



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRÉA MORGATO DE MELLO MIYASAKI

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A GESTAÇÃO  
E AMAMENTAÇÃO:  
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS RENAIIS NA PROLE**

ANDRÉA MORGATO DE MELLO MIYASAKI

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A GESTAÇÃO  
E AMAMENTAÇÃO:  
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS RENAIIS NA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Estefânia G. Moreira

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M685 Miyasaki, Andréa Morgato de Mello .  
Exposição ao paracetamol durante a gestação e amamentação: avaliação de possíveis efeitos renais na prole.r / Andréa Morgato de Mello Miyasaki. - Londrina, 2020.  
64 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. paracetamol, gestação, lesão renal, ratos - Tese. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 61

ANDRÉA MORGATO DE MELLO MIYASAKI

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A GESTAÇÃO  
E AMAMENTAÇÃO:  
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS RENAIIS NA PROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Estefânia Gastaldello  
Moreira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Danielle Venturini  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de março de 2020.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos Maurício, Carolina e Eduardo.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por sempre me proporcionarem e incentivarem a buscar oportunidades de estudo e aprimoramento.

Aos meus filhos Carolina e Eduardo, pelo amor, paciência e compreensão nos períodos de ausência da convivência familiar.

Ao meu marido querido, Mauricio, por estar comigo sempre.

À minha madrinha Gracy por sempre abdicar do seu pelo nosso.

Aos meus tios e primos por torcerem por mim e comemorarem juntos minhas conquistas.

À Profa. Dra. Estefânia G. Moreira, amiga e orientadora, exemplo de sabedoria e dedicação, pelo incentivo e ensinamento nessa jornada.

Ao meu amigo Dr. Jefferson Crespigio, pela grande ajuda e paciência.

À Camila Rigobello, por compartilhar seus experimentos e sua simpatia.

À Profa. Dra. Ana Paula F.R. Loureiro Bracarense e Ricardo Luis Nascimento de Matos pela importante colaboração neste trabalho.

## **APRESENTAÇÃO**

A presente dissertação de Mestrado é composta por introdução, revisão de literatura e um artigo científico produzido no Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas do Departamento de Ciências Fisiológicas e no Laboratório de Pós-Graduação (LPG) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

MIYASAKI, A. M. M. **Exposição ao paracetamol durante a gestação e amamentação**: avaliação de possíveis efeitos renais na prole. 2019. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

O paracetamol (PAR) é um dos poucos medicamentos liberados para uso durante os períodos gestacional e lactacional. O PAR atravessa a barreira placentária e é excretado no leite materno, portanto, pode afetar o desenvolvimento do feto e / ou do recém-nascido. Este estudo avaliou possíveis efeitos nefrotóxicos em ratas gestantes e filhotes expostos ao PAR durante a gravidez e lactação. As mães foram tratadas diariamente com PAR (35 ou 350 mg / kg) ou água (controle, CON) desde o dia gestacional 6 até o desmame (dia pós-natal 21). Mães e filhotes foram eutanasiados no desmame e os tecidos foram coletados para bioquímica (concentração sérica de AST, ALT, uréia e creatinina; concentração renal de glutathiona reduzida –GSH- e produtos avançados de oxidação proteica) e histopatologia renal. Comparados ao CON, os filhotes expostos ao PAR (350 mg / kg) apresentaram níveis aumentados de GSH renal, enquanto as mães expostas a ambas as doses apresentaram níveis aumentados de AST. O tratamento com PAR não influenciou os parâmetros de toxicidade geral, como ganho de peso materno e dos filhotes, bem como número de filhotes ao nascimento. Nossos resultados sugerem que a exposição materna a doses relevantes em humanos de PAR não está associada a hepato ou nefrotoxicidade em filhotes ou mães. Digno de nota é que essa exposição não foi desprovida de efeitos. Induziu uma resposta antioxidante adaptativa nos rins dos filhotes e afetou a atividade sérica materna da AST. São necessários estudos para investigar a origem desse aumento da AST.

**Palavras-chaves:** paracetamol; gestação; lesão renal; ratos.

MIYASAKI, A. M. M. **Exposure to paracetamol during pregnancy and breastfeeding**: evaluation of possible renal effects on offspring. 2019. 64 p. Dissertation (Master in Health Sciences) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

### ABSTRACT

Paracetamol (PAR) is one of the few drugs released for use throughout the gestational and lactational periods. PAR passages through the placental barrier and is excreted into the breast milk, thus, it may impact the development of the foetus and/or neonate. This study evaluated possible nephrotoxic effects in rat dams and pups exposed to PAR during pregnancy and lactation. Dams were gavaged daily with PAR (35 or 350 mg/kg) or water (control, CON) from gestational day 6 to weaning (postnatal day 21). Dams and pups were euthanized at weaning and tissues were collected for biochemical (seric concentration of AST, ALT, urea and creatinine; renal concentration of glutathione –GSH- and advanced oxidation protein products) and renal histopathology. Compared to CON, PAR (350 mg/kg) exposed pups presented increased levels of renal GSH whereas dams exposed to both doses presented increased levels of AST. PAR treatment did not influence parameters of general toxicity, such as weight gain of dams and pups as well as the number of pups per litter. In conclusion, our results suggest that maternal exposure to human relevant doses of PAR is not associated with hepato or nephrotoxicity in the pups or dams. Noteworthy is that this exposure was not devoided of effects. It induced an adaptative antioxidant response in the pups' kidneys and impacted the maternal seric activity of AST. Studies are needed to further investigate the origin of this increased AST.

**Key words:** paracetamol; pregnancy; renal injury; rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	fator de indução apoptótica
ALT	alanina amino transferase
AM404	N-araquidinoil-fenolamina
AMT	transportador da membrana da anandamida
AOPP	produtos avançados de oxidação proteica
AST	aspartato aminotransferase
ATP	adenosina trifosfato
BSA	soro albumina bovina
CB	canabinóide
COM	controle
COX	ciclooxigenase
CYP	enzima microsomal citocromo P450
DAB	3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido
DG	dia gestacional
DNA	ácido desoxirribonucleico
DOHaD	origens do desenvolvimento da saúde e da doença
DPN	dia pós-natal
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EROS	espécies reativas de oxigênio
FAAH	amida hidrolase de ácidos graxos
FDA	Food and Drug Administration
FOAD	origem fetal de doenças
GSH	glutathiona reduzida
HE	hematoxilina-eosina
HPF	campos de alta potência
JNK	c-jun N-terminal-quinase
LRA	lesão renal aguda
MAPK	proteína-quinase-ativada por mitogênio
NAPQ	n-acetil-p-benzoquinona imina
PAR	paracetamol
PAS	ácido periódico-Schiff
PBS	solução salina tamponada de fosfatos

PGES	prostaglandina endoperoxidase sintetase
Ph	potencial hidrogeniônico
RAA	renina-angiotensina-aldosterona
SNC	sistema nervoso central
TDAH	déficit de atenção e hiperatividade
TGF	taxa de filtração glomerular

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
2.1	PAR .....	13
2.2	MECANISMO DE AÇÃO DO PAR .....	15
2.3	METABOLISMO HEPÁTICO DO PAR E HEPATOTOXICIDADE .....	16
2.4	NEFROTOXICIDADE DO PAR .....	17
2.5	PAR NA GRAVIDEZ E AMAMENTAÇÃO.....	18
2.6	DOHAD .....	19
2.7	NEFROGÊNESE E LESÃO RENAL FETAL DURANTE A GESTAÇÃO .....	21
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>63</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O paracetamol (PAR) é o medicamento analgésico e antipirético mais comumente usado no mundo, inclusive por mulheres grávidas (Werler *et al.* 2005; Thiele *et al.* 2013).

O PAR atravessa livremente a placenta e vários trabalhos associam o seu uso durante a gestação a complicações como aborto, prematuridade, baixo peso ao nascimento, malformações fetais e alteração na ontogenia imune fetal, porém os achados são ambíguos e o mecanismo fisiopatológico, desconhecido (Thiele *et al.* 2013; Nitsche *et al.* 2017). Desde 2003, estudos sugerem associação entre uso materno de PAR e risco de alterações no desenvolvimento neuro-psicomotor da prole, principalmente déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e distúrbios do espectro autista (Torres 2003; Blaser and Allan 2014; Liew *et al.* 2014) porém, a agência reguladora americana (i.e., *Food and Drug Administration* – FDA) concluiu que os resultados dos estudos eram conflitantes e que conclusões confiáveis para alterar a recomendação de segurança em relação ao PAR não podiam ser obtidas.

O PAR atravessa a barreira placentária (Conings *et al.* 2019) e seus metabólitos foram detectados na urina fetal (Bertolini *et al.* 2006), no leite materno e na urina de neonatos (Notarianni *et al.* 1987), indicando que o uso materno dessa droga resulta em exposição fetal / neonatal ao PAR.

O PAR e a fenacetina são derivados da acetanilida. No passado, a fenacetina era um analgésico amplamente utilizado, até ter associado seu uso crônico a lesões renais graves, com alta incidência de necrose papilar renal (Burry A 1972; Murray 1972) e por isso ter sido retirada do mercado. Em 1948, Brodie e Axelrod demonstraram que o principal metabólito responsável pela ação analgésica da acetanilida e da fenacetina era o PAR (Brodie and Axelrod 1948), que rapidamente ganhou popularidade em todo o mundo (Bertolini *et al.* 2006). Entretanto, o fato do PAR ser o composto que se acumula na medula renal após a administração da fenacetina, levanta a possibilidade de que tanto o PAR quanto a fenacetina são igualmente nefrotóxicos (Bluemle and Goldberg 1968).

Nas últimas décadas, vários estudos avaliaram os efeitos da nutrição e de exposições químicas durante o desenvolvimento embrionário capazes de desencadear doenças ou disfunções em fases posteriores da vida (Heindel *et al.* 2015). A hipótese atual propõe que as adaptações do feto às condições intra-uterinas e maternas durante

seu desenvolvimento moldam a estrutura e a função de seus órgãos. Quando as mulheres grávidas são tratadas com medicamentos, a placenta e o feto podem ser alvos de seus efeitos adversos; as consequências dependem dos efeitos intrínsecos da droga, sua meia-vida e extensão da exposição (DeVane *et al.* 2011).

O tratamento medicamentoso pode afetar o desenvolvimento renal durante a gravidez. Como a nefrogênese se completa com aproximadamente 36 semanas de gestação em humanos, a maioria dos efeitos nefrotóxicos do desenvolvimento pode ser esperada se mulheres forem tratadas durante a gravidez. Muitos medicamentos foram testados durante o desenvolvimento fetal e considerados seguros, no entanto, o espectro de anomalias congênitas dos rins e do trato urinário é muito amplo, a estimativa do número de néfrons é escassa e o tamanho do rim é apenas um marcador rudimentar (Bertram 2001; Sasaki, Tsuboi, Kanzaki *et al.* 2019; Sasaki, Tsuboi, Okabayashi *et al.* 2019). Portanto, nenhuma droga, até onde se sabe, provou ser definitivamente segura para uso durante o desenvolvimento renal.

Frente ao descrito acima, torna-se relevante a avaliação de possíveis impactos da exposição materna ao PAR durante a gestação e/ou amamentação sobre o desenvolvimento renal do feto.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PAR

O PAR e a fenacetina são derivados da acetanilida. (Fig.1) Constatou-se que a acetanilida possuía atividade antipirética, tendo sido rapidamente introduzida na prática médica, porém foram evidenciados alguns efeitos nocivos, como a cianose devido à metahemoglobinemia (Bertolini *et al.* 2006), sendo necessária a busca de derivados da anilina menos tóxicos. Vários compostos foram testados e os mais satisfatórios foram a fenacetina (acetofenetidina) e o N-acetil-p-aminofenol (acetaminofeno, PAR). O PAR foi sintetizado por Harmon Morse em 1878 (Morse 1878) e sua primeira utilização clínica ocorreu em 1887, prescrito por Joseph Von Mering (Von Mering 1893), mas foi logo descartado em favor da fenacetina. A fenacetina foi usada indiscriminadamente, especialmente em associações analgésicas. O uso excessivo e prolongado de tais analgésicos pelos leigos, às vezes por períodos de anos, causou muitas intoxicações crônicas graves, com alta incidência de necrose papilar renal (Burry A 1972; Murray 1972). Em 1948, Brodie e Axelrod demonstraram que o principal metabólito responsável pela ação analgésica da acetanilida e da fenacetina era o PAR, enquanto a metahemoglobinemia era produzida por outro metabólito, a fenil-hidroxilamina (Brodie and Axelrod 1948). Assim, o PAR foi "redescoberto" e comercializado desde meados da década de 1950. Rapidamente ganhou popularidade e em muitos países, incluindo o Reino Unido, as vendas do PAR excederam as da aspirina a partir de 1980 (Bertolini *et al.* 2006).

Devido à sua aceitação generalizada como uma alternativa mais segura à fenacetina, o PAR tornou-se um dos medicamentos analgésicos / antipiréticos de venda livre mais utilizados no mundo (Ghanem *et al.* 2016). Nos anos 80, o PAR passou a ser o analgésico e antipirético mais utilizado também em crianças, devido à associação do uso de ácido acetilsalicílico à ocorrência do Síndrome de Reye nesta faixa etária (Cranswick and Coghlan 2000). O PAR é um inibidor seletivo da ciclo-oxigenase e tem atividade analgésica por modular o sistema canabinóide endógeno (Bertolini *et al.* 2006; Ghanem *et al.* 2016). Também atua no centro da termoregulação do hipotálamo, sendo capaz de inibir o efeito dos pirógenos e influenciar no mecanismo da febre (Flower and Vane 1972). No entanto, possui fraca ação anti-inflamatória (Ghanem *et al.* 2016).

