



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL AO
PARACETAMOL NÃO ALTERA OS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS EM RATOS
ADULTOS**

Londrina
2021

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL AO
PARACETAMOL NÃO ALTERA OS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS EM RATOS
ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof^a Dr^a Graziela Sciantti Ceravolo.

Londrina
2021

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

N943p Novi, Daniella Regina Barrionuevo da Silva.
A exposição intrauterina e lactacional ao paracetamol não altera os parâmetros cardiovasculares e metabólicos em ratos adultos / Daniella Regina Barrionuevo da Silva Novi. - Londrina, 2021.
48 f. : il.

Orientador: Graziela Scialanti Ceravolo.
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2021.
Inclui bibliografia.

1. drogas analgésicas - Tese. 2. tratamento materno - Tese. 3. programação cardiovascular e metabólica - Tese. 4. reatividade vascular - Tese. I. Ceravolo, Graziela Scialanti . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

DANIELLA REGINA BARRIONUEVO DA SILVA NOVI

**A EXPOSIÇÃO INTRAUTERINA E LACTACIONAL AO
PARACETAMOL NÃO ALTERA OS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES E METABÓLICOS EM RATOS
ADULTOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dr^a Graziela Sciantti
Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Daniela C. C. Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof Dr Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof. Dr Tiago Januário da Costa
Universidade de São Paulo

Profª Drª Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profª Drª Carolina Matias Higashi Mckeown
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 18 de outubro de 2021.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me sustentar todos os dias, me dando paz, alegria, sabedoria, ânimo, refrigério e renovo, por confiar em mim e me ensinar que tudo posso naquele que fortalece! Muito obrigada, meu Deus, sem o Senhor não disso seria possível.

Ao meu esposo Lucas, que sempre me incentivou e me ajudou nesses quatro anos, compartilhando a minha tarefa de mãe, cuidando da nossa filha para que eu conseguisse estudar e concluir esse trabalho.

À minha filha Rafaela, que mesmo sendo difícil de entender o motivo que a mamãe precisava estudar nos dias que era para ficar com ela, conseguiu me ajudar, respeitando os momentos que eu precisava me ausentar para concluir este trabalho.

Aos meus pais, Aurélio e Wanda, que sempre me incentivaram a estudar e deram todo o suporte para isso fosse possível. Em especial a minha mãe, que sempre acreditou em mim, me incentivando e cuidando da minha filha para que eu pudesse trabalhar e estudar, trazendo sempre palavras de conforto, ânimo e de coragem para que eu não desistisse.

Aos meus irmãos, Fernanda e Aurélio Junior, pelo amor, incentivo e orgulho que sempre falam que sente por mim. Esses sentimentos foram a motivação para eu conseguir executar e concluir esse trabalho.

À minha madrinha Wilma, minha grande inspiradora para eu seguir a área da pesquisa e acadêmica, sendo um exemplo sempre para mim, de mulher guerreira, batalhadora e muito inteligente!

À minha orientadora, Dr^a. Graziela Sciantti Ceravolo, que me recebeu em seu laboratório e sem me conhecer, me deu oportunidade de vivenciar essa área, fazendo com que eu me apaixonasse. Obrigada, Prof^a pelo incentivo sempre, pelo respeito e pelas muitas vezes que me tratou como colega de profissão. Tenho muita admiração e orgulho de você!

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas, por oportunizar o conhecimento e aos colaboradores pelo auxílio técnico, contribuindo nas execuções dos experimentos.

Às colegas do laboratório e coautoras desse trabalho, Camila, Kawane e Deborah, que se tornaram grandes amigas. Vocês foram imprescindíveis

para que esse trabalho fosse executado e concluído. Obrigada pela ajuda e apoio que foi além de ajuda como coautoras e sim como amigas verdadeiras, que me ajudaram no momento que mais precisei.

À CAPES pela bolsa recebida no primeiro ano de doutoramento.

“Quanto mais me aprofundo na Ciência
mais me aproximo de Deus”.
(Albert Einstein).

RESUMO

NOVI, Daniella Regina Barrionuevo da Silva. **A exposição intrauterina e lactacional ao paracetamol não altera os parâmetros cardiovasculares e metabólicos em ratos adultos.** 2021. 49 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

O paracetamol (PAR) é o medicamento isento de prescrição médica mais recomendado pelos médicos para o tratamento da dor e da febre, em todas as fases da gestação. Este fármaco não é teratogênico, sendo considerado seguro para o feto, no entanto o PAR atravessa livremente a barreira hemato-placentária e é transferida pelo leite materno. Considerando que estudos recentes têm demonstrado que a exposição ao PAR em fases iniciais do desenvolvimento do organismo pode programar alterações comportamentais e reprodutivas nos indivíduos expostos e que o tratamento direto ao PAR pode estar associado a alterações metabólicas e cardiovasculares, o presente estudo teve como objetivo avaliar em ratos se a exposição intrauterina e lactacional ao PAR poderiam programar alterações cardiometabólicas na prole adulta. Para isto, ratas Wistar foram tratadas com PAR 350mg / kg / dia, por gavagem, do dia gestacional (DG) 6 ao DG 21 (PARG) ou DG 6 até o dia pós-natal 21 (PARGL). As mães controles receberam água por gavagem nos mesmos períodos (CTRG e CTRL). Os filhotes machos e fêmeas foram avaliados na idade adulta (75 - 80 dias de vida). Foi observado na progênie masculina e feminina que o tratamento materno com PAR (350mg / Kg / dia) não interferiu na resposta contrátil e relaxante da aorta avaliada *in vitro*, na sensibilidade à insulina, na deposição de tecido adiposo, na pressão arterial e não causou hepatotoxicidade. Esses resultados sugerem que o protocolo de exposição ao PAR utilizado no presente estudo não programou alterações vasculares e metabólicas que contribuíssem para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na vida adulta, sendo considerado seguro para a prole exposta.

Palavras-chave: drogas analgésicas; tratamento materno; programação cardiovascular e metabólica; reatividade vascular; DOHaD.

