https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>
- Roselli, C.E., Resko, J.A., 1993. Aromatase activity in the rat brain: Hormonal regulation and sex differences. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 499–508.
[https://doi.org/10.1016/0960-0760\(93\)90254-T](https://doi.org/10.1016/0960-0760(93)90254-T)
- Seed, J., Chapin, R.E., Clegg, E.D., Dostal, L.A., Foote, R.H., Hurtt, M.E., Klinefelter, G.R., Makris, S.L., Perreault, S.D., Schrader, S., Seyler, D., Sprando, R., Treinen, K.A., Veeramachaneni, D.N., Wise, L.D., 1996. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 10, 237–44.
[https://doi.org/10.1016/0890-6238\(96\)00028-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(96)00028-7)
- Servey, J., Chang, J., 2014. Over-the-counter medications in pregnancy. *Am. Fam. Physician* 90, 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2015.01.004>
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Hum. Reprod.* 16, 972–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>

- Thiele, K., Kessler, T., Arck, P., Erhardt, A., Tiegs, G., 2013. Acetaminophen and pregnancy: Short- and long-term consequences for mother and child. *J. Reprod. Immunol.* 97, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.014>
- Van Den Driesche #1, S., Macdonald, J., Anderson, R.A., Johnston, Z.C., Chetty, T., Smith, L.B., Mckinnell, C., Dean, A., Homer, N.Z., Jorgensen, A., Camacho-Moll, M.-E., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., Mitchell, R., 2015. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model Europe PMC Funders Group. *Sci Transl Med* May 20, 288–80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4097>
- Vieira, M.L., Hamada, R.Y., Gonzaga, N.I., Bacchi, A.D., Barbieri, M., Moreira, E.G., Mesquita, S. de F.P., Gerardin, D.C.C., 2013. Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? *Reprod. Toxicol.* 35, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.07.006>
- Weisz, J., Ward, I.L., 1980. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. *Endocrinology* 106, 306–316. <https://doi.org/10.1210/endo-106-1-306>
- Werler, M.M., Mitchell, A.A., Hernandez-Diaz, S., Honein, M.A., 2005. Use of over-the-counter medications during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.100>

ANEXOS

Anexo 1. Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 80/2017

Londrina, 14 de Junho de 2017.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "**Avaliação de efeitos reprodutivos e cardiovasculares na prole de mãe tratadas com paracetamol durante a gestação e lactação.**" protocolo CEUA nº7900.2017.82 sob a responsabilidade de **Daniela Cristina Ceccato Gerardin Cantamessa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **30/05/2017**.

O objetivo Avaliar na prole masculina e feminina de ratas tratadas com paracetamol durante a gestação: Parâmetros reprodutivos e comportamentais, como instalação da puberdade, comportamentos reprodutivos, fertilidade, dosagem de hormônios sexuais, histologia de órgãos da reprodução e reatividade do ducto deferente. Grau de Invasividade=2

Vigência do Projeto	01/07/2017 a 01/06/2020
Espécie/linhagem	Rato heterogêneo Wistar
Nº de animais	253 (80 Machos e 173 Fêmeas) e 1440 filhotes após acasalamento (720 fêmeas e 720 machos).
Peso/Idade	75 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, Testículos, Epidídimo, Próstata, Vesícula Seminal, Útero, Ovário, Tecido Adiposo Retroperitoneal e Perigonadal e Aorta

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


 Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr (a). Daniela Cristina Ceccato Gerardin Cantamessa

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central do CCB

C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para a Direção de Centro do CCB