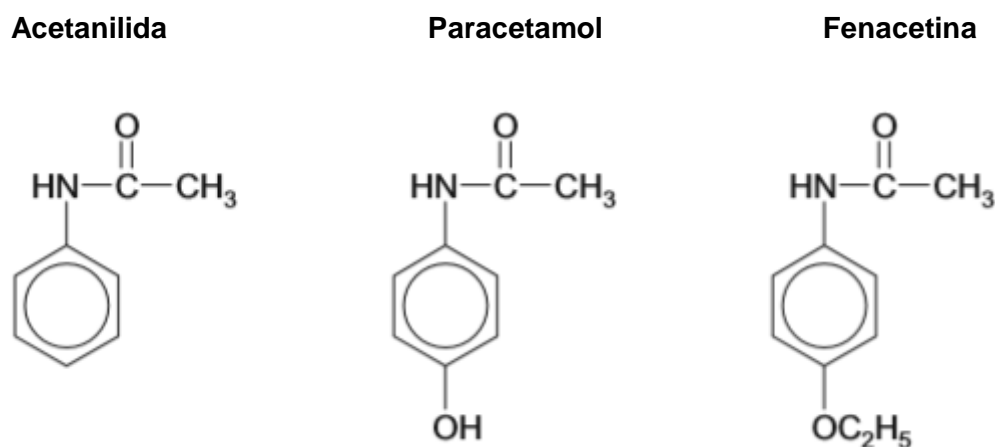
O PAR está presente em diferentes dosagens e formas farmacêuticas, bem como em formulações associado a outros fármacos. Recentemente, considerações sobre as lesões hepáticas causadas pelo PAR levaram a agência reguladora americana (i.e., *Food and Drug Administration* – FDA) a reduzir a quantidade máxima de PAR

permitida nas formulações de prescrição para 325 mg e a recomendar doses diárias mais baixas para uso sem receita ('FDA, 2009a. '; 'FDA, 2009b. '; 'FDA, 2011.')

Mesmo em doses terapêuticas, o PAR pode ser nefrotóxico aos pacientes com depleção de glutathiona (como dependentes de álcool, pacientes desnutridos ou em jejum prolongado) ou em pacientes usuários de medicamentos indutores das enzimas microsossomais do sistema do citocromo P-450 CYP2E1, CYP1A2 e CYP3A4 (por ex, alguns anticonvulsivantes) (Blakely and McDonald 1995).

Um estudo retrospectivo em pacientes pediátricos intoxicados por PAR sugeriu que a nefrotoxicidade pode ser mais comum em crianças e adolescentes (Boutis and Shannon 2001). A frequência geral observada foi de 8,9% e a frequência de nefrotoxicidade grave foi de 2,2%. Ambos os resultados são superiores à frequência de 1% relatada para vítimas adultas de superdosagem de PAR (Boutis and Shannon 2001). Embora interessante, esse estudo tem limitações como pequeno número de pacientes (45 pacientes); ingesta autorreferida de PAR de diferentes doses e tempo de ingestão impreciso.

O PAR tem sido utilizado como agente único e em combinação com outros analgésicos, enquanto que a fenacetina estava disponível apenas em combinações com outros analgésicos. O fato do PAR ser o composto que se acumula na medula renal após a administração da fenacetina levanta a possibilidade de que tanto o PAR quanto a fenacetina são igualmente nefrotóxicos (Bluemle and Goldberg 1968). A possibilidade do uso regular de PAR isoladamente aumentar o risco de doença renal terminal não foi claramente demonstrada, mas não pode ser descartada.



**Fig.1:** Estrutura química da anilida e seus derivados. Bertolini e cols. Paracetamol: New vistas of an old drug. CNS Drug Reviews, Vol. 12, No. 3-4, 2006.

## 2.2 MECANISMO DE AÇÃO DO PAR

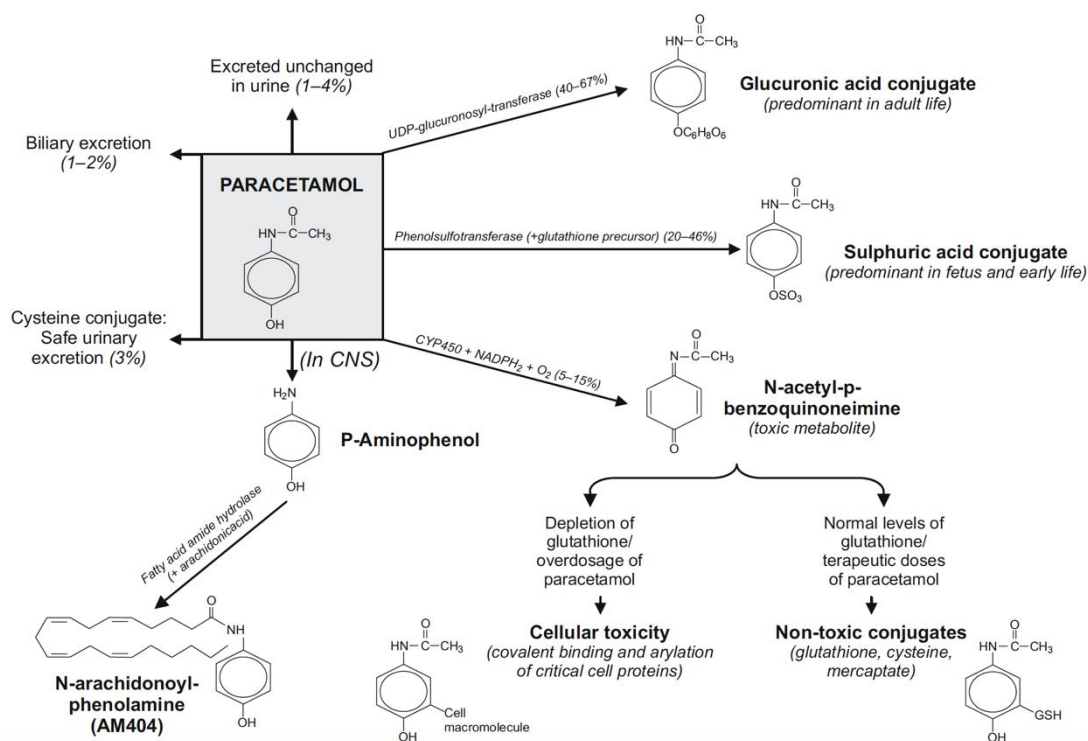
O PAR atravessa a barreira hematoencefálica e é distribuído homogeneamente por todo o sistema nervoso central (SNC) (Courade *et al.* 2001). No encéfalo, o PAR produz inibição seletiva da enzima ciclo-oxigenase (COX) tornando-a cataliticamente deficiente, aparentemente por uma reação de redução da forma ativa da COX. Essa inibição da COX ocorre apenas em áreas onde os níveis de peróxidos são muito baixos, como no encéfalo, por isso o PAR não é ativo em locais periféricos de inflamação, onde a concentração de peróxido é elevada (Boutaud *et al.* 2002). Da mesma forma, doses baixas de PAR têm sido associadas à redução do estresse oxidativo relacionado à liberação de prostaglandinas e na febre (Hou *et al.* 2011; Ghanem *et al.* 2016). Acredita-se que o PAR iniba as isoformas de ciclo-oxigenase 1, 2 e, possivelmente, 3 (Jetten *et al.* 2012). Ainda, a inibição de uma COX induzível, talvez a COX-4, também pode mediar algumas ações do PAR, mas este efeito só foi descrito em células isoladas de macrófagos de ratos (Botting, R., Ayoub 2005).

Recentemente, foi descrito que as propriedades analgésicas do PAR podem envolver modulação do sistema canabinóide endógeno. O PAR, depois de desacetilado em p-aminofenol, sofre conjugação com ácido araquidônico pelas enzimas amida hidrolase de ácidos graxos para formar N-araquidinoil-fenolamina (AM404) no encéfalo e na medula espinhal (Fig.2). O AM404 é um agonista fraco dos receptores canabinóides do tipo 1 e 2 (CB1 e CB2) e um inibidor do transportador de membrana do endocanabinóide anandamida, aumentando a neurotransmissão endocanabinóide (Hogestatt *et al.* 2005; Ghanem *et al.* 2016).

Em resumo, além do modo de ação de inibição da COX mediada centralmente, as vias de sinalização vanilóide e canabinóide também estão implicadas nas ações farmacológicas do PAR (Ghanem *et al.* 2016).

## 2.3 METABOLISMO HEPÁTICO DO PAR E HEPATOTOXICIDADE

Como ilustrado na Fig. 2, o PAR sofre biotransformação principalmente hepática por glicuronidação (40-67%), sulfatação (20-46%) e oxidação (5-15%) (Bertolini *et al.* 2006).



**Fig.2:** Metabolismo do PAR. Bertolini e cols. Paracetamol: New vistas of an old drug. *CNS Drug Reviews*, Vol. 12, No. 3-4, 2006.

A via predominante em adultos é a glicuronidação, enquanto que em fetos e crianças até 10-12 anos é a sulfatação. Os metabólitos gerados pela glicuronidação e pela sulfatação são desprovidos de atividade biológica, sendo solúveis em água e excretados pelos rins (Mazer and Perrone 2008)

O metabólito gerado pela oxidação (n-acetil-p-benzoquinona imina ou NAPQI), através das subfamílias de enzimas microsossomais CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 e CYP2A6, é altamente reativo mas pode ser inativado quando se conjuga à glutatião reduzida (GSH) e é excretado como cisteína ou conjugados mercaptúricos na urina e na bile. Entretanto, quando há deficiência de GSH ou excesso de formação de NAPQI (i.e., superdosagens) com consequente depleção de GSH tanto citosólica quanto mitocondrial, o NAPQI forma adutos covalentes com macromoléculas nucleofílicas

(proteínas, DNA e lipídios insaturados) prejudicando a função mitocondrial e gerando estresse oxidativo e ativação imunológica (Ghanem *et al.* 2016). A lesão de hepatócitos é desencadeada com uma diminuição de 70% das reservas de GSH (Ghanem *et al.* 2016).

A ligação do NAPQI a proteínas mitocondriais inibe a cadeia de transporte de elétrons e causa extravazamento de elétrons, desencadeando a ativação de componentes sensíveis ao *status* redox da cascata de proteína-quinase-ativada por mitogênio (MAPK) (Du, K., Xie, Y., McGill, M.R., J 2015). Isso leva à fosforilação e translocação mitocondrial da c-jun N-terminal-quinase (JNK) (Hanawa *et al.* 2008), inibindo ainda mais o fluxo de elétrons nas mitocôndrias e causando uma amplificação do estresse oxidativo e formação de peroxinitrito (Win *et al.* 2016). Esses eventos abrem poros na membrana mitocondrial tornando-a permeável e levando à perda da força próton-motora com consequente interrupção da síntese de ATP (Jaeschke *et al.* 2018). Essa maior permeabilidade também desencadeia o edema da matriz e a ruptura da membrana externa levando à liberação de mais proteínas do espaço intermembranar (Bajt *et al.* 2008). O fator de indução apoptótica (AIF) e a endonuclease G podem translocar para o núcleo e causar fragmentação do DNA (Bajt *et al.* 2006). A permeabilidade da membrana mitocondrial e a fragmentação do DNA nuclear são eventos terminais críticos da morte celular por necrose induzida pelo PAR (Jaeschke *et al.* 2018).

A lesão hepática induzida pelo PAR *in vivo* é caracterizada por necrose centrolobular. A localização da lesão é devido aos níveis mais altos de citocromo P450 e menor conteúdo de GSH nessa zona, tornando-a mais suscetível aos eventos induzidos pelo PAR (Jaeschke *et al.* 2018). Isso significa que os mecanismos discutidos não ocorrem no mesmo grau em todas as células do lóbulo hepático. A severidade da lesão e o número de mitocôndrias afetadas pelos mecanismos de sinalização descritos são gradualmente reduzidos do centrolobular para a região periportal (Ni *et al.* 2013). Assim, mecanismos adaptativos como a autofagia para remover mitocôndrias e adutos proteicos danificados, e a biogênese mitocondrial para restaurar a massa mitocondrial podem limitar a morte celular e promover a regeneração em torno da área necrótica.

## 2.4 NEFROTOXICIDADE DO PAR

A lesão renal aguda (LRA) pode se manifestar independentemente dos pacientes evoluírem com toxicidade hepática (MOUR *et al.*, 2005; STERN *et al.*, 2005a). No rim adulto, a histologia da lesão renal por PAR reflete um padrão do tipo necrose

tubular aguda (Bertolini *et al.* 2006; Cekmen *et al.* 2009). Em alguns casos, a microscopia óptica evidencia lesão na membrana basal, com glomérulos e vasos normais. Não há deposição de imunoglobulinas ou complemento na microscopia fluorescente. À microscopia eletrônica observa-se a perda da borda em escova, túbulos com edema e distorção da organização mitocondrial.

Como na hepatotoxicidade, o mecanismo envolvido na nefrotoxicidade envolve estresse oxidativo. Quando grandes quantidades de NAPQI são formadas ou excretadas no rim e/ou quando há deficiência de GSH renal, o NAPQI leva a estresse oxidativo resultando em danos subendoteliais e alterações isquêmicas tubulares que evoluem para necrose tubular aguda (Eguia and Materson 1997; Mour *et al.* 2005). A geração de NAPQI nos rins pode vir tanto da atividade de enzimas CYP do citocromo P450, como discutido no item de metabolização hepática, como também da enzima prostaglandina endoperoxidase sintetase (PGES), uma enzima encontrada no rim que metaboliza o PAR em NAPQI. A geração de NAPQI pela PGES ocorre mais na medula renal, enquanto que as enzimas CYP do citocromo P450 desempenham um papel mais importante no córtex. A PGES tem sido mais implicada na toxicidade crônica do PAR o que parece residir no fato da PGES ligar-se ao PAR com afinidade tão elevada que NAPQI é formado em quantidades significativas mesmo em doses terapêuticas de PAR (Mazer and Perrone 2008) não associadas a toxicidade aguda.