ABSTRACT

NOVI, Daniella Regina Barrionuevo da Silva Novi. **Evaluation of metabolic and cardiovascular parameters of adult male and female offspring exposed to paracetamol during early stages of development** 2021. 48 p. Thesis (PhD in Physiological Sciences – State University of Londrina, Londrina, 2021).

Paracetamol (PAR) is the over-the-counter drug most recommended by physician for the treatment of pain and fever in all stages of pregnancy. This drug is not teratogenic, being considered safe for the fetus, however, PAR crosses freely blood-placental barrier and is transferred through breast milk. Considering that current studies recognize that exposure to PAR in early stages of development can program behavioral and reproductive changes in exposed offspring and that treatment with paracetamol is associated to metabolic and cardiovascular changes, the present study aimed to evaluate in rats whether intrauterine and lactational exposure to PAR could program cardiometabolic changes in adult offspring. For this, Wistar rats were treated with PAR 350mg / kg / day, by gavage, from gestational day (DG) 6 to DG 21 (PARG) or DG 6 until postnatal day 21 (PARGL). Control dams were treated with water by gavage in the same periods (CTRG and CTRL). Male and female adult offspring were evaluated at adult age (75 - 80 days). It was observed in male and female progeny that maternal treatment with PAR (350mg / Kg / day) did not interfere in the contractile and relaxant response of the aorta evaluated in vitro, insulin sensitivity, adipose tissue deposition, blood pressure and did not cause hepatotoxicity. These results suggest that exposure protocol to PAR used in this study did not program vascular and metabolic alterations, which could contribute to the development of cardiometabolic diseases in adulthood, being thus considered safe to exposed offspring.

Keywords: analgesic drugs; maternal treatment; cardiovascular and metabolic programming; vascular reactivity; DOHaD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do paracetamol.....	15
Figura 2 – Diagrama do desenho experimental.....	22
Figura 3 – Ganho de peso corporal das mães e peso dos filhotes ao nascer durante os períodos gestacional e lactacional, exposto ao paracetamol (PAR) ou água (CTR)	28
Figura 4 – Consumo de ração das mães expostas ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e lactacional.....	29
Figura 5 – Curvas concentração-efeito cumulativas para Fenilefrina em anéis aórticos com (E+) e sem endotélio (E-) da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional	31
Figura 6 – Curvas concentração-efeito cumulativas para Acetilcolina e Nitroprussiato de sódio em anéis aórticos da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional	31
Figura 7 – Porcentagem de decaimento de glicose após injeção de insulina (kITT) em machos e fêmeas adultas expostas ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional.....	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Pressão arterial média e frequência cardíaca da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol e água durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL)30
- Tabela 2** – Resposta máxima e pD2 para Fenil em anéis de aorta isolados com (E+) e sem (E-) endotélio da prole adulta masculina e feminina exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional33
- Tabela 3** – Resposta máxima e pD2 a Ach a NPS em anéis de aortas isoladas de prole masculina e feminina exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional34
- Tabela 4** – Avaliação da obesidade da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL).36
- Tabela 5** – Dosagem transaminases hepáticas da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL)37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CCEC	Curva de concentração efeito cumulativa
COX	Ciclooxigenase
CTRG	Controle gestacional
CTRGL	Controle gestacional e lactacional
DG	Dia gestacional
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
DPN	Dia pós-natal
EDCF	<i>Endothelium-derived contracting factors</i>
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factors</i>
ENDO +	Com endotélio
ENDO -	Sem endotélio
FC	Frequência cardíaca
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fenil	Fenilefrina
i.p.	Intraperitoneal
ITT	<i>Insulin Tolerance Test</i>
kITT	<i>Insulin Tolerance Test constant</i>
NO	Óxido nítrico
NPS	Nitroprussiato de sódio
PAM	Pressão arterial média
PAR	Paracetamol
PARG	Paracetamol gestacional
PARGL	Paracetamol gestacional e lactacional
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina

SUMÁRIO

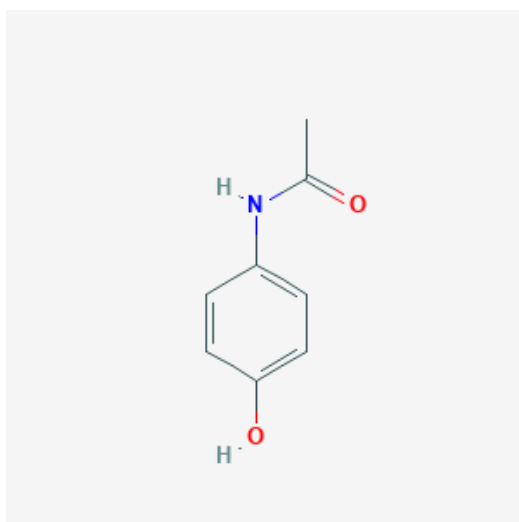
1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL	22
3.2	ANIMAIS E TRATAMENTO	22
3.3	TOXICIDADE GERAL MATERNA E DOS FILHOTES	24
3.4	AVALIAÇÃO DOS FILHOTES	24
3.4.1	Avaliação da Reatividade Vascular nas Proles Masculina e Feminina Na Fase Adulta	24
3.4.2	Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca	26
3.4.3	Teste de Tolerância à Insulina (ITT)	26
3.4.4	Avaliação biométrica	26
3.4.5	Avaliação dos marcadores hepáticos	26
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	28
4.1	TOXICIDADE MATERNA E DOS FILHOTES	28
4.2	PARÂMETROS DA PROLE ADULTA	30
4.2.1	Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca	30
4.2.2	Reatividade vascular	30
4.2.3	Teste de Tolerância à Insulina	34
4.2.4	Parâmetros biométricos	35
4.2.5	Marcadores hepáticos	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42

ANEXOS	48
ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina.....	49

1 INTRODUÇÃO

O paracetamol (PAR), também conhecido como acetaminofeno ou N-(4-hidroxifenil) etanamida (Figura 1), é um medicamento isento de prescrição médica, de fácil acesso e regularmente utilizado por automedicação, disponível comercialmente na sua forma isolada ou associado a outros fármacos (BARROS et al., 2019; BRASIL, 2016). Vários países observam elevado uso desse composto de ação analgésica e antipirética nas diferentes fases da gestação e lactação (LUTZ et al., 2020; SCHENKEL et al., 2018; VOLQVARTZ et al., 2020). Estima-se que quase 65% das gestantes utilizam o paracetamol para o tratamento de dor e febre, durante toda a gestação, inclusive no primeiro trimestre de gestação (MITCHELL et al., 2011; SERVEY; CHANG, 2014; THIELE et al., 2013).