Apesar dessas diferenças, o resultado da formação de NAPQI será o mesmo: ligação covalente a proteínas celulares levando a morte celular e necrose tecidual. Este processo foi demonstrado em humanos e em modelos animais (Mazer and Perrone 2008).

A enzima N-desacetilase também parece envolvida na nefrotoxicidade induzida por PAR, embora seu papel não tenha sido totalmente elucidado. Sabe-se que a enzima atua no PAR ou NAPQI, desacetilando seu substrato em p-aminofenol, que é convertido em um radical livre capaz de ligar-se às proteínas celulares. Este processo pode ocorrer em combinação com as ações do sistema enzimático CYP 450 e foi demonstrado em modelos animais (Mazer and Perrone 2008).

## **2.5 PAR NA GRAVIDEZ E AMAMENTAÇÃO**

O PAR atravessa a barreira placentária (Conings *et al.* 2019) e seus metabólitos foram detectados na urina fetal (Bertolini *et al.* 2006), no leite materno e na urina de

neonatos (Notarianni *et al.* 1987), indicando que o uso materno dessa droga resulta em exposição fetal / neonatal ao PAR.

O PAR é um analgésico amplamente utilizado no pós-parto em nutrizes. Notarianni e cols. realizaram um estudo administrando PAR a mulheres que amamentavam e observaram que a droga rapidamente passava para o leite e a concentração de leite excedia a do plasma, com uma proporção média de concentração de leite/plasma de 1,24. Também relataram aumento significativo na quantidade de PAR excretado com o aumento do fluxo de leite. Não foram detectados metabólitos do PAR no leite, mas os metabólitos foram excretados pelos neonatos na urina (Notarianni *et al.* 1987).

## 2.6 DOHaD

O desenvolvimento ideal do embrião e do feto depende da passagem placentária de gases, nutrientes, hormônios e resíduos. Essas moléculas são transferidas através da placenta por meio de difusão passiva, captação e efluxo celular mediada por transportadores e vias de transcitose. Os mesmos mecanismos controlam adicionalmente a taxa e extensão da transferência transplacentária de medicamentos tomados pela mãe grávida. Essencialmente, todos os medicamentos atravessam a placenta até certo ponto e alguns se acumulam na própria placenta em níveis que podem até exceder os do plasma materno. Portanto, mesmo medicamentos que não são eficientemente transferidos pela placenta podem afetar indiretamente o desenvolvimento fetal, interferindo na função placentária (Polin, R.A. & Fox 2011).

Até meados do século XX, acreditava-se que a placenta humana assegurava perfeita proteção ao feto tornando-o imune a substâncias tóxicas, exceto em doses que matavam a mãe (Dally 1998). O atendimento pré-natal não incluía conselhos sobre álcool, fármacos ou outros produtos químicos. Os testes pré-clínicos de novos medicamentos em animais prenhes era superficial ou inexistente, mesmo com a evidência de certas doenças e hábitos maternos causarem sequelas no feto. Em 1749, Watson foi o primeiro a estudar a permeabilidade da placenta, sendo provavelmente a primeira menção à ideia de que doença fetal poderia ocorrer no útero. Ballantyne, um teratologista escocês, em 1904, listou “variedades de estados mórbidos fetais”, como sequela de hábitos maternos, como o alcoolismo, intoxicação por chumbo e por morfina (Ballantyne 1904). Em 1937, o diagnóstico de feto com anormalidades foi discutido, mas não suas causas (Anderson 2016). A transferência de medicamentos com sulfonamida para o feto foi relatada no final da década de 1930 (Ginzler and

Chesner 1942), seguida por estudos nas décadas de 1940 e 1950 que demonstraram a transferência transplacentária de muitas outras drogas (Dally 1998). O efeito prejudicial da rubéola materna no feto foi comprovado por Gregg em 1941 (Gregg 1941). Apesar das evidências, até a década de 1960 os medicamentos eram prescritos livremente durante a gravidez, com base na crença de que a placenta era uma barreira contra influências nocivas do meio ambiente. Essa percepção mudou radicalmente com o surgimento de fetos sequelados pelo uso materno da talidomida contra a êmese gravídica. Desde então há extensos estudos sobre patologias e drogas que podem causar não somente danos estruturais mas também funcionais aos fetos.

Nas últimas décadas vários termos foram criados para expressar os efeitos da nutrição e de exposições químicas durante o desenvolvimento que podem desencadear doenças ou disfunções em fases posteriores da vida. Dentre eles, origem fetal das doenças (FOAD) e início fetal das doenças no adulto, ambos focados no período de exposição fetal e doenças na vida adulta, excluindo as doenças nas primeiras fases da vida. Há alguns anos, a sociedade FOAD expandiu o nome para DOHaD, origens do desenvolvimento da saúde e da doença (Heindel *et al.* 2015).

O assunto tornou-se tão importante que uma sociedade internacional e um periódico foram criados para debater sobre o efeito do meio ambiente no desenvolvimento do organismo.

A abordagem da DOHaD evoluiu nos últimos anos e atualmente propõe que as adaptações do feto às condições intra-uterina e materna durante o seu desenvolvimento moldam a estrutura e a função dos seus órgãos. Acredita-se que as origens da saúde e da doença são influenciadas por questões ambientais e fatores que atuam durante a fase de plasticidade do desenvolvimento fetal, podendo interagir com alteração genotípica para alterar a capacidade do organismo em lidar com seu ambiente mais tarde na vida.

Quando as mulheres grávidas são tratadas com medicamentos, a placenta e o feto são alvos de seus efeitos terapêuticos e adversos. As consequências da exposição fetal e placentária a medicamentos podem ser benignas, causar teratogenicidade ou mesmo o término da gravidez ou provocar alterações sutis que poderão se manifestar tardiamente. Essas consequências dependerão das propriedades intrínsecas da droga, de sua meia vida e da extensão da exposição (DeVane *et al.* 2011).

## 2.7 NEFROGÊNESE E LESÃO RENAL FETAL DURANTE A GESTAÇÃO

O sistema urogenital deriva do mesoderma intermediário da crista urogenital presente ao longo da parede posterior da cavidade abdominal no feto em desenvolvimento. O mesoderma intermediário desenvolve-se no nefrótomo que se distingue em pronefro (rim rudimentar), mesonefro (o rim não funcional) e metanefro (o rim permanente). Enquanto o pronefro se desintegra totalmente, o mesonefro pode funcionar momentaneamente durante o período fetal inicial, produzindo urina até a 5ª semana de gestação, mas degenera quase inteiramente entre a 11ª e a 12ª semana de gestação, deixando apenas seus túbulos caudais para desenvolver-se no epidídimo e ducto deferente nos homens. O metanefro desenvolve-se no broto ureteral (crescimento do ducto mesonéfrico) e em um blastema metanéfrico. O broto ureteral progride para dar origem aos ureteres, pelve renal e túbulos coletores, enquanto o blastema metanéfrico forma os néfrons que constituem o sistema excretor do rim. A diferenciação e o desenvolvimento do rim são regulados por várias moléculas. Acredita-se que o néfron alcance funcionalidade com quase 1 milhão de néfrons por rim até a 32ª semana de gestação no humano e que a nefrogênese termine em torno da 36ª semana. É interessante mencionar que existe uma variação muito ampla (250.000 a 2.000.000) no número de néfrons por rim, entre os indivíduos (Nyengaard 1999).

Com o crescimento longitudinal do embrião, os rins “ascendem” da localização inicial na pelve até a localização final no retroperitônio superior. Simultaneamente, eles giram em torno de seus eixos vertical e horizontal, de modo que sua orientação final seja tal que os pólos superiores fiquem um pouco mais mediais e anteriores. A vasculatura e a inervação também aumentam junto com os rins. Alterações no desenvolvimento anatômico e molecular normal dos rins podem resultar em malformações congênitas, como rins ectópicos ou hipoplásicos e anomalias ureterais (Sulemanji and Vakili 2013).

O tratamento medicamentoso materno durante a gestação pode afetar a nefrogênese. Como ela cessa com aproximadamente 36 semanas de gestação em humanos (Nyengaard 1999), a maioria dos efeitos nefrotóxicos do desenvolvimento pode ser esperada durante o tratamento de mulheres grávidas e não durante a amamentação.

A alteração no desenvolvimento renal e/ou do trato urinário pode se apresentar de várias formas. Algumas malformações do parênquima renal são facilmente reconhecíveis ao exame ultrassonográfico pré ou pós-natal, enquanto outras são mais complexas, como a displasia e a hipoplasia renal, difíceis de se identificar *in vivo* e

envolvendo riscos a longo prazo. Os rins hipoplásicos contêm um número reduzido de néfrons e a presença dessa alteração costuma ser erroneamente estimada pelo tamanho renal (Nyengaard 1999; Bertram 2001; Schreuder *et al.* 2011). Entretanto, esta não é uma avaliação ideal, visto que o valor de referência para o número de néfrons varia quase dez vezes. Keller *et al.* evidenciaram uma redução de aproximadamente 50% no número de néfrons associada à hipertensão arterial (700.000 versus 1.400.000 em indivíduos hipertensos e normotensos, respectivamente), em indivíduos com medida renal semelhante (Keller *et al.* 2003). Isso mostra que, mesmo em rins de tamanho normal, o número de néfrons pode variar muito, assim como os riscos de sequelas a longo prazo, como a hipertensão arterial.

O desenvolvimento renal também pode ser alterado sem quaisquer aberrações estruturais evidentes. Um exemplo importante dos efeitos dos medicamentos é a disgenesia tubular renal, caracterizada por rins de tamanho e aparência normais no ultrassom, mas sem produção ou depuração de urina (Lacoste *et al.* 2006). A biópsia renal mostra a ausência de túbulos proximais, o que pode ser explicado pelo desenvolvimento renal anormal devido a mutações no sistema renina-angiotensina ou por medicamentos bloqueadores deste sistema. Embora essas anomalias congênitas possam ser difíceis de diagnosticar, são importantes por constituírem a principal causa de doença renal terminal em crianças (Lewis *et al.* 2009; Harambat *et al.* 2012).

Quando falamos de nefrotoxicidade, há várias categorias de medicamentos: os nefrotóxicos para rins maduros; os nefrotóxicos para rins em desenvolvimento e os considerados seguros para uso durante a gestação, sem evidências de influência negativa no desenvolvimento renal até o momento. Infelizmente, faltam informações sobre o efeito tóxico de muitos medicamentos vendidos livremente sem receita e seus potenciais efeitos colaterais quando associados a outra medicação.

Diferentemente dos humanos, ratos e camundongos têm apenas 20% dos néfrons maduros ao nascimento. A nefrogênese estende-se até 7 a 10 dias de idade. Camundongos e ratos no período neonatal são, portanto, comparáveis aos humanos nascidos prematuramente em relação ao estágio de desenvolvimento renal, sendo um modelo apropriado para estudar os efeitos dos medicamentos na nefrogênese (Frazier 2017).

Muitas medicações foram testadas durante o desenvolvimento fetal e consideradas seguras, no entanto, o espectro de anomalias congênitas do rim e trato urinário é muito amplo, a estimativa do número de néfrons dificilmente é realizada e o tamanho renal é apenas um marcador bruto (Bertram 2001; Luyckx and Brenner 2010;

Sasaki, Tsuboi, Kanzaki *et al.* 2019; Sasaki, Tsuboi, Okabayashi *et al.* 2019). Desta forma, nenhuma droga, até onde sabemos passou por uma avaliação completa para ser considerada definitivamente segura para uso durante o desenvolvimento renal.

A alteração do desenvolvimento renal pode levar a anomalias congênitas do rim e do trato urinário, sendo necessárias pesquisas sobre os efeitos do uso materno de medicamentos sobre o desenvolvimento renal da prole. Portanto, esse estudo pretende investigar os efeitos do PAR em rins de ratos (gestantes e prole) no que diz respeito à sua funcionalidade e estrutura, bem como avaliar os marcadores de estresse oxidativo nos rins dos filhotes.

### 3. OBJETIVOS

#### **Geral**

Investigar, em ratos, se a exposição materna ao PAR durante a gestação e amamentação altera a função ou a estrutura renal, bem como marcadores de estresse oxidativo no rim de filhotes machos e fêmeas.