Figura 1 – Estrutura molecular do paracetamol



Fonte: PubChem (2021)

Após a administração oral, o paracetamol é rapidamente absorvido pelo sistema gastrointestinal, possuindo assim alta biodisponibilidade oral (88%), atingindo pico das concentrações sanguíneas dentro de 90 minutos após sua ingestão. O PAR se liga às proteínas plasmáticas e tem uma meia-vida plasmática de 1,5-2,5 horas em doses terapêuticas, no entanto, em caso de uma overdose, o metabolismo é prejudicado e sua meia-vida prolongada para 4-8 horas, estando diretamente relacionada à extensão da lesão hepática (BANNWARTH; PÉHOURCQ, 2003; HODGMAN; GARRARD, 2012; MAZALEUSKAYA et al., 2015; MCGILL; JAESCHKE, 2013).

O paracetamol após sofrer absorção no duodeno, é amplamente metabolizado no fígado, por enzimas das fases I e II. A fase I envolve a ativação ou inativação da droga, através de reações de oxidação, redução e hidrólise, sendo que as reações oxidativas (5%) geralmente envolvem o citocromo P450, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH) e oxigênio e, as reações de fase II, envolve reações de conjugação com ácido glucurônico (52-57%), com sulfato (30-44%) ou glutathione, responsáveis pela desintoxicação da droga. Após metabolizado, formando conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico, o paracetamol é excretado pelos rins, sendo que 20-30% são metabólitos conjugados com sulfato, 40-60% metabólitos conjugados com ácido glucurônico e menos de 10% na sua forma inalterada (SAHAJWALLA; AYRES, 1991; ZHAO; PICKERING, 2011). Entretanto, uma pequena fração que sofre metabolização de fase I por ação das enzimas do citocromo P450, pode gerar um metabólito intermediário reativo denominado N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI), o qual é destoxificado pela glutathione, uma molécula com potencial redutor e, em situações de superdosagem, pode ocorrer uma saturação das vias de metabolização acarretando depleção dos estoques de glutathione com consequentes danos às células hepáticas (necrose centrolobular) (MAZALEUSKAYA et al., 2015; MCGILL; JAESCHKE, 2013).

Apesar do paracetamol atravessar livremente a barreira hemato-placentária (BYER; SEMMER, 1982; WEIGAND et al., 1984) e 2% da dose administrada à mãe é transferida para o bebê através do leite materno (BEAULAC-BAILLARGEON; ROCHELEAU, 1994; NOTARIANNI; OLDHAM; BENNETT, 1987), é considerado seguro para mães e para o bebê, por não apresentarem efeitos teratogênicos (BLACK; HILL, 2003; THIELE et al., 2013).

É classificado pelo órgão americano *Food and Drug Administration* (FDA) como medicamento de categoria B, ou seja, estudos em animais não demonstraram risco fetal, mas foram encontrados efeitos colaterais que não foram confirmados nas mulheres, especialmente durante o último trimestre de gravidez (STANLEY et al., 2019). Atualmente essa classificação do paracetamol como medicamento de categoria B tem sido discutida pela comunidade científica, uma vez que recentemente foi demonstrado, em humanos e modelos animais, uma associação entre a exposição ao paracetamol durante a gravidez e distúrbios reprodutivos e comportamentais ao longo da vida (ANDRADE, 2016; FISHER et al., 2016; HOOVER; HAYES; ERRAMOUSPE, 2015; KRISTENSEN et al., 2012; LIEW et al., 2016; LIND et

al., 2016). De fato, considerando o conhecimento atual sobre os prováveis problemas da exposição precoce ao paracetamol, a comunidade científica vem sugerindo cautela no uso de paracetamol em fases iniciais da vida (BAUER et al., 2021).

Apesar de um século de uso clínico do PAR como analgésico e antipirético, seu mecanismo de ação farmacológica não foi completamente elucidado. Estudos demonstram que as propriedades farmacológicas do paracetamol sejam resultado da atuação tanto central quanto periférica. O PAR diminui a síntese de prostaglandinas pela inibição das enzimas ciclooxigenases (COX) do tipo 1 (COX-1) e do tipo 2 (COX-2), especificamente no sítio catalítico peroxidase ou ainda através da inibição seletiva de variante de COX-1 central, designada COX-3 (AYOUB; BOTTING, 2004; BONNEFONT et al., 2003; GRAHAM; SCOTT, 2005). Ao agir como substrato, o PAR influencia na geração de radicais de tirosina essenciais para atividade enzimática das COX-1 e 2 (ANDERSON, 2008; GRAHAM et al., 2013). Porém, devido à fraca inibição da COX-1 e 2, sugere-se associação da ação farmacológica do PAR com a redução dos estoques de glutatona durante a metabolização, e consequente redução na síntese das prostaglandinas, uma vez que a glutatona é cofator para a manutenção das atividades da COX-1 e 2 envolvidas no processo inflamatório (GRAHAM; SCOTT, 2005).

Além disso, estudos prévios sugerem inibição seletiva da COX-2 (HINZ; CHEREMINA; BRUNE, 2008) uma vez que o PAR pouco exerce atividade antiplaquetária ou induz efeitos gastrointestinais (GRAHAM et al., 2013), ambos mediados pela inibição COX-1. Tal seletividade pode justificar a ineficácia do PAR em inflamações graves, pois há maior influência na síntese de prostaglandinas pela COX-2 em quadros inflamatórios leves (GRAHAM; SCOTT, 2005). Ainda, acredita-se que o PAR reduza os agentes halogenantes presentes no processo inflamatório pela inibição de outras peroxidases, tais como as mieloperoxidases (GRAHAM et al., 2013).