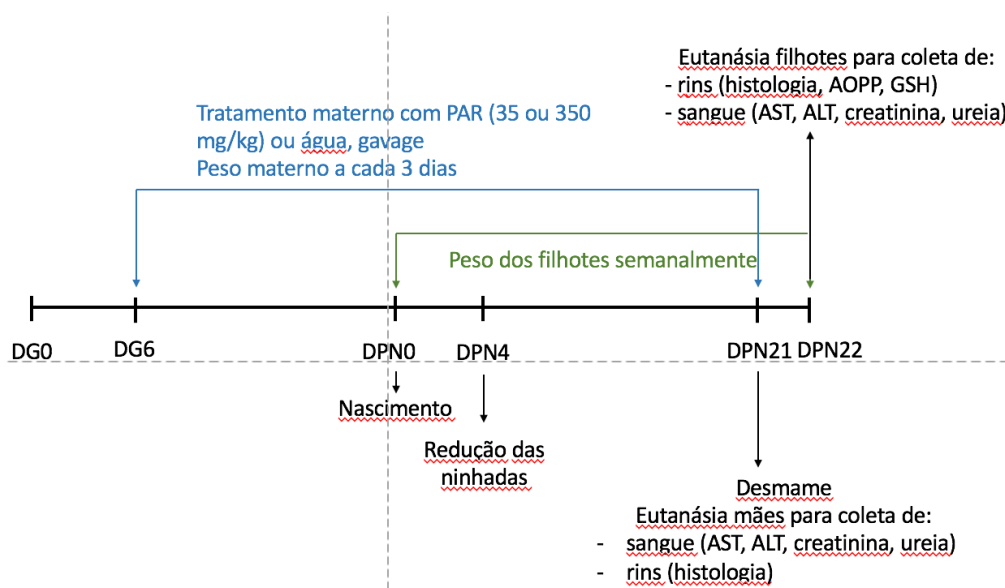
#### **Específicos**

- a) Avaliar se a exposição ao PAR durante a gestação e amamentação induz toxicidade geral para a reprodução (ganho de peso da mãe e dos filhotes, duração da gestação, número de filhotes nascidos vivos, ganho de peso da prole).
- b) Quantificar marcadores séricos de função hepática (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) e renal (creatinina e ureia) nas mães e em filhotes machos e fêmeas com 22 dias de idade expostos ao PAR durante a gestação e amamentação e no correspondente grupo controle.
- c) Avaliar a estrutura renal após coloração com hematoxilina e eosina e ácido periódico - Schiff nas mães e em filhotes machos e fêmeas com 22 dias de idade expostos ao PAR durante a gestação e amamentação e no correspondente grupo controle.
- d) Avaliar se a exposição ao PAR durante a gestação e amamentação induz apoptose no rim das mães através de imunohistoquímica para a enzima caspase-3.
- e) Quantificar marcadores de estresse oxidativo (glutaciona reduzida e produtos avançados de oxidação proteica) no rim de filhotes machos e fêmeas com 22 dias de idade expostos ao PAR durante a gestação e amamentação e no correspondente grupo controle.
- f) Avaliar se a exposição ao PAR durante a gestação e amamentação afeta os marcadores acima descritos diferencialmente em filhotes machos e fêmeas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### Delineamento experimental

O delineamento experimental está esquematizado abaixo, na Figura 3.



**Fig.3:** Esquema do delineamento experimental. PAR: paracetamol; DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; AOPP: produtos avançados de oxidação proteica; GSH: glutatona reduzida; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase.

### Procedimentos

Todos os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolos CEUA 7900.2017.82 e 22993.2017.75).

#### *Animais, tratamento e procedimentos perinatais*

Ratos da linhagem Wistar foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e aclimatados no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, UEL, com temperatura em  $22^{\circ}\text{C}\pm 2$ , ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas às 6:00AM), água e ração à vontade.

Após 1 semana de habituação, um rato foi colocado em uma gaiola com duas ratas virgens durante a noite. Na manhã seguinte, foi realizado esfregaço vaginal e, se constatada presença de espermatozóides e a fase estro do ciclo estral, a rata foi considerada prenhe e este dia denominado dia gestacional 0 (DG0).

O PAR (Tylenol<sup>®</sup>, comprimidos) foi macerado, suspenso em água e administrado por gavagem diariamente, do DG6 até o desmame (dia pós natal – DPN – 21) nas doses de 35 (n=13) ou 350mg/kg (n=14). O grupo controle (n=14) recebeu apenas água via gavagem. A dose mais baixa representa uma extrapolação da dose de 500 mg/dia em humanos (65 Kg) após ajuste dosimétrico para considerar a variabilidade interespecie (USEPA 2006). A dose mais alta representa a adição de um fator de segurança de 10 para considerar a variabilidade intra-espécie (Nielsen *et al.* 2008). O início do tratamento no DG6 foi escolhido para se evitar possíveis efeitos da droga no período de implantação, conforme orientações de guias internacionais (OECD 2007).

No DPN4, as ninhadas foram reduzidas para 10 filhotes mantendo, sempre que possível, 5 animais de cada sexo. Ninhadas com menos de 8 filhotes foram descartadas. Essa padronização de ninhadas é importante para minimizar possíveis efeitos da oferta de leite e cuidado materno com a prole. O peso dos filhotes foi acompanhado semanalmente. No DPN21 as mães foram eutanasiadas e os filhotes, desmamados.

Neste trabalho a ninhada foi a unidade experimental, ou seja, apenas um animal de cada sexo de cada ninhada foi utilizado para cada procedimento. Os filhotes foram distribuídos entre esse estudo e um outro estudo delineado para avaliar marcadores comportamentais e neuroquímicos e, por isso, o número de animais para cada análise pode não ser o mesmo do número de ninhadas.

#### *Indicadores de toxicidade geral reprodutiva*

As ratas foram pesadas a cada 3 dias durante todo o período de tratamento e os filhotes foram pesados ao nascimento e semanalmente até o desmame.

No dia do nascimento (DPN0), o número de filhotes em cada ninhada foi contado e a sexagem, realizada.

#### *Indicadores séricos de função hepática e renal*

O sangue coletado das mães (DPN 21) e dos filhotes (DPN 22) após decapitação foi centrifugado (Jouan, 3000 rpm, 15 min, 4°C) e mantido em freezer -80 °C (Panasonic) até o dia da análise.

As concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina foram quantificadas em um analisador

bioquímico automatizado (Dimension®RxL, Siemens Health Care, USA), utilizando kits Siemens e seguindo as recomendações do fabricante.

#### *Histopatologia e imunohistoquímica renal*

O rim esquerdo isolado das mães (DPN 21) e dos filhotes (DPN 22) foi fixado em solução tamponada de formol 10% por 48 horas e depois mantida em álcool 70% até a inclusão em parafina. Os rins de 7 animais de cada grupo foram selecionados ao acaso e cortados das regiões cortical e medular renal utilizando-se um criostato (CM1520, Leica Biosystem, Richmond, IL, USA) na espessura de 5 µm e os mesmos foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e ácido periódico - Schiff (PAS). Os cortes corados foram examinados em ampliações de 40x e 100x e pontuados por um patologista e um experimentador, utilizando um microscópio óptico Nikon E-200. Uma análise semi-quantitativa das lesões do tecido renal foi realizada em 10 campos de alta potência (HPF), em seleção aleatória como descrito previamente (Fattori *et al.* 2017; Borghi *et al.* 2018). A pontuação histopatológica total foi obtida considerando as alterações morfológicas observadas em: 1) glomérulos; 2) lesão da borda em escova nas zonas cortical e medular; 3) presença de vacúolos nas células tubulares; e 4) degeneração das células tubulares epiteliais. O grau de lesão renal foi classificado em uma escala de 0–3 (0: normal, 1: leve, 2: moderado, 3: severo) e os resultados apresentados como a pontuação histopatológica total. A maior pontuação possível foi 12.

No rim materno também foi realizada imunohistoquímica para caspase-3, como marcador de apoptose. O estudo imunohistoquímico dos rins foi realizado em cortes histológicos de 5 µm de espessura, suspensos em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada em banho maria com as lâminas submersas em solução tampão citrato (pH 6) durante 20 minutos, após o resfriamento das lâminas em temperatura ambiente (por pelo menos 20 minutos). Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 10% durante 30 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos e novamente bloqueada com leite mólico a 5% por 10 minutos. Foram utilizados o anticorpo anti-caspase-3 clivada (ASP175) de coelho Cell Signaling Technology (Catálogo 9664S). O anticorpo primário foi aplicado diluído 1:200 em soroalbumina bovina (BSA) a 1% na concentrações referida acima, sendo incubado por 22 horas pernoite em câmara úmida a 4 °C. Em seguida, foi lavado em solução salina tamponada de fosfatos (PBS, pH 7,2) duas vezes por 5 minutos e posteriormente adicionado o anticorpo secundário, o polímero (polydector) e incubado por 30 minutos

e novamente lavado com PBS duas vezes por 5 minutos. A reação final foi revelada imergindo as lâminas em 3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (DAB) por 3 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas pela hematoxilina de Harris por 2 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando lamínulas e entellam. Foi utilizado controle positivo para caspase-3 e controle negativo, onde o anticorpo primário foi retirado na reação.

As lâminas da reação imunohistoquímica dos rins dos animais, foram avaliadas em microscópio óptico (Nikon E-100) quanto à morfologia dos tecidos e fotografadas com uma câmera (CCD – Samsung), acoplada ao microscópio. Para a quantificação da imunohistoquímica no tecido renal, escolheu-se a área de maior positividade dos anticorpos, a qual foi fotografada no aumento de 40x. Utilizando método de morfometria computadorizada, foi realizada extração da coloração de fundo (*background*), cálculo de área total do tecido e determinação da coloração marrom (DAB/peroxidase) para captura de imagem contendo células com imunomarcagem positiva, quantificada em pixels (programa Image J). Foi realizado o cálculo da área marcada relativa à área total e os valores foram expressos em porcentagem de pixels (pixels das células positivas/pixel total do tecido).

#### *Indicadores de estresse oxidativo renais*

O rim direito de cada filhote foi isolado e congelado em freezer -80 °C (Panasonic) até o dia da análise. A quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foi realizada em homogenatos renais. Para obtenção desses homogenatos, os rins foram macerados com um homogeneizador tipo Potter na presença de tampão fosfato salina (20 mL para cada g de tecido). Esse homogenato foi centrifugado (Jouan, 10.000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para quantificação dos marcadores.

##### a) GSH

A GSH foi quantificada de acordo com a técnica descrita por Anderson (Anderson 1985). Trata-se de um método colorimétrico no qual se determina, em uma leitora de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer, EUA), o decréscimo de absorvância promovido pela oxidação do NADPH durante a redução da glutathiona oxidada pela glutathiona redutase. A leitura foi realizada em 412nm, a 25°C.

##### b) AOPP

AOPP foi quantificado de acordo com a técnica descrita por Hanasand (Hanasand 2012). Trata-se de um método colorimétrico no qual se determina, em uma leitora de microplaca (EnSpire, Perkin Elmer, EUA), a quantidade de proteínas oxidadas (cromóforos). A leitura foi realizada em 340nm, a 25°C.

### *Análise estatística*

Todos os dados foram submetidos a uma análise exploratória para avaliação da normalidade da distribuição (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância (teste de Levene) entre os grupos. Se os critérios foram atingidos ( $p > 0,01$ ), análises paramétricas foram conduzidas. Os parâmetros que não atingiram os critérios (i.e., AOPP e ureia nos filhotes) foram transformados para logaritmo nesperiano (Ln) e novamente testados. Nova falha em atingir os critérios determinou o uso análise não paramétrica.

As seguintes análises foram utilizadas:

- Análise de variância (ANOVA) complementada com Bonferroni: número de filhotes, concentrações séricas maternas de AST, ALT, ureia e creatinina e índice da imunohistoquímica para caspase.
- ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA): ganho de peso das mães e filhotes.
- ANOVA fatorial: AST, ALT, creatinina, GSH e AOPP (como LnAOPP) nos filhotes. Os fatores considerados foram exposição materna e sexo do filhote.
- Kruskal-Wallis: ureia nos filhotes, índices das análises histológicas dos rins dos filhotes e mães.

As análises foram realizadas no programa IBM-SPSS Windows versão 22. Foi adotado nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para o estabelecimento das conclusões.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, os Resultados e a Discussão estão apresentados como artigo científico. O mesmo foi formatado para submissão para o periódico *Reproduction, Fertility and Development*, cujas regras de formatação podem ser acessadas em: <http://www.publish.csiro.au/rd/forauthors/AuthorInstructions>.

RENAL EVALUATION IN THE OFFSPRING OF RATS MATERNALLY EXPOSED TO  
PARACETAMOL

Andréa Morgato de Mello Miyasaki<sup>1,2</sup>, Camila Rigobello<sup>2</sup>, Rodrigo Moreno Klein<sup>2</sup>,  
Jefferson Crespigio<sup>3</sup>, Karina Keller Flaiban<sup>4</sup>, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro  
Bracarense<sup>4</sup>, Décio Sabbatini Barbosa<sup>2</sup>, Estefânia Gastaldello Moreira<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics and Pediatrics Surgery, Universidade Estadual de Londrina  
(UEL), 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

<sup>2</sup>Graduate Program in Health Sciences, UEL, 86051-980, Londrina, Parana, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pathology, UEL, 86057-970, Londrina, Parana, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine, UEL, 86057-970, Londrina, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Physiological Sciences, UEL, 86057-970, Londrina, Parana, Brazil.

\*Corresponding author: [egmoreira@uel.br](mailto:egmoreira@uel.br)

Depto de Ciências Fisiológicas, CCB

UEL - Campus Universitário

86057-970 - Londrina-PR-Brazil

Phone: +55 43 3371 4307

## SUMMARY TEXT AND IMAGE FOR THE TABLE OF CONTENTS

Paracetamol (PAR) is the first-choice analgesic and antipyretic during the gestational and breastfeeding periods. This study investigated, in rats, whether maternal exposure to PAR during these periods alters renal function, structure and oxidative stress markers in pups. It was observed that PAR increases the seric level of AST in dams and the renal tissue level of GSH in pups, suggesting the need of studies to certify the safety use of PAR during pregnancy and breastfeeding.

## ABSTRACT

Paracetamol (PAR) is one of the few drugs released for use throughout the gestational and lactational periods. PAR passages through the placental barrier and is excreted into the breast milk, thus, it may impact the development of the foetus and/or neonate. This study evaluated possible nephrotoxic effects in rat dams and pups exposed to PAR during pregnancy and lactation. Dams were gavaged daily with PAR (35 or 350 mg/kg) or water (control, CON) from gestational day 6 to weaning (postnatal day 21). Dams and pups were euthanized at weaning and tissues were collected for biochemical (seric concentration of AST, ALT, urea and creatinine; renal concentration of glutathione -GSH- and advanced oxidation protein products) and renal histopathology. Compared to CON, PAR (350 mg/kg) exposed pups presented increased levels of renal GSH whereas dams exposed to both doses presented increased levels of AST. PAR treatment did not influence parameters of general toxicity. In conclusion, our results suggest that maternal exposure to human relevant doses of PAR is not associated with hepato or nephrotoxicity in the pups or dams. Noteworthy is that this exposure was not devoided of effects. It induced an adaptative antioxidant response in the pups' kidneys and impacted the maternal seric activity of AST. Studies are needed to further investigate the origin of this increased AST.