Apesar de pouco esclarecido, sugere-se que o mecanismo antipirético de PAR envolva a inibição da COX-2 e uma enzima variante do gene da COX-1 para que haja satisfatória redução dos níveis de prostaglandinas do tipo E2 (pirogênica) (AYOUB; FLOWER, 2019). Além disso, também é sugerido que o PAR ative os receptores de potencial transitório do tipo 1 (TRPA1) e exerça um impacto na L-arginina influenciando a síntese de óxido nítrico (MIRRASEKHIAN et al., 2018; PRZYBYŁA; SZYCHOWSKI; GMIŃSKI, 2021). No entanto, nem todos desses efeitos

foram claramente confirmados.

No sistema nervoso central, o PAR também age pela formação de 4-araquidonoilfenolamina (AM404) em razão da reação do metabólito p-aminofenol com o ácido araquidônico. O AM404 ativa receptores vaniloides tipo 1 (TRPV1) e provoca uma resposta antinociceptiva (MALLETT et al., 2010). Além disso, este metabólito intermediário aumenta a disponibilidade de endocanabinóides mediante a inibição da recaptação e da degradação destes compostos. Conseqüentemente, há ativação dos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1) localizados no terminal axonal dos neurônios envolvidos na modulação da dor, que ativam as fibras serotoninérgicas descendentes que por sua vez, suprimem as vias nociceptivas e promovem analgesia (BONNEFONT et al., 2003; KLINGER-GRATZ et al., 2018). A influência do PAR sobre o sistema endocanabinoide também pode ser constatada pela diminuição da transcrição dos receptores tirosina quinase do tipo B e conseqüentemente redução dos efeitos do fator neurotrófico derivado do encéfalo (PHILIPPOT et al., 2019) com reflexos na neurogênese e plasticidade sináptica (KOWIAŃSKI et al., 2018).

Já é bem documentado a associação entre a exposição intrauterina ao PAR à alterações reprodutivas (ALEIXO et al., 2020; FISHER et al., 2016; KRISTENSEN et al., 2011a; RANGEL et al., 2019) e alterações comportamentais, tais como autismo, Transtorno do Espectro Autista (TEA) e Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH) (AVELLA-GARCIA et al., 2016; BAUER et al., 2018; BRANDLISTUEN; YSTROM; NULMAN, 2013; KLEIN et al., 2020). Entretanto ainda não se sabe se a exposição ao PAR poderia programar alterações cardiometabólicas no indivíduo exposto.

Essa hipótese de que a exposição intrauterina a fármacos nas fases iniciais de desenvolvimento pode programar alterações na vida adulta é baseada no conceito Desenvolvimentista das Origens da Saúde e da Doença (do inglês *Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD*). Neste conceito, entende-se que a exposição à xenobióticos, como o paracetamol, ou à doenças ou fatores ambientais, tais como dieta desregulada ou estresse durante a gravidez, podem levar a mudanças permanentes no epigenoma, por meio de mecanismos moleculares que estabelecem e mantêm padrões mitóticos estáveis de expressão gênica sem alterar a sequência do DNA genômico, podendo ocasionar aumento do risco de doenças metabólicas e cardiovasculares crônicas nas fases posteriores da vida (BARKER, 1995; GLUCKMAN et al., 2009; SINCLAIR, KD; LEA, RG; REES, WD; YOUNG, 2007).

Desta forma, seria possível que a exposição intrauterina e lactacional ao PAR programasse também alterações cardiovasculares.

Dentro do sistema cardiovascular, os vasos sanguíneos são muito sensíveis a modificações ambientais no início da vida. O sistema cardiovascular é formado por macro e microvasos e dentre os macrovasos, tem-se a artéria aorta que é estruturalmente composta por três camadas, denominadas túnica íntima, constituída pelas células endoteliais; túnica média, que possui tecido elástico ou tecido muscular liso e túnica adventícia, composta por tecido conjuntivo, fibras colágenas e elásticas (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, 2017).

Fisiologicamente, o endotélio vascular tem papel importante na manutenção da homeostase cardiovascular. Além de proporcionar uma barreira física entre o lúmen e a parede do vaso, o endotélio regula ativamente o tônus vascular basal e a reatividade vascular em condições fisiológicas, respondendo a forças mecânicas e a mediadores neuro-humorais, além de liberar uma série de fatores relaxantes (fatores relaxantes derivados do endotélio – EDRFs) e contráteis (fatores contráteis derivados do endotélio – EDCFs) frente a estímulos específicos. Os EDRFs são óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂) e fator hiperpolarizante derivado do endotélio. Os EDCFs compreendem a Angiotensina II (Ang II), endotelina-1 (ET-1), as espécies reativas do oxigênio (EROs) e os prostanóides vasoconstritores (FURGHGOTT; VANHOUTTE, 1989). O desequilíbrio na produção e/ou liberação desses fatores, com aumento de EDCFs e/ou diminuição de EDRFs, caracteriza a disfunção endotelial (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999). Por consequência, a perda da homeostase do sistema vascular acarreta no desenvolvimento de doenças do sistema cardiovascular, tais como hipertensão, isquemia cardíaca, insuficiência cardíaca e aterosclerose (VANHOUTTE et al., 2009).

Desta forma, são poucos os estudos que avaliaram a função cardiovascular após o uso do paracetamol. De fato, estudos demonstraram que o uso de paracetamol em doses terapêuticas durante a gravidez está associado a um risco aumentado de pré-eclâmpsia e doenças tromboembólicas nas mães (REBORDOSA et al., 2010; ZELOP, 2008) e ratos adultos tratados com paracetamol (400 mg/kg/dia) durante 14 dias apresentaram maior estresse oxidativo e comprometimento do vasorrelaxamento na aorta torácica (PORTO et al., 2019). No entanto, por outro lado, ratos adultos tratados com PAR a 30mg/kg/dia por 6 meses durante a senescência, apresentaram diminuição da espessura vascular e redução dos efeitos deletérios de

envelhecimento em aortas (RICE et al., 2012).