Key words: acetaminophen, pregnancy, in utero, renal injury, rats

## INTRODUCTION

Paracetamol (PAR) is the most used over-the-counter analgesic and antipyretic medication in the world (Thiele et al. 2013). Studies have identified its use in 20-75% of pregnant women (Werler et al. 2005). This frequent use is due to its effectiveness as antipyretic and analgesic as well as because PAR is generally recognized as a safe medication during the three trimesters of pregnancy.

PAR and phenacetin are derivatives of acetanilide. In the past, phenacetin, which is now out of the market, was used indiscriminately and caused many severe chronic intoxications, mainly in the kidney, with a high incidence of renal papillary necrosis (Burry 1972; Murray 1972). In 1948, Brodie and Axelrod demonstrated that the major metabolite responsible for the analgesic action of acetanilide and phenacetin was PAR (Brodie and Axelrod 1948), which came to the market in mid-1950s and rapidly gained popularity worldwide (Bertolini et al. 2006).

PAR crosses the placental barrier (Bertolini et al. 2006) and is excreted in the breast milk (Notarianni et al. 1987) indicating that the maternal use of this drug results in fetal/neonatal exposure to PAR. Since 2003, studies have been describing an association between maternal use of PAR and neurodevelopmental disorders (attention deficit and autism spectrum) in the descendants (Torres 2003; Klein *et al.* 2020). However, since there are conflicting results in the literature and the studies are all epidemiological (which do not allow causal relationship), the regulatory agencies worldwide did not change the recommendation for its use during pregnancy and lactation so far.

Considering the importance of animal models to establish causal relationship, we have established a rat model of maternal exposure to clinical relevant doses of PAR and have been investigating possible consequences on different systems of the offspring. So far, we have reported that maternal exposure to PAR: a) induced some behavioural

alterations in weaned rats that may be relevant for neurodevelopmental disorders (Klein et al. 2020); b) impacted some markers of reproductive development as well as the sexual behaviour of adult male (Pereira et al. 2020) and female (Aleixo 2019) pups.

In the present manuscript we describe the evaluation of renal (seric concentration of creatinine and urea, histopathology) and liver (seric concentration of alanine and aspartate aminotransferases) status markers both in weaned pups and in their dams treated with PAR during gestation and lactation. Moreover, in the pups` kidney we also evaluated two oxidative stress markers: advanced oxidation protein products, which have been shown to be a good renal prooxidant marker (Witko-Sarsat *et al.* 1996; Hamid *et al.* 2012) and glutathione, which is the main antioxidant molecule that detoxify the reactive paracetamol metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI).

The evaluation of a possible impact of maternal exposure to PAR on the kidney morphology and function of the offspring is relevant considering that this drug has the potential to induce renal lesion (Mour et al. 2005; Stern et al. 2005) due to oxidative stress mechanisms (Eguia and Materson 1997; Mour et al. 2005; Mazer and Perrone 2008). Moreover, it is noteworthy that in this work the dams were treated during both gestation and lactation periods because in rats the nephrogenesis ends by postnatal day 7-10 (Frazier 2017), whereas in humans it ends by the 36th week of pregnancy.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals and treatment**

Male and female Wistar virgin rats derived from the Central Vivarium of the State University of Londrina were mated overnight in cages containing 1 male and 2 females. Gestational day 0 (GD0) was determined through vaginal smear the next morning, by the presence of spermatozoa. On GD6 females were allocated to separate cages and started being gavaged daily with water (control or CON, n=14) or PAR (Tylenol®,

Johnson & Johnson, Brazil) in the doses of 35 mg/Kg (PAR35, n=13) or 350 mg/Kg (PAR350, n=14). Treatment lasted until weaning (i.e., postnatal day – PND – 21), when the dams were decapitated. Dams were weighed every 3 days in order to adjust dosing. PAR lower dose (i.e., P35) represents a dosimetric adjustment of the dose of 500mg/day in humans (65 kg) whereas for the higher dose (i.e., P350) it was added a security factor of 10 considering intraspecies variability (USEPA 2006; Nielsen et al. 2008).

On the day of birth (PND0) the pups were counted and the litter, weighed. On PND4, litters were culled to 10 pups (5 males and 5 females whenever possible). Litters with less than 8 pups were discarded. Litters were weighed weekly until weaning.

In this work, the litter was the experimental unit, i.e., littermates were not used in the same analysis. Whenever possible, we used 1 couple of pups from each litter. Exceeding animals were used in another work aimed to evaluate neurobehavioral and neurochemical endpoints.

Animals were kept under controlled temperature ( $21 \pm 2$  °C), 12h light/dark cycle (lights on at 6:00 AM) and with free access to tap water and rat chow (Nuvital™, Nuvilab CR1, Paraná, Brazil).

All the experimental protocols were approved by the State University of Londrina Ethics Committee for Animal Research (protocols 7900.2017.82 and 22993.2017.75).

### **General reproductive toxicity**

The rats were weighed each 3 days throughout the treatment period and pups were weighed until birth and weekly until weaning.

On the day of birth (PND0), the number of pups in each litter was counted and sexed.

### **Assessment of liver and renal function**

Blood samples collected from dams (PND 21) and pups (PND 22) after decapitation were centrifuged (Jouan, 3,000 rpm, 15 min, 4°C) and kept in a -80 °C freezer (Panasonic) until the day of analysis.

Serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine concentrations were quantified on an automated biochemical analyser (Dimension®RxL, Siemens Health Care, USA).

### **Renal histopathology and immunohistochemistry (IHC)**

For these analysis, 7 animals from each group and each sex were randomly selected.

The left kidney isolated from dams (PND 21) and pups (PND 22) was fixed in 10% formalin buffered solution for 48 h and then kept in 70% ethanol solution until paraffin embedding. Sections of 5 µm from cortical and medullary renal regions were obtained using a cryostat (CM1520, Leica Biosystem, USA) and stained with hematoxylin & eosin (H&E) and periodic acid-Schiff (PAS). Both stained sections were examined at 40x and 100x magnification and independently scored by two blind individuals (one pathologist and one experimenter) under light microscopy. A semi-quantitative evaluation of renal tissue damage was estimated in 10 high power fields (HPF) selected aleatory as described previously (Fattori et al. 2017; Borghi et al. 2018). The total histopathological score was assayed considering morphological alterations in the: 1) glomerulus; 2) impairment of brush border in cortical and medullar zones; 3) the presence of vacuoles in tubular cells; and 4) degeneration of epithelial tubular cells. The degree of renal damage was classified on a scale of 0–3 (0: normal, 1: mild, 2: moderate, 3: severe) and results presented as the total histopathological score. The highest possible total score was 12.

As PAR treatment may activate caspases 9 and 3 in renal tubular epithelial cells (Lorz et al. 2004), IHC for caspase-3 was performed in the dam's kidney as a marker of apoptosis. The immunohistochemical study of the kidneys was performed in 5µm thick histological sections suspended on silanized slides. Antigen retrieval was performed in a water bath with slides submerged in citrate buffer (pH 6) for 20 min, after cooling the slides at room temperature (for at least 20 min). Endogenous peroxidase was blocked using 10% hydrogen peroxide for 30 min, rinsed in running water for 10 min and again blocked with 5% non-fat powder milk for 10 min. Rabbit anti-caspase-3 cleaved antibody (ASP175) was used (Cell Signaling Technology, USA, Catalog 9664S). The primary antibody was applied diluted 1:200 in 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated in a humid chamber at 4°C for 22 h. It was then washed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) twice for 5 min and then the secondary antibody (PolyDetector) was added and incubated for 30 min and again washed with PBS twice for 5 min. The final reaction was revealed by immersing the slides in 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 3 min. Next, the slides were washed in running water and counterstained by Harris hematoxylin for 2 min, dehydrated at increasing alcohol concentrations, immersed in xylol and mounted using coverslips and Entellam. It was used positive control for caspase-3 and negative control, where the primary antibody was removed from the reaction.

The slides were evaluated under optical microscope (NIKON E-100) and photographed with a camera (CCD - Samsung), attached to the microscope. To quantify the immunostaining, the area of highest antibody positivity in each section was photographed at 40x magnification. The software Image J (National Institutes of Health, USA) was used for background extraction, total tissue area calculation and brown staining determination. Cells with positive immunostaining were quantified in pixels. Marked area relative to total area was calculated and values were expressed as percentage of pixels (positive cell pixels / total tissue pixels).

### **Renal oxidative stress**

The right kidney of each pup was isolated on PND 22 and frozen at -80°C until the day of analysis. Quantification of reduced glutathione (GSH) and advanced protein oxidation products (AOPP) was performed in renal homogenates. To obtain these homogenates, the kidneys were macerated with a Potter-type homogenizer in the presence of PBS (20 mL for each g of tissue). This homogenate was centrifuged (10,000 rpm, 20 min, 4 °C) and the supernatant used to quantify the markers.

The GSH was quantified according to the technique described by Anderson (Anderson 1985). This is a colorimetric method in which a decrease in absorbance promoted by NADPH oxidation during the reduction of glutathione oxidized by glutathione reductase is determined in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) at 412nm and 25°C.

AOPP was quantified according to the technique described by Hanasand (Hanasand 2012). It is a colorimetric method in which the amount of oxidized proteins (chromophores) is determined in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) at 340nm and 25°C.

### **Statistical analysis**

Initially, data were submitted to an exploratory analysis of normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Levene's test). If the criteria were reached ( $p > 0.01$ ) parametric tests were conducted. Data that did not reach homogeneity or normality underwent Ln transformation, and were retested. If the criteria failed again, the non-parametric test of Kruskal-Wallis was employed. We used one-way ANOVA complemented with Bonferroni to analyse the number of pups per litter, the maternal seric levels of AST, ALT, creatinine and urea and the immunohistochemistry score for caspase. We used repeated measures ANOVA- RMANOVA - to analyse maternal and

offspring body weight gain. Since in RMANOVA the data did not pass the criterion of sphericity, we used the statistical values (degrees of freedom and F) corrected by Greenhouse-Geisser's test. Two-way ANOVAs were used to analyse the data from pups (seric levels of AST, ALT, and creatinine as well as renal concentration of GSH and AOPP – as LnAOPP). The factors considered were sex and maternal exposure (i.e., CON, PAR35 or PAR350). Urea and the parameters from the histopathological analysis of the kidneys were evaluated by Kruskal Wallis.

We used the IBM-SPSS Windows version 22 to analyse the data. Conclusions were established with  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **General toxicity**

From the 41 litters, 1 CON and 1 PAR35 were excluded because were smaller than 8 pups.

Dams' body weight is presented in Fig. 1A. RMANOVA indicated an effect of time on dams' body weight [ $F(5.26; 173.91) = 252.90$ ,  $p = 0.000$ ] reflecting the changes that are expected to occur during gestation and lactation. There was no interaction between treatment and time of evaluation [ $F(10.253; 189.47) = 0.807$ ,  $p = 0.628$ ] indicating that the changes in weight were similar through the experimental period for the 3 groups. However, as can be seen in Fig. 1A, dams from the CON group were heavier than dams from both PAR groups during the entire experiment, i.e., even before the beginning of treatment (GD0). This difference was significant as indicated by RMANOVA [ $F(2; 36) = 7.28$ ,  $p = 0.002$ ] complemented with Bonferroni test.

ANOVA indicated that the number of pups per litter did not differ among the groups [ $F(2; 38)=0.06$ ,  $p= 0.94$ ] and the means  $\pm$  SD for CON, PAR35 and PAR350 groups were, respectively,  $12.23 \pm 2.83$ ;  $12.17 \pm 1.47$  and  $11.93 \pm 2.56$  pups.

For pups' body weight in the first three weeks of life (Fig. 1B), RMANOVA also indicated an effect of time of evaluation [ $F(1.36; 42.01)= 2767.78$ ,  $p= 0.000$ ] which did not interact with exposure to PAR [ $F(2.71; 42.01)= 1.26$ ,  $p= 0.30$ ].

No clinical signs of toxicity such as piloerection, tearing or tremors in the dams or pups were observed at any time.

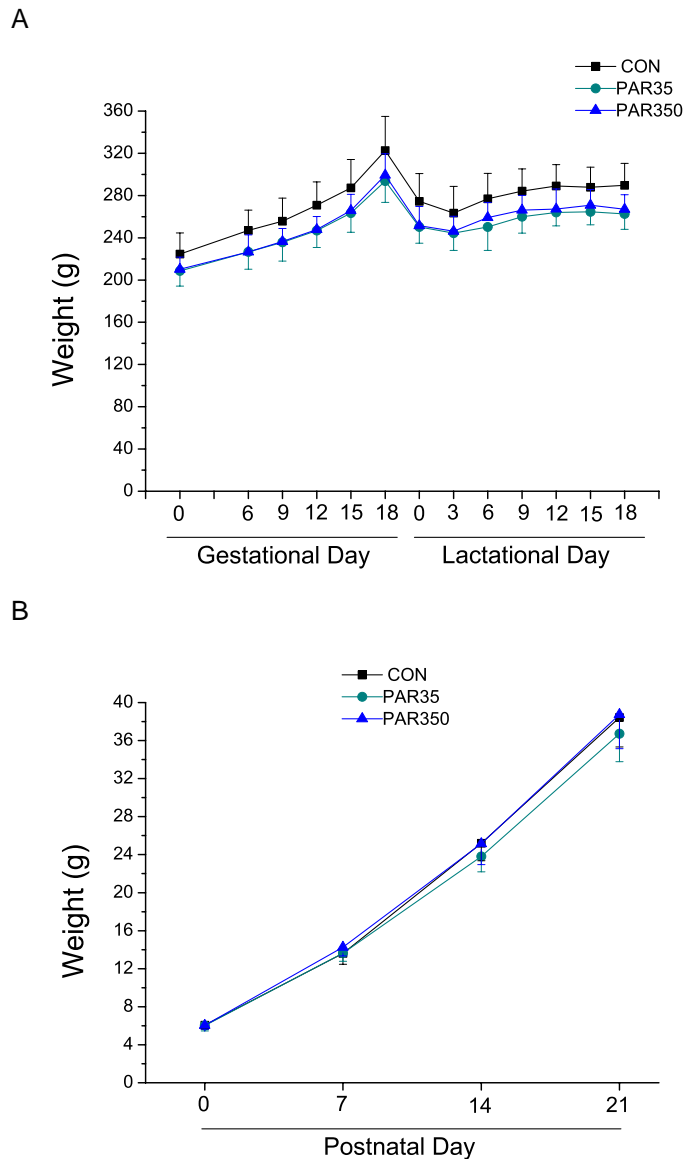


Fig. 1. Dams' body weight during gestation and lactation (A) and litter weight (male and female pups combined) divided by the number of pups in the litter during the first three weeks of life (B). Data are means  $\pm$  SD ( $n=12-13$ ). In A, RMANOVA complemented with Bonferroni indicated that PAR treatment did not influence weight gain of dams ( $p>0.05$ ) even though CON dams were heavier from the beginning ( $p<0.05$ ). In B, RMANOVA indicated that PAR exposure did not influence weight gain of pups ( $p>0.05$ ).

### Seric biomarkers of hepatic and renal functions in dams

In dams, PAR treatment did not influence seric concentration of urea [F(2; 37)= 0.23, p= 0.80] and creatinine [F(2; 37)= 0.54, p= 0.59] as well as ALT activity [F(2; 36)= 1.99, p= 0.15]. For AST, ANOVA complemented with Bonferroni indicated that both doses of PAR increased this marker [F(2; 36)= 5.13, p= 0.01] (Table 1) when compared to CON group.

Table 1. Seric biomarkers of hepatic and renal functions in dams treated (PAR) or not (CON) with paracetamol.

	CON (n=13)	PAR35 (n=12)	PAR350 (n=13)
AST (U/L)	176.33 ± 23.45	245.33 ± 74.88*	231.54 ± 57.00*
ALT (U/L)	137.92 ± 28.57	163.08 ± 34.24	152.69 ± 23.73
Urea (mg/dL)	81.77 ± 11.35	78.42 ± 10.61	80.38 ± 14.58
Creatinine (mg/dL)	0.288 ± 0.097	0.325 ± 0.076	0.298 ± 0.101

Data are means ± SD. \* p<0.05 compared to CON (ANOVA complemented with Bonferroni). AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CON: control group; PAR35: group treated with 35mg/kg of paracetamol; PAR350: group treated with 350mg/kg of paracetamol.

### Seric biomarkers of hepatic and renal functions in pups

In pups (Table 2), two-way ANOVA indicated that PAR exposure did not influence seric concentration of creatinine [F(2; 56)= 0.33, p= 0.72] or activities of ALT [F(2; 56)= 0.04, p= 0.96] and AST [F(2; 55)= 1.04, p= 0.36]. Urea was evaluated by Kruskal-Wallis, which also revealed lack of PAR influence on this marker [H(2)= 3.00, p= 0.22]. There was no effect of sex or interaction between sex and exposure (p>0.05)

Table 2. Seric biomarkers of hepatic and renal functions in pups exposed (PAR) or not (CON) to paracetamol.

	CON		PAR35		PAR350	
	Female (n=9)	Male (n=10)	Female (n=9)	Male (n=9)	Female (n=9)	Male (n=10)
Urea (mg/dL)	49.33 ± 8.88	50.40 ± 13.07	46.33 ± 6.00	46.11 ± 9.71	50.11 ± 3.89	49.2 ± 5.43
Creatinine (mg/dL)	0.067 ± 0.087	0.090 ± 0.099	0.070 ± 0.067	0.122 ± 0.083	0.089 ± 0.092	0.110 ± 0.088
AST (U/L)	425.78 ± 65.92	393.40 ± 147.98	366.70 ± 81.21	382.67 ± 81.67	393.67 ± 172.32	332.22 ± 64.69
ALT (U/L)	90.78 ± 11.86	86.20 ± 28.50	88.70 ± 13.57	84.00 ± 15.02	92.11 ± 34.06	82.20 ± 22.44

Data are means ± SD and were analysed by two-way ANOVA except for urea data, which were analysed by Kruskal-Wallis.  $p > 0.05$ . AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CON: control group; PAR35: group exposed to 35mg/kg of paracetamol; PAR350: group exposed to 350mg/kg of paracetamol.

### Histopathological analysis of dams' kidneys

Total histopathological scores for renal damage after staining with HE and PAS are presented in Table 3. Kruskal-Wallis indicated that treatment with PAR did not induce renal damage in the dams [HE:  $H(2, 21) = 0.92$ ,  $p = 0.63$ ; PAS:  $H(2, 21) = 3.52$ ,  $p = 0.17$ ]. Lack of difference among groups was also indicated by ANOVA regarding the immunostaining for caspase [ $F(2; 19) = 0.11$ ,  $p = 0.89$ ]. Fig. 2 shows representative sections stained with HE, PAS and immunostained for caspase.

Table 3. Total histopathological scores for renal damage in dams treated (PAR) or not (CON) with paracetamol and number of dams that presented any type of lesion (prevalence).

	CON (n=7)	PAR35 (n=7)	PAR350 (n=7)
<b>HE STAINING</b>			
Score	1.0 (0.13-2.45)	1.0 (0.24-1.76)	1.0 (0.26-1.17)
Prevalence	6/7	5/7	5/7
<b>PAS STAINING</b>			
Score	2.0 (1.93-2.92)	3.0 (2.31-3.98)	2.0 (0.69-3.31)
Prevalence	7/7	7/7	6/7
<b>CASPASE IHC</b>			
Score	10.68 ± 3.64	11.46 ± 3.52	12.96 ± 3.14

Score data from HE and PAS staining are medians (confidence interval 95) and were analysed by Kruskal-Wallis whereas score data from caspase immunohistochemistry are means and SEM and were analysed by ANOVA ( $p > 0.05$ ). HE: hematoxylin & eosin; PAS: periodic acid-Schiff; IHC: immunohistochemistry; CON: control group; PAR35: group treated with 35mg/kg of paracetamol; PAR350: group treated with 350mg/kg of paracetamol.

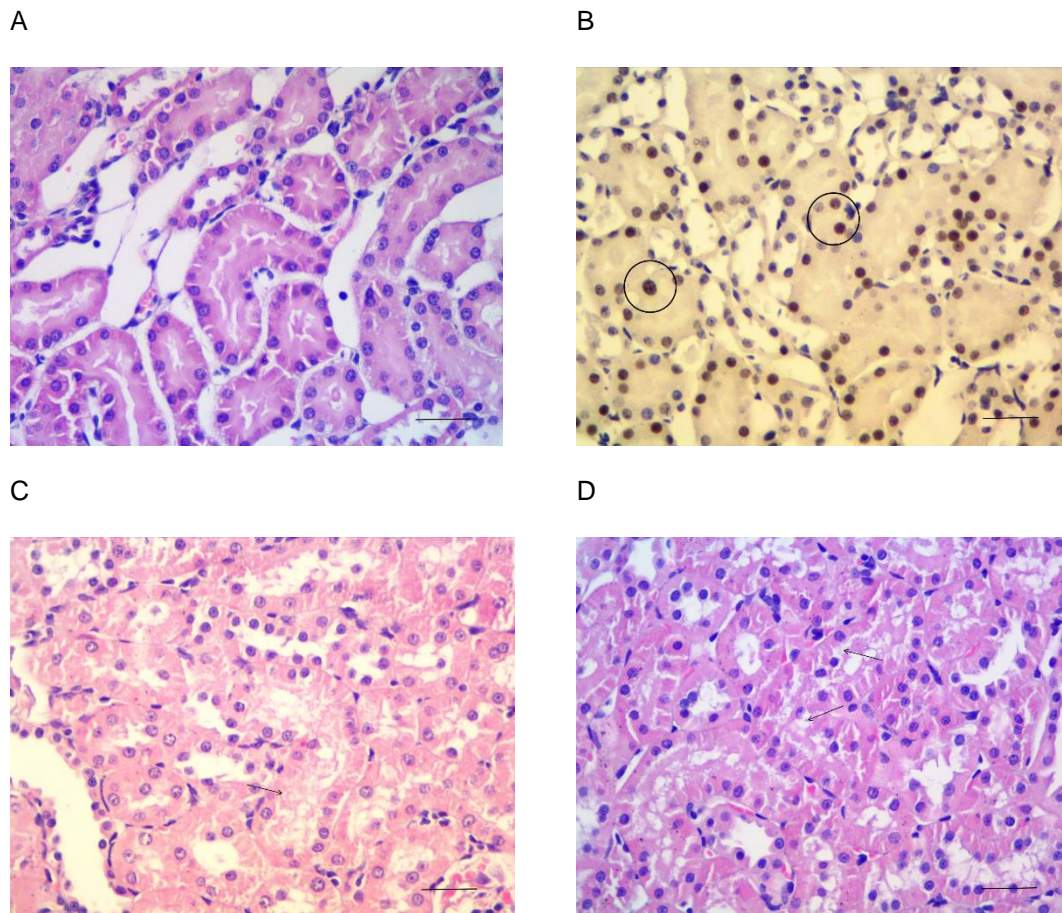


Fig. 2: Representative sections (magnification 400x) of dams' kidney stained with HE (A) or immunostained for caspase-3 (B, circles indicate the nucleus immunostaining). Independently of treatment, loss of brush border (C) and cytoplasmic vacuolization (D) were observed in some animals (indicated by the arrows). Scale=5  $\mu$ m

### Histopathological analysis of pups' kidneys

Total histopathological scores for renal damage in male and female pups after staining with HE and PAS are presented in Table 4. Tubular cell vacuolization and loss of brush border in the cortical tubules were observed in some animals from the 3 groups and Kruskal-Wallis test indicated that the scores among the groups were similar [HE:  $H(5, 42) = 9.86, p = 0.08$ ; PAS:  $H(5, 42) = 3.89, p = 0.57$ ]. Fig. 3 shows a representative section stained with HE.

Table 4. Total histopathological scores for renal damage in male and female pups exposed (PAR) or not (CON) to paracetamol and number of pups that presented any type of lesion (prevalence).

	CON	PAR35	PAR350
<b>HE STAINING</b>			
Male score	0 (-0.30-1.16)	0 (0.00-0.00)	1.0 (0.08-1.07)
Male prevalence	2/7	0/7	4/7
Female score	1.0 (0.24-1.76)	0 (-0.17-0.74)	1.0 (0.08-1.07)
Female prevalence	5/7	2/7	4/7
<b>PAS STAINING</b>			
Male score	1.0 (0.03-1.69)	1.0 (0.24-1.76)	2.0 (0.13-2.44)
Male prevalence	4/7	4/7	4/7
Female score	2.0 (0.52-2.62)	2.0 (0.59-3.40)	1.0 (0.01-2.56)
Female prevalence	5/7	5/7	5/7

Score data are medians (confidence interval 95) of 7 animals of each sex in each group and were analysed by Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ). HE: hematoxylin & eosin; PAS: periodic acid-Schiff; CON: control group; PAR35: group exposed to 35mg/kg of paracetamol; PAR350: group exposed to 350mg/kg of paracetamol.

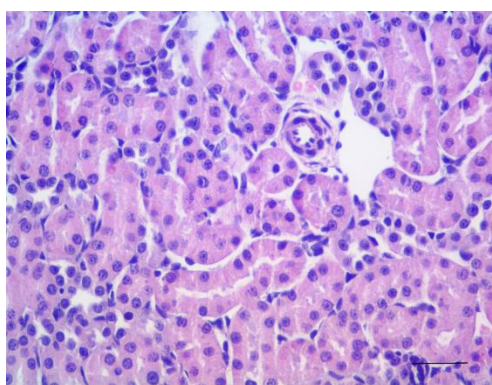


Fig. 3: Representative image of offspring's kidney (HE, magnification 400x). Scale=5  $\mu$ m

### **Renal biomarkers of oxidative stress in pups**

In pups (Table 5), two-way ANOVA indicated that PAR exposure did not influence renal levels of AOPP [F(2; 68)= 1.38, p= 0.26] but it did influence GSH [F(2; 68)= 5.40, p= 0.007]. Bonferroni post-hoc test indicated that pups exposed to 350 mg/kg of PAR presented increased levels of GSH when compared to both CON and PAR35 groups. Sex and the interaction between sex and exposure were not significant (p>0.05) for both markers.

Table 5. Renal biomarkers of oxidative stress in pups exposed (PAR) or not (CON) to paracetamol.

	CON		PAR 35		PAR 350	
	Female (n=13)	Male (n=12)	Female (n=10)	Male (n=11)	Female (n=14)	Male (n=11)
AOPP (nmol/mL)	1126.47 ± 64.92	1328.52 ± 189.68	1286.90 ± 114.59	1505.77 ± 88.24	1143.23 ± 84.21	1447.18 ± 175.09
GSH (umol/g)	90.46 ± 8.67	89.81 ± 7.04	94.72 ± 7.32	97.44 ± 5.95	104.62 ± 7.33*	122.12 ± 6.72*

Data are means ± SEM and were analysed by two-way ANOVA complemented with Bonferroni test. \*p<0.05 compared to CON and PAR35 groups. AOPP: advanced oxidation protein products; GSH: reduced glutathione; CON: control group; PAR35: group exposed to 35mg/kg of paracetamol; PAR350: group exposed to 350mg/kg of paracetamol.