Ultimamente, mais atenção tem sido dada aos efeitos prejudiciais causada pelo PAR no sistema cardiovascular. Alguns trabalhos demonstraram uma associação entre o tratamento com paracetamol e um risco aumentado de doença cardiovascular, principalmente relacionada a lesão vascular (CHAN et al., 2006; CURHAN et al., 2002; FORMAN; RIMM; CURHAN, 2007), por outro lado estudos descrevem que o uso do PAR é prejudicial em pacientes com doença vascular preexistente, em comparação com outras drogas anti-inflamatórias não esteroides convencionais (SUDANO et al., 2010; WHITE, 2007).

Recentemente, preocupações sobre a segurança cardiovascular após o uso de PAR foi levantado e ainda está em debate (FULTON et al., 2015; GLASSER; KHODNEVA, 2015; ROBERTS et al., 2016; TURTLE; DEAR; WEBB, 2013). Assim, o efeito prejudicial do PAR sobre sistema cardiovascular humano saudável ainda é impreciso e controverso, mas não deve ser desconsiderado.

Em relação às alterações metabólicas decorrentes da exposição perinatal ao paracetamol, os estudos existentes também são escassos e controversos. Por um lado, estudos realizados em ratos Wistar adultos expostos duas semanas a paracetamol 400mg/kg/dia e camundongos expostos intrauterinamente a 300mg/kg/dia não apresentaram alteração no ganho de peso (PORTO et al., 2019; WU et al., 2016), como também crianças de 7-11 anos, expostas ao paracetamol durante a vida intrauterina não apresentaram alteração do índice de massa corporal (IMC) ou circunferência abdominal (LIEW et al., 2019). No entanto, dois estudos epidemiológicos recentes sugeriram uma possível ligação entre a exposição precoce ao paracetamol e aumento de IMC na infância e adolescência (MURPHY et al., 2015; SORROW et al., 2019).

Dessa maneira, considerando que os efeitos adversos do PAR sobre o Sistema cardiovascular e sobre os parâmetros metabólicos em indivíduos saudáveis ainda é impreciso e controverso e que os estudos existentes ainda não avaliaram esses efeitos do PAR na progênie exposta durante a vida intrauterina e lactacional, este estudo experimental teve como objetivo avaliar se a exposição ao paracetamol durante a gestação e lactação pode levar a alterações cardiometabólicas na prole adulta masculina e feminina.

2 OBJETIVOS

Avaliar as possíveis alterações metabólicas e cardiovasculares da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol durante a gestação e a amamentação.

Dentre os objetivos específicos, foram avaliados na prole masculina e feminina de ratas tratadas com paracetamol durante a gestação e a lactação:

1. Resposta contrátil e relaxante da aorta torácica;
2. Pressão arterial média e frequência cardíaca;
3. Sensibilidade à insulina;
4. Avaliação da obesidade e marcadores hepáticos;
5. Toxicidade materna e dos filhotes.

Os resultados deste estudo, com exceção dos resultados dos marcadores hepáticos, estão publicados para a revista ***The Journal of Cardiovascular Pharmacology*** (doi: 10.1097/FJC.0000000000001145, fator de impacto: 2,598, ISSN: 15334023, 01602446), com o título "Intrauterine and lactational exposure to paracetamol: cardiometabolic evaluation in adult female and male offspring".

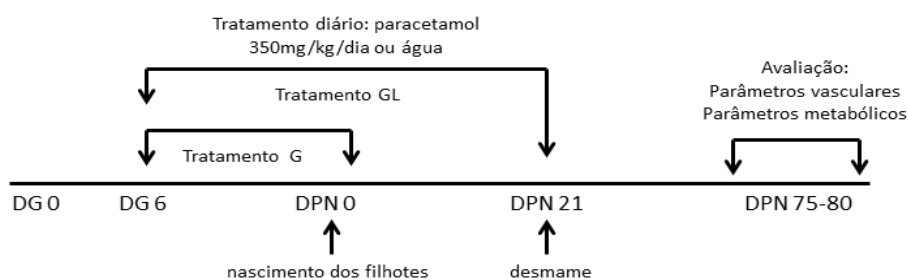
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL nº 79000.2017.82, nº 80/2017).

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Abaixo, encontra-se o diagrama do desenho experimental aplicado neste estudo:

Figura 2 – Diagrama do desenho experimental



DG: dia gestacional; DPN: dia pós natal; G: gestacional; GL: gestacional e lactacional

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Para este trabalho, foram utilizados ratos virgens da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina, os quais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, os quais foram climatizados por duas semanas antes do início do acasalamento e mantidos sempre em ambiente controlado (temperatura de $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 e desligadas às 18:00), com livre acesso à água e ração (Nuvital[®]) para roedores.

Para os acasalamentos, foram utilizadas 40 ratas e 10 ratos, sendo colocados em uma gaiola ao final da tarde, duas ratas e um rato e, na manhã do dia seguinte, realizado esfregaço vaginal e observado ao microscópio a presença de células da fase estro do ciclo estral e de espermatozoides para o diagnóstico de prenhez, sendo este dia denominado dia gestacional (DG) 0. As ratas prenhes ratas

foram alocadas em gaiolas, com limite máximo de cinco ratas por gaiola, até o (DG) 6, quando as mães foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais para o início do protocolo de tratamento.

As ratas prenhes, conforme o grupo experimental pertencente receberam diariamente os seguintes tratamentos por via oral (gavagem):

- Grupo controle gestacional (CTRG): tratadas aproximadamente com 0,3 mL de água potável, do (DG) 6 ao (DG) 21;
- Grupo paracetamol gestacional (PARG): tratadas com 350 mg/Kg/dia de paracetamol (Tylenol[®], Johnson & Johnson Laboratório, Brasil) diluída em água potável, do (DG) 6 ao (DG) 21;
- Grupo controle gestacional e lactacional (CTRGL): tratadas aproximadamente com 0,3 mL de água potável, do (DG) 6 ao (DPN) 21;
- Grupo paracetamol gestacional e lactacional (PARGL): tratadas com 350 mg/Kg/dia de paracetamol (Tylenol[®], Johnson & Johnson Laboratório, Brasil) diluída em água potável, do (DG) 6 ao (DPN) 21.