## DISCUSSION

Corroborating studies in which the experimental design involved gavaging pregnant (Axelstad et al. 2014; Dean et al. 2016; Kristensen et al. 2017; Klein et al. 2020; Pereira et al. 2020) or pregnant and lactating (Pereira et al. 2020) rats with similar doses of PAR investigated in the present study, we also did not observe alterations in weight profile of dams or pups or number of delivered pups. These studies indicate that this regimen of exposure to PAR does not induce overt general toxicity to rats. In humans, there is a study reporting that the estimated growth curves of fetal parameters did not differ between women reporting use of any medication containing PAR (n=932) and women with no reported use (n=1359) of it (Smarr et al. 2019).

Paracetamol may induce hepatotoxicity and nephrotoxicity and cytochrome P450s (CYP 450) play an important role in these because they produce the highly reactive metabolite NAPQI. At therapeutic doses of PAR, metabolism through CYPs is not very important because the main metabolizing pathways are glucuronidation and sulfation and the low amount of NAPQI that is produced by CYP is detoxified through conjugation to GSH. Hepato and nephrotoxicity usually occur if the glucuronidation and sulfation pathways are overwhelmed by high doses of PAR or if there is a deficiency in GSH. In these cases, NAPQI accumulates and can lead to cell injury (Bessemers and Vermeulen 2001).

The evaluation of hepatotoxicity and nephrotoxicity markers in the dams at weaning, i.e., after approximately 36 days of treatment (15 days during pregnancy and 21 days during lactation) showed that both doses of PAR significantly increased seric activity of AST in the absence of alterations in ALT, urea and creatinine as well as in histopathology of kidneys. ALT is a more sensitive marker for liver toxicity whereas AST is more diffusely distributed into different organs/tissues, including heart, skeletal muscle, kidneys, brain and red blood cells (Giannini et al. 2005). Moreover, in PAR-induced hepatotoxicity, both enzymes peak but AST returns to normal values twice faster

than ALT (McGovern et al. 2015). Since only AST was altered in our study, it could be indicative of PAR-induced toxicity in another tissue rather than the liver. It possibly does not reflect nephrotoxicity as well because urea and creatinine seric levels were normal and there was no significant alteration in the kidney morphology nor on the number of apoptotic cells. We could not find in the literature other studies that investigated these markers in pregnant and/or lactating rats after exposure to a human relevant dose and route of exposure. In mice, which are more sensitive than rats to PAR toxicity (Eakins et al. 2015), treatment with 150 mg/kg, gavage, from GD7-21 did not alter ALT on GD 18. In a study designed to evaluate hepatic adaptation to PAR toxicity, adult male rats were gavaged with 500, 1000 or 1500 mg/kg PAR for 4 consecutive days (Eakins et al. 2015). It was observed that only the higher dose resulted in increased AST and ALT activities and hepatocellular damage observed on the second day but these alterations were all resolved by the fourth day despite the fact that the animals were still being treated. The mentioned study reinforces that the dose we used was safe for the liver and indicates that even if it had impacted somehow the liver, the process should have been solved after 36 days of treatment. The mechanism of autoprotection to PAR has been reported both in humans and animals and seems to involve alterations in the expression of enzymes that transform PAR to the reactive metabolite NAPQI (e.g. CYP2E1), efflux transporters (e.g. ABCC3 and ABCC4) and proteins that regulate GSH levels, which is the main antioxidant molecule that participate in NAPQI detoxification (for a list of references, please refer to Eakins et al. 2015).

In pups, biochemical and morphological markers of hepato and nephrotoxicity were not influenced by PAR exposure. Interestingly, pups exposed to the higher dose of PAR, i.e., 350 mg/kg, presented increased antioxidant renal defence as indicated by higher levels of GSH when compared to both CON and PAR35 groups. This result was observed in the absence of alteration in indicators of renal injury such as renal AOPP and histopathology scores as well as seric levels of creatinine and urea. This increased

renal GSH concentration is possibly a homeostatic mechanism triggered by the exposure to a prooxidant. (i.e., PAR) during nephrogenesis in order to protect the kidneys from oxidative stress.

In conclusion, our results suggest that maternal exposure to human relevant doses of PAR is not associated with hepato or nephrotoxicity in the pups or dams. Noteworthy is that this exposure was not devoided of effects. It induced an adaptative antioxidant response in the pups' kidneys and impacted the maternal seric activity of AST. Studies are needed to further investigate the origin of this increased AST.

#### CONFLICT OF INTEREST

Nothing declared.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CAPES (PhD fellowship to RMK) and Fundação Araucária (research grant 3767; 01/2017; senior fellowship to EGM: 059/2019).

## REFERENCES

- Aleixo J. F. (2019). Tratamento materno com paracetamol: avaliação da toxicidade reprodutiva na prole feminina de ratas. Master Thesis. State University of Londrina.
- Anderson M. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548–555.
- Axelstad M., Christiansen S., Boberg J., Scholze M., Jacobsen P. R., Isling L. K., Kortenkamp A., Hass U., Lane K., and Ub M. (2014). Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* 147, 489–501. doi:10.1530/REP-13-0447.
- Bertolini A., Ferrari A., Ottani A., Guerzoni S., Tacchi R., and Leone S. (2006). Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* 12, 250–275. doi:10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x.
- Bessems J. G. M., and Vermeulen N. P. E. (2001). Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. *Crit Rev Toxicol.* 31, 55–138.
- Borghi S. M., Fattori V., Ruiz-Miyazawa K. W., Bertozzi M. M., Lourenco-Gonzalez Y., Tatakihara R. I., Busmann A. J. C., Mazzuco T. L., Casagrande R., and Verri W. A. (2018). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF- $\kappa$ B activity. *Life Sci.* 208, 221–231.
- Brodie B., and Axelrod J. (1948). The fate of acetanilide in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 94, 29–38.
- Burry A H. J. (1972). Phenacetin and analgesic nephropathy. *Med J Aust* 1, 879–882.
- Dean A., Driesche S. Van Den, Wang Y., Mckinnell C., Macpherson S., Edd S. L., Kinnell H., Hurtado P., Chambers T. J., Kerrie S., Wolfinger E., Lenka H., Calarrao A., Bayne R. A. L., Hagen C. P., Mitchell R. T., Anderson R. A., and Sharpe R. M. (2016). Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Sci Rep.* 6, 19789. doi:10.1038/srep19789.
- Eakins R., Walsh J., Randle L., Jenkins R. E., Rowe C., Lewis P. S., Vasieva O., Prats N., Brilliant N., Auli M., Bayliss M., Webb S., Rees J. A., Kitteringham N. R., Goldring C. E., and Park B. K. (2015). Adaptation to acetaminophen exposure elicits major changes in expression and distribution of the hepatic proteome. *Sci Rep.* 5, 16423. doi:10.1038/srep16423.

Eguia L., and Materson B. J. (1997). Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* 17, 363–370. doi:10.1002/j.1875-9114.1997.tb03721.x.

Fattori V., Borghi S. M., Guazelli C. F. S., Giroldo A. C., Crespigio J., Busmann A. J. C., Coelho-Silva L., Ludwig N. G., Mazzuco T. L., Casagrande R., and Verri W. A. (2017). Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- $\kappa$ B activation in mice. *Pharmacol Res.* 120, 10–22. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.039.

Frazier K. S. (2017). Species differences in renal development and associated developmental nephrotoxicity. *Birth Defects Res.* 109, 1243–1256. doi:10.1002/bdr2.1088.

Giannini E. G., Testa R., and Savarino V. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 172, 367–379.

Hanasand M. et al. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chem Acta* 413, 901–906.

Klein R. M., Rigobello C., Vidigal C. B., Moura K. F., Barbosa D. S., Gerardin D. C. C., Ceravolo G. S., and Moreira E. G. (2020). Gestational exposure to paracetamol in rats induces neurofunctional alterations in the progeny. *Neurotoxicol Teratol.* 77, 106838. doi:10.1016/j.ntt.2019.106838.

Kristensen D. M., Hass U., Lesne L., Lottrup G., Jacobsen P. R., Desdoits-Iethimonier C., Boberg J., Petersen J. H., Toppari J., Jensen T. K., Brunak S., Skakkebæk N. E., Nellemann C., Main K. M., and Jegou B., Leffers H. (2017). Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum Reprod.* 26, 235–244. doi:10.1093/humrep/deq323

Liew Z., Ritz B., Rebordosa C., Lee P., and Olsen J. (2014). Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. *JAMA Pediatr.* 168, 313–320. doi:10.1001/jamapediatrics.2013.4914

Lorz C., Justo P., Sanz A. N. A., Subira D., Egido S., and Ortiz A. (2004). Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J Am Soc Nephrol.* 15, 380–9. doi:10.1097/01.ASN.0000111289.91206.B0

Mazer M., and Perrone J. (2008). Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *J Med Toxicol.* 4, 2–6. doi:10.1007/BF03160941

- McGovern A. J., Vitkovitsky I. V., Jones D. L., and Mullins M. E. (2015). Can AST / ALT ratio indicate recovery after acute paracetamol poisoning? *Clin Toxicol.* 53, 164–167. doi:10.3109/15563650.2015.1006399
- Mour G., Feinfeld D. A., Caraccio T., and McGuigan M. (2005). Acute renal dysfunction in acetaminophen poisoning. *Ren Fail.* 27, 381–383. doi:10.1081/JDI-65428
- Murray R. M. (1972). Analgesic nephropathy: removal of phenacetin from proprietary analgesics. *Br Med J.* 4, 131–132.
- Nielsen E., Ostergaard G., and Larsen J. (2008). Toxicological risk assessment of chemicals: a practical guide. Informa Healthcare USA, (New York).
- Notarianni L., Oldham H., and Bennett P. (1987). Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate. *Br J Clin Pharmacol.* 24, 63–67. doi:10.1111/j.1365-2125.1987.tb03137.x
- Pereira M. R. F., Aleixo J. F., Cavalacanti L. F., Costa N. O., Vieira M. L., Ceravolo G. S., Moreira E. G., and Gerardin C. C. (2020). Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? *Reprod Toxicol.* 93, 68-74. doi:10.1016/j.reprotox.2019.12.007
- Smarr M. M., Bible J., Gerlanc N., Buck Louis G. M., Bever A., and Grantz K. L. (2019). Comparison of fetal growth by maternal prenatal acetaminophen use. *Pediatr Res.* 86, 261–268.
- Stern S. T., Bruno M. K., Hennig G. E., Horton R. A., Roberts J. C., and Cohen S. D. (2005). Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol Appl Pharmacol.* 202, 151–9. doi:10.1016/j.taap.2004.06.030
- Thiele K., Kessler T., Arck P., Erhardt A., and Tiegs G. (2013). Acetaminophen and pregnancy: short- and long-term consequences for mother and child. *J Reprod Immunol.* 97, 128–139. doi:10.1016/j.jri.2012.10.014
- Torres A. (2003). Is fever suppression involved in the etiology of autism and neurodevelopmental disorders? *BMC Pediatr.* 6, 3–9.
- USEPA (2006). Harmonization in interspecies extrapolation: use of bw 3/4 as default method in derivation of the oral RfD. 1–34. doi:10.1016/j.reprotox.2015.05.009

Werler M. M., Mitchell A. A., Hernandez-Diaz S., and Honein M. A. (2005). Use of over-the-counter medications during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 193, 771–777. doi:10.1016/j.ajog.2005.02.100

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados sugerem que a exposição materna a doses relevantes humanas de PAR não está associada a hepato ou nefrotoxicidade em filhotes ou mães. Digno de nota é que essa exposição não foi desprovida de efeitos. Induziu uma resposta antioxidante adaptativa nos rins dos filhotes e afetou a atividade sérica materna da AST. São necessários estudos para investigar a origem desse aumento da AST.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDERSON, ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 548–555, 1985.

ANDERSON, S. Opportunities missed, warnings ignored : re-discovering the history of drug safety in Great Britain following the thalidomide disaster 1961. **Debater a Europa**, [S. l.], v. 14, p. 49–72, 2016.

BAJT, M. L.; COVER, C.; LEMASTERS, J. J.; JAESCHKE, H. Nuclear translocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor during acetaminophen-induced liver cell injury. **Toxicol Sci**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 217–225, 2006. DOI: 10.1093/toxsci/kfl077.

BAJT, M. L.; FARHOOD, A.; LEMASTERS, J. J.; JAESCHKE, H. Mitochondrial Bax translocation accelerates DNA fragmentation and cell necrosis in a murine model of acetaminophen hepatotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther**, [S. l.], v. 324, n. 1, p. 8–14, 2008. DOI: 10.1124/jpet.107.129445.

BALLANTYNE, J. W. Essentials of obstetrics. Edinburgh: Green, [S. l.], p. 101, 1904.

BERTOLINI, A.; FERRARI, A.; OTTANI, A.; GUERZONI, S.; TACCHI, R.; LEONE, S. Paracetamol: new vistas of an old drug. **CNS Drug Rev**, [S. l.], v. 12, n. 3–4, p. 250–275, 2006. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2006.00250.x.

BERTRAM, J. F. Counting in the kidney. **Kidney Int**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 792–796, 2001. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.059002792.x.

BLAKELY, P.; MCDONALD, B. R. Acute renal failure due to acetaminophen ingestion: a case report and review of the literature. **J Am Soc Nephrology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 48–53, 1995.

BLASER, J. A.; ALLAN, G. M.. Tools for practice acetaminophen in pregnancy and future risk of adhd in offspring. **Can Fam Physician**, [s.l: s.n.],v. 60, n. 7, p. 642, 2014.