A escolha da dose foi baseada em estudos prévios descrevendo as repercussões tardias da prole adulta exposta ao paracetamol e baseado na dose utilizada em gestantes (KLEIN et al., 2020; KRISTENSEN et al., 2011b; RANGEL et al., 2019). O período de tratamento foi baseado na utilização desta droga em mulheres gestantes e lactantes, assim como protocolos do Guideline OECD/OECD (1998) que recomenda o início do tratamento com paracetamol após o período de implantação, que para os ratos representa o (DG) 6.

As fêmeas foram pesadas a cada três dias para acompanhamento do ganho de peso e para ajuste da dose a ser administrada durante toda a gestação e lactação.

O dia do nascimento da prole foi denominado dia DPN 0, no qual as ninhadas foram pesadas, contabilizadas e identificadas pelo sexo, sendo que o peso ao nascer dos filhotes foi calculado a partir do peso da ninhada sobre o número total da ninhada. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas a 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas, quando possível), com o objetivo manter uma exposição ao paracetamol homogênea entre os filhotes/ninhada. Os filhotes também foram pesados no DPN 1,

4, 7, 14 e 21, quando foram desmamados e alocados em gaiolas correspondentes aos seus grupos experimentais, mantendo separadamente machos e fêmeas e no máximo, cinco animais por gaiola.

Para cada experimento, foram utilizados um filhote macho e fêmea por ninhada, em idade adulta (DPN 75-80). No caso das fêmeas adultas, os experimentos foram realizados com as ratas sempre na fase de estro fisiológico, determinado por esfregaço vaginal imediatamente antes dos experimentos, a fim de padronizar uma fase e excluir qualquer interferência hormonal nos experimentos.

3.3 TOXICIDADE GERAL MATERNA E DOS FILHOTES

Para esta avaliação foram mensurados a cada três dias durante todo o período de tratamento (gestacional e lactacional), o peso corporal materno e o consumo de ração. Para os filhotes foram avaliados o peso ao nascer, valor obtido através da divisão do peso da ninhada pelo número de filhotes por ninhada. Além desses parâmetros, foram observados sinais clínicos de toxicidade, tais como lacrimejamento, tremores e piloereção durante todo o protocolo experimental, conforme descrito no Guideline OECD/OECD (1998).

3.4 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES

3.4.1 Avaliação da Reatividade Vascular nas Proles Masculina e Feminina na Fase Adulta

As proles masculina e feminina em fase adulta foram anestesiadas com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p., Cristália, Brasil), e por meio de toracotomia a aorta foi removida, dissecada e seccionada em quatro anéis transversais de 3 mm, como descrito por CARVALHO e colaboradores (1987). Dois dos anéis tiveram seu endotélio removido (Endo-) com uma haste fina metálica com algodão e nos outros dois anéis, o endotélio foi preservado (Endo+). Ambos os anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável, um fixo à base da cuba para órgãos isolados e o outro conectado a um transdutor isométrico (FT03, Grass), acoplado a um amplificador de sinal (AECAD 04, AVS Projetos) ligado a um computador. Os seguimentos de aorta permaneceram durante todo o protocolo experimental sob

tensão de 1,5 g em solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada (concentrações em mM: 130 NaCl, 14,9 NaHCO₃; 4,7 KCl; 1,18 KH₂PO₄; 1,17 MgSO₄-7H₂O; 5,5 glicose; 1,60 CaCl₂-2H₂O e 0,026 EDTA), gaseificada com mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, mantidos aquecidos a 37° C e em pH 7,4, como previamente publicado por nosso grupo (CERAVOLO et al., 2013; HIGASHI et al., 2016).

Após 30 minutos de equilíbrio, a viabilidade do músculo liso vascular foi avaliada, através da adição de cloreto de potássio (KCl) 90 mM às preparações de aorta. Os anéis que não responderam ao KCl foram descartados. Para comprovação da adequada preservação ou correta remoção do endotélio, os anéis de aorta foram contraídos com fenilefrina (Fenil) e em seguida foi aplicada um agente vasodilatador dependente do endotélio, acetilcolina (Ach) a 0,1 µM. O endotélio foi considerado viável quando Ach causou relaxamento de 70-80% da pré-contração induzida pela Fenil, e adequadamente removido quando a vasodilatação foi inferior a 5% da pré-contração.

Para a avaliação da capacidade contrátil nos anéis de aorta com (Endo+) e sem endotélio (Endo-), foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas (CCEC) (1 nM a 30 µM) para Fenil, um agonista α1-adrenérgico, cujas respostas foram expressas em gramas (g) de tensão.

A capacidade de dilatação dos anéis de aorta foi avaliada por meio de CCEC para Ach, vasodilatador endotélio-dependente, em anéis Endo+ e para nitroprussiato de sódio (NPS), um doador de óxido nítrico, em anéis Endo-, previamente contraídos com concentração submáxima de Fenil (1 µM), sendo esta concentração capaz de causar de 60-80% da contração máxima. O relaxamento induzido por Ach e NPS foi expresso como porcentagem (%) de relaxamento em relação a contração promovida pela Fenil.

As comparações entre os diferentes grupos experimentais foram realizadas com a determinação das respostas máxima (Rmax) e pD2 (logaritmo negativo da concentração efetiva de 50% da resposta máxima - EC₅₀) para cada fármaco e calculados a partir da análise de regressão não linear (GraphPad Prism software, USA).

3.4.2 Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca

A pressão arterial média (PAM, mmHg) e a frequência cardíaca (FC, bpm) foram mensuradas em ratos adultos conscientes através de um método indireto de plestimografia de cauda (CODA, Kent Scientific, Torrington, CT). Antes do início dos registros, os animais foram familiarizado com o aparato e realizado o registro de vinte medidas sequenciais, sendo os resultados expressos como a média desses valores.

3.4.3 Teste de Tolerância à Insulina (ITT)

Os ratos adultos machos e fêmeas foram privados de alimento por 4 (quatro) horas, com acesso livre a água. Após o período de restrição, os ratos foram pesados e anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg, i.p., Cristália, Brasil). As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal e com o auxílio de um glicosímetro (Roche Diagnostic, Brasil), a glicemia basal foi registrada no tempo zero (0 min) e após a injeção intraperitoneal de insulina regular (1,5 U/kg, Humulin®, Insulina Humana R, Eli Lilly, EUA), a glicemia foi avaliada 10, 20, 30 e 40 minutos após a injeção de insulina (NOVI et al., 2018). Os resultados obtidos foram expressos e comparados entre si através da constante de decaimento da glucose após a injeção da insulina (kITT), que é calculado através da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de glicemias obtidos.

3.4.4 Avaliação Biométrica

Após a avaliação do ITT, o comprimento naso-anal foi medido e o Índice de Lee calculado através da fórmula: $\text{peso corporal}^{1/3}(\text{g})/\text{comprimento naso-anal (cm)} \times 100$. Os tecidos adiposos perigonadal, retroperitoneal e marrom foram retiradas, pesados e os valores expressos como peso de gordura por 100g do peso corporal.

3.4.5 Avaliação dos Marcadores Hepáticos

A dosagem sérica de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram realizadas nas amostras de sangue da prole feminina

e masculina adulta, coletadas via punção cardíaca no ventrículo direito, após eutanásia e toracotomia durante o protocolo de reatividade vascular. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos à 3000 rpm, em temperatura de 4°C e o soro foi separado do plasma e armazenado em freezer a - 80°C até a realização das dosagens. Para esse fim, utilizou-se o equipamento Dimension® EXL™ 200 (Siemens Healthneers, Brasil) empregando-se o método “Cinético/UV” recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC). O procedimento técnico ocorreu de acordo com o protocolo do fabricante para o equipamento e os valores de AST e ALT foram expressos em unidade por litro (U/L).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, realizou-se uma análise exploratória para avaliação da normalidade (teste Shapiro–Wilk e Kolmogorov-Smirnova) e homogeneidade de variância (teste de Levene) dos dados. Como todas as variáveis apresentaram distribuição e homogeneidade normais foram analisadas por teste t não pareado, ANOVA de uma via ou ANOVA de medidas repetidas, e em seguida teste de Bonferroni ou Tukey. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o $p < 0.05$, utilizando-se o programa de computador GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, USA). Os resultados obtidos foram comparados entre os grupos CTRG com PARG, CRTGL com PARGL e entre os animais do mesmo sexo.

4 RESULTADOS

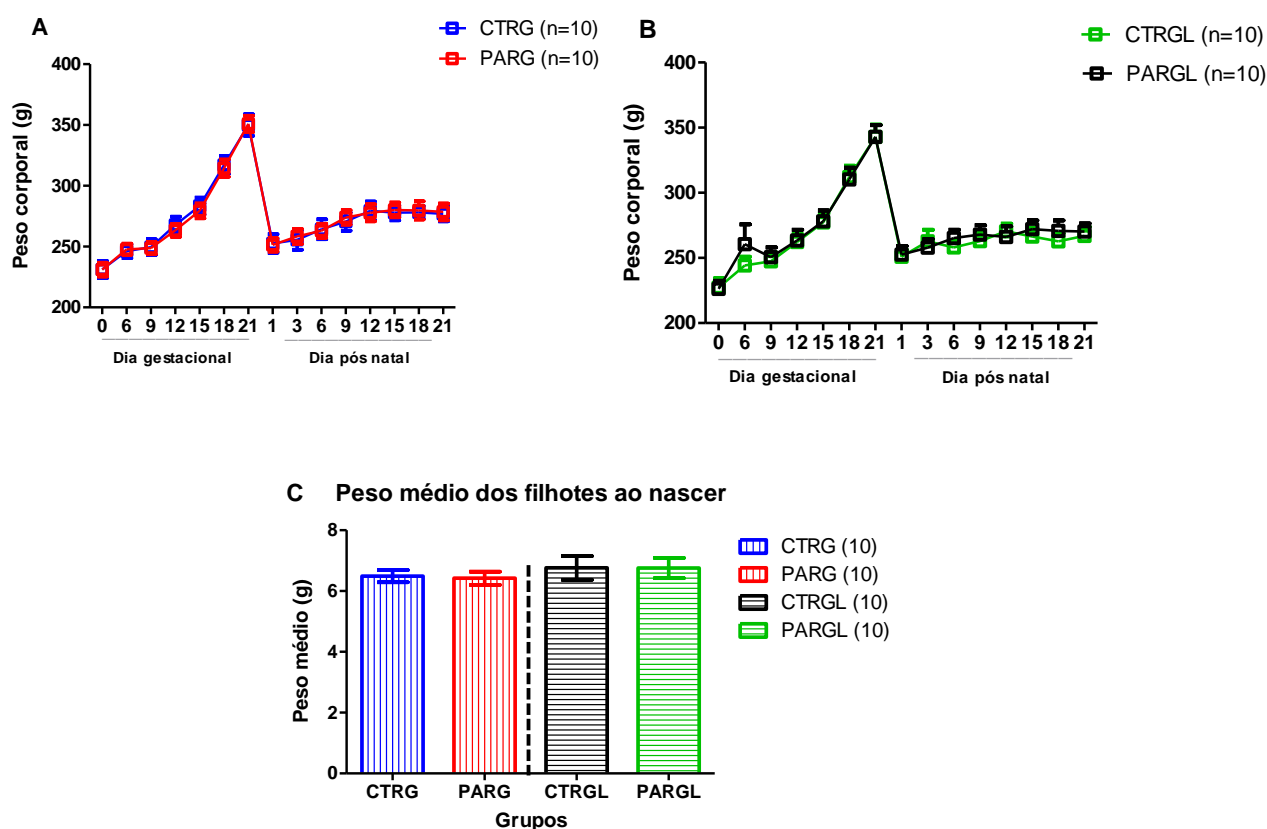
4.1 TOXICIDADE MATERNA E DOS FILHOTES

O ganho de peso das mães foi similar entre os grupos paracetamol (PARG, PARGL) e seus respectivos grupos controle (CTRG, CTRGL) (Figura 3A e 3B) e a exposição ao paracetamol não interfere com o ganho de peso quando comparado aos filhotes não expostos (Figura 3C).

Nenhuma diferença foi observada no consumo de ração entre as mães dos grupos paracetamol (PARG, PARGL) e seus respectivos grupos controle (CTRG, CTRGL) (Figura 4)

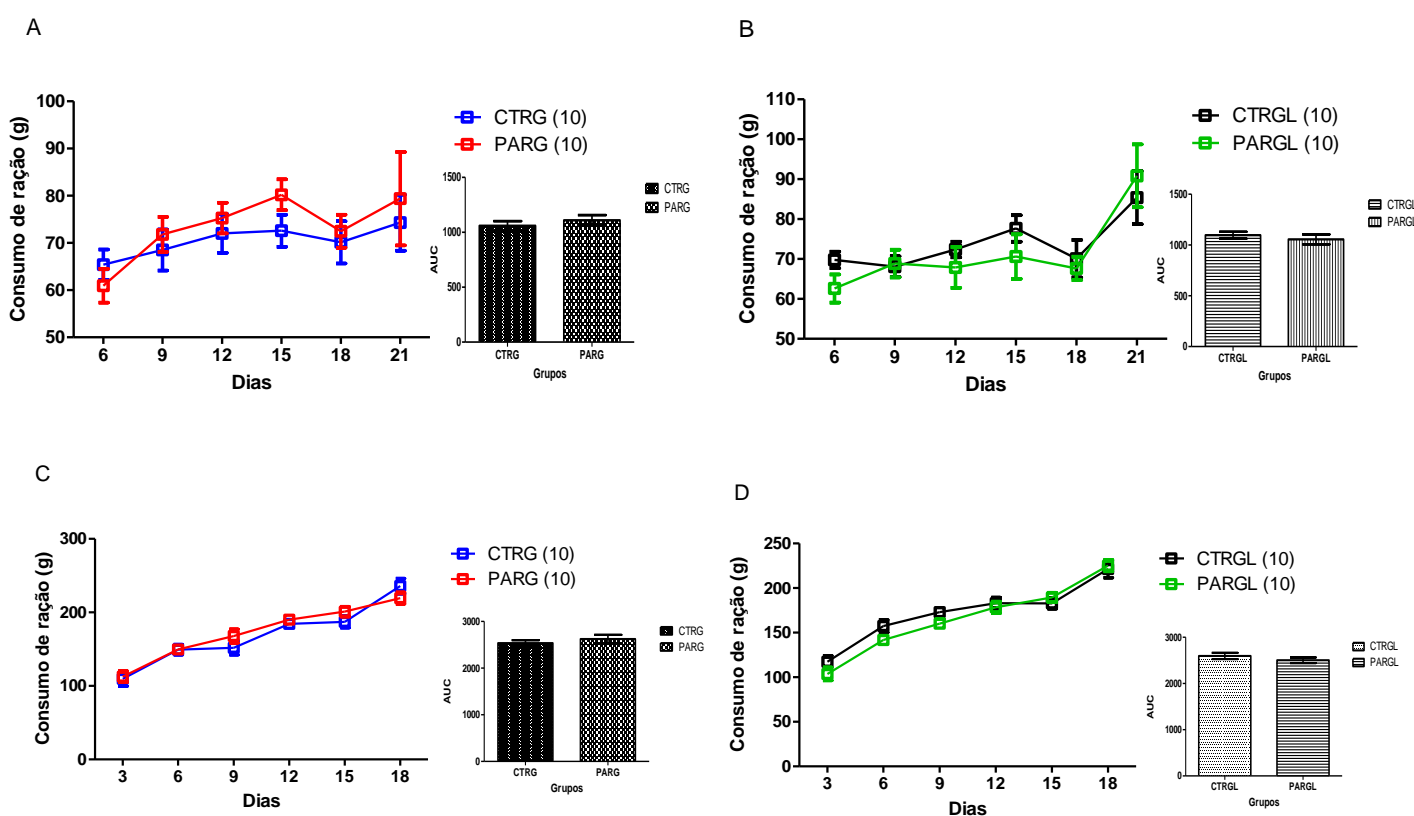
Não foram observados sinais de toxicidade, tais como tremor, lacrimejamento e piloereção (OECD, 2007) nas mães e nos filhotes durante os experimentos.

Figura 3 – Ganho de peso corporal das mães e peso médio dos filhotes ao nascer durante os períodos gestacional e lactacional, exposto ao paracetamol (PAR) ou água (CTR).



Ganho de peso corporal avaliado nas mães durante os períodos gestacional e lactacional, expostas ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante o período gestacional (A) ou gestacional e lactacional (B) e peso médio dos filhotes ao nascer em ambos tratamentos (C). Valores expressos como média \pm EPM, (n=10/grupo). $p > 0,05$ (Teste T e ANOVA de vias repetidas). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

Figura 4 – Consumo de ração das mães expostas ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e lactacional.



Consumo de ração das mães expostas ao paracetamol (PARG, PARGL) ou água (CTR, CTRGL) durante os períodos gestacional (A,B) e lactacional (C,D). Valores expressos como média \pm EPM, n=10/grupo. $p > 0.05$ (ANOVA de vias repetidas). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

4.2 PARÂMETROS DA PROLE ADULTA

4.2.1 Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) da prole masculina e feminina adulta exposta o paracetamol durante a gestação e lactação (PARG e PARGL) foram similares aos seus respectivos grupos controles (CTRG e CTRGL) (Tabela 1).

Tabela 1 – Pressão arterial média e frequência cardíaca da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol e água durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL).