BLUEMLE, L. W. Jr.; GOLDBERG, M. Renal accumulation of salicylate and phenacetin : possible mechanisms in the nephropathy of analgesic abuse. **J Clin Invest**, [S. l.], v. 47, n. 11, p. 2507–2514, 1969.

BORGHI, S. M. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF-κB activity. **Life Sci**, [S. l.], v. 208, p. 221–231, 2018.

BOTTING, R., AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol / acetaminophen. **Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids**, [S. l.], v. 72, n. 2, p. 85–87, 2005. DOI: 10.1016/j.plefa.2004.10.005.

BOUDAUD, O.; ARONOFF, D. M.; RICHARDSON, J. H.; MARNETT, L. J.; OATES, J. A. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H(2) synthases. **Proc Natl Acad Sci USA**, [S. l.], v. 99, n.10, p. 7130–7135., 2002.

BOUTIS, K.; SHANNON, M. Nephrotoxicity after acute severe acetaminophen poisoning in adolescents. **J Toxicol Clin Toxicol**, [S. l.], v. 39, n. 5, p. 441–445, 2001. DOI: 10.1081/CLT-100105413.

- BRODIE, B. B.; AXELROD, J. The fate of acetanilide in man. **J Pharmacol Exp Ther**, [S. l.], v. 94, p. 29–38, 1948.
- BURRY A.; HOPKINS J. Phenacetin and analgesic nephropathy. **Med J Aust**, [S. l.], v. 1, n. 24, p. 879–882, 1972.
- CEKMEN, M.; ILBEY, Y. O.; OZBEK, E.; SIMSEK, A.; SOMAY, A.; ERSOZ, C. Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. **Food Chem Toxicol**, [S. l.], v. 47, n. 7, p. 1480–1484, 2009. DOI: 10.1016/j.fct.2009.03.034.
- CONINGS, S.; TSEKE, F.; VAN DEN BROECK, A.; QI, B.; PAULUS, J.; AMANT, F.; ANNAERT, P.; VAN CALSTEREN, K. Transplacental transport of paracetamol and its phase II metabolites using the ex vivo placenta perfusion model. **Toxicol Appl Pharmacol**, [S. l.], v. 370,, p. 14–23, 2019. DOI: 10.1016/j.taap.2019.03.004.
- COURADE, J.; BESSE, D.; DELCHAMBRE, C.; HANOUN, N.; HAMON, M. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. **Life Sci**, [S. l.], v. 69, n. 12, p. 1455–1464, 2001.
- CRANSWICK, N.; COGHLAN, D. Paracetamol efficacy and safety in children: the first 40 years. **Am J Ther**, [S. l.], v. 7, p. 135–141, 2000.
- DALLY, A. Thalidomide: Was the tragedy preventable? **Lancet**, [S. l.], v. 351, n. 9110, p. 1197–1199, 1998. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)09038-7.
- DEVANE, L.; GOETZL, L. M.; RAMAMOORTHY, S. Exposing fetal drug exposure. **Clin Pharmacol Ther**, [S. l.], v. 89, p. 786–8, 2011.
- DU, K., XIE, Y., MCGILL, M. R. Pathophysiological significance of c-jun n-terminal kinase in acetaminophen hepatotoxicity. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1769–1779, 2015. DOI: 10.1517/17425255.2015.1071353.
- EGUIA, L.; MATERSON, B. J. Acetaminophen-related acute renal failure without fulminant liver failure. **Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 363–370, 1997. DOI: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03721.x.
- FATTORI, V. et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-κB activation in mice. **Pharmacol Res**, [S. l.], v. 120, p. 10–22, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.039.
- FDA, 2009a. In: FDA requires additional labeling for over-the-counter pain relievers and fever reducers to help consumers use products safely. *Anais [...]*. [s.l: s.n.]
- FDA, 2009b. In: Summary minutes of the joint meeting of the drug safety and risk management advisory committee, nonprescription drugs advisory committee, and the anesthetic and life support drugs advisory committee June 29 and 30 *Anais [...]*. [s.l: s.n.]
- FDA, 2011. In: Prescription drug products containing acetaminophen: actions to reduce liver injury from unintentional overdose. *Anais [...]*. [s.l: s.n.]
- FLOWER, R. J.; VANE, J.R. Inhibition of prostaglandin synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). *Nature*, [S. l.], v. 240, n. 5381, p. 410–411, 1972.

FRAZIER, K. S. Species differences in renal development and associated developmental nephrotoxicity. **Birth Defects Res**, [S. I.], v. 109, n. 16, p. 1243-1256, 2017. DOI: 10.1002/bdr2.1088.

GHANEM, C. I.; PÉREZ, M. J.; MANAUTOU, J. E.; MOTTINO, A. D. Acetaminophen from liver to brain: new insights into drug pharmacological action and toxicity. **Pharmacol Res**, [S. I.], v.109, p. 119-131, 2016. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.02.020.

GINZLER, A. M.; CHESNER, C. Toxic manifestations in the newborn infant following placental transmission of sulfanilamide. With a report of 2 cases simulating erythroblastosis fetalis. **Am J Obs & Gynec**, [S. I.], v. 44, n. 1, p. 46–55, 1942. DOI: 10.1016/S0002-9378(42)91269-9.

GREGG, N. M. Congenital cataract following german measles in the mother, 1941. **Aust N Z J Ophthalmol**, [S. I.], v. 19, p. 267-76, 1991.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advance oxidation protein products in plasma. **Clin Chim Acta**, [S. I.], v. 413, n. 9 -10, p. 901–906, 2012.

HANAWA, N.; SHINOHARA, M.; SABERI, B.; GAARDE, W. A.; HAN, D.; KAPLOWITZ, N. Role of JNK translocation to mitochondria leading to inhibition of mitochondria bioenergetics in acetaminophen-induced liver injury. **J Biol Chem**, [S. I.], v. 283, n. 20, p. 13565–13577, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M708916200.

HARAMBAT, J.; VAN STRALEN, K. J.; KIM, J. J; TIZARD, E. J. Epidemiology of chronic kidney disease in children. **Pediatr Nephrol**, [S. I.], v. 27, n. 3, p. 363–373, 2012. DOI: 10.1007/s00467-011-1939-1.

HEINDEL, J. J. et al. Developmental origins of health and disease: integrating environmental influences. **Endocrinology**, [S. I.], v. 156, n. 10, p. 3416–3421, 2015. DOI: 10.1210/EN.2015-1394.

HOGESTATT, E. D.; JONSSON, B. A.; ERMUND, A.; ANDERSSON, D. A.; BJORK, H.; ALEXANDER, J. P.; CRAVATT, B. F.; BASBAUM, AI; ZYGMUNT, PM. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. **Biol J Chem**, [S. I.], v. 280, n. 36, p. 3140–31412, 2005.

HOU, C. C.; LIN, H.; CHANG, C. P.; HUANG, W. T.; LIN, M. T. Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis. **Eur J Pharmacol**, [S. I.], v. 667, n. 1 -3, p. 6–12, 2011.

JAESCHKE, H.; DUAN, L.; AKAKPO, J. Y.; FARHOOD, A.; CITY, K.. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. **Food Chem Toxicol**, [S. I.], v. 118, p. 709–718, 2018. DOI: 10.1016/j.fct.2018.06.025.

JETTEN, M. J. A. et al. Omics analysis of low dose acetaminophen intake demonstrates novel response pathways in humans. **Toxicol Appl Pharmacol**, [S. I.], v. 259, n. 3, p. 320–328, 2012. DOI: 10.1016/j.taap.2012.01.009.

KELLER, G.; ZIMMER, G.; MALL, G.; RITZ, E.; AMANN, K. Nephron number in patients with primary hypertension. **N Engl J Med**, [S. I.], v. 348, n. 2, p. 101–108, 2003. DOI: 10.1056/NEJMoa020549.

LACOSTE, M. et al. Renal tubular dysgenesis, a not uncommon autosomal recessive disorder leading to oligohydramnios: role of the renin-angiotensin system. **J Am Soc Nephrol**, [S. I.], v. 17, n. 8, p. 2253–2263, 2006. DOI: 10.1681/ASN.2005121303.

LEWIS, M. A.; SHAW, J.; SINHA, M.; ADALAT, S.; HUSSAIN, F.; INWARD, C. UK renal registry 11th annual report (december 2008): chapter 13 demography of the UK paediatric renal replacement therapy population. **Nephron Clin Pract**, [S. l.], v. 111, n. Suppl 1, p. 257–267, 2009.

LIEW, Z.; RITZ, B.; REBORDOSA, C.; LEE, P.; OLSEN, J. Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. **JAMA Pediatr**, [S. l.], v. 168, n. 4, p. 313–320, 2014. DOI: 10.1001/jamapediatrics.2013.4914.

LUYCKX, V. A.; BRENNER, B. M. The clinical importance of nephron mass. **J Am Soc Nephrol**, [S. l.], v. 21, p. 898–910, 2010. DOI: 10.1681/ASN.2009121248.

MAZER, M.; PERRONE, J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology, clinical manifestations, and management. **J Med Toxicol**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 2-6, 2008. DOI: 10.1007/BF03160941.

MORSE, H. N. Ueber eine neue darstellungsmethode der acetylamidophenole. **Ber Deutscher Chem Ges**, [S. l.], v. 11, p. 232–233, 1878.

MOUR, G.; FEINFELD, D. A.; CARACCIO, T.; MCGUIGAN, M.. Acute renal dysfunction in acetaminophen poisoning. **Ren Fail**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 381–383, 2005. DOI: 10.1081/JDI-65428.

MURRAY, R. M. Analgesic nephropathy: removal of phenacetin from proprietary analgesics. **Br Med J**, [S. l.], v. 4, p. 131–132, 1972.

NI, H.; WILLIAMS, J. A.; JAESCHKE, H.; DING, W. X. Redox biology zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver. **Redox Biol**, [S. l.], v. 1, p. 427–432, 2013. DOI: 10.1016/j.redox.2013.08.005.

NIELSEN, E.; OSTERGAARD, G.; LARSEN, J. C. Toxicological risk assessment of chemicals: a practical guide. New York: Informa Healthcare USA, 2008.

NITSCHKE, J. F.; PATIL, A. S.; LANGMAN, L. J.; DERLETH, D.; WATSON, W. J.; BROST, B. C.; PENN, H. J. Transplacental passage of acetaminophen in term pregnancy. **Am J Perinatol**, [S. l.], v. 34, p. 541–543, 2017.

NOTARIANNI, L. J.; OLDHAM, H. G.; BENNETT, P. N. Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate. **Br J Clin Pharmacol**, [S. l.], v. 24, p. 63–67, 1987. DOI: 10.1111/j.1365-2125.1987.tb03137.x.

NYENGAARD, J. R. Stereologic methods and their application in kidney research. **J Am Soc Nephrol**, [S. l.], v. 10, p. 1100–1123, 1999.

OECD. **OECD guideline for the testing of chemicals 426 - developmental neurotoxicity study**. [S. l.], n. September, p. 1–38, 2007.

POLIN, R. A.; FOX, W. W. **Fetal and neonatal physiology**. 4th Edition ed. Philadelphia.

SASAKI, T. et al. Biopsy-based estimation of total nephron number in Japanese living kidney donors. **Clin Exp Nephrol**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 629–637, 2019. a. DOI: 10.1007/s10157-018-01686-2.

SASAKI, T. et al. Estimation of nephron number in living humans by combining unenhanced computed tomography with biopsy-based stereology. **Sci Rep**, [S. l.], v. 9, p. 14400, 2019.

SCHREUDER, M. F.; BUETERS, R. R.; HUIGEN, M. C.; RUSSEL, F. G. M.; MASEREEUW, R.; VAN DEN HEUVEL, L. P. Effect of drugs on renal development. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 6, p. 212-17, 2011. DOI: 10.2215/CJN.04740510.

STERN, S. T.; BRUNO, M. K.; HENNIG, G. E.; HORTON, R. A.; ROBERTS, J. C.; COHEN, S. D. Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice: I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. **Toxicol Appl Pharmacol**, [S. l.], v. 202, n. 2, p. 151-159, 2005. DOI: 10.1016/j.taap.2004.06.030.

SULEMANJI, M.; VAKILI, K. Neonatal renal physiology. **Semin Pediatr Surg**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 195–198, 2013. DOI 10.1053/j.sempedsurg.2013.10.008.

THIELE, K.; KESSLER, T.; ARCK, P.; ERHARDT, A.; TIEGS, G. Acetaminophen and pregnancy: Short- and long-term consequences for mother and child. **J Reprod Immunol**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 128–139, 2013. DOI: 10.1016/j.jri.2012.10.014.

TORRES, A. Is fever suppression involved in the etiology of autism and neurodevelopmental disorders? **BMC Pediatr**, [S. l.], v. 6, p. 3–9, 2003.

USEPA. **Harmonization in interspecies extrapolation : use of bw 3/4 as default method in derivation of the oral RFD**. [S. l.], n. 68, p. 1–34, 2006. DOI: 10.1016/j.reprotox.2015.05.009.

VON MERING, J. Beitrage zur kenntniss der antipyretica. **Ther Monatsch**, [S. l.], v. 7, p. 577– 587., 1893.

WERLER, M. M.; MITCHELL, A. A.; HERNANDEZ-DIAZ, S.; HONEIN, M. A. Use of over-the-counter medications during pregnancy. **Am J Obs & Gynec**, [S. l.], v. 193, n. 3, p. 771–777, 2005. DOI: 10.1016/j.ajog.2005.02.100.

WIN, S.; THAN, T. A.; WIN, R.; MIN, M.; AGHAJAN, M.; ANGELES, L. JNK mediates mouse liver injury through a novel Sab (SH3BP5) dependent pathway leading to inactivation of intramitochondrial Src. **Hepatology**, [S. l.], v. 63, n. 6, p. 1987–2003, 2016. DOI: 10.1002/hep.28486.JNK.

**ANEXOS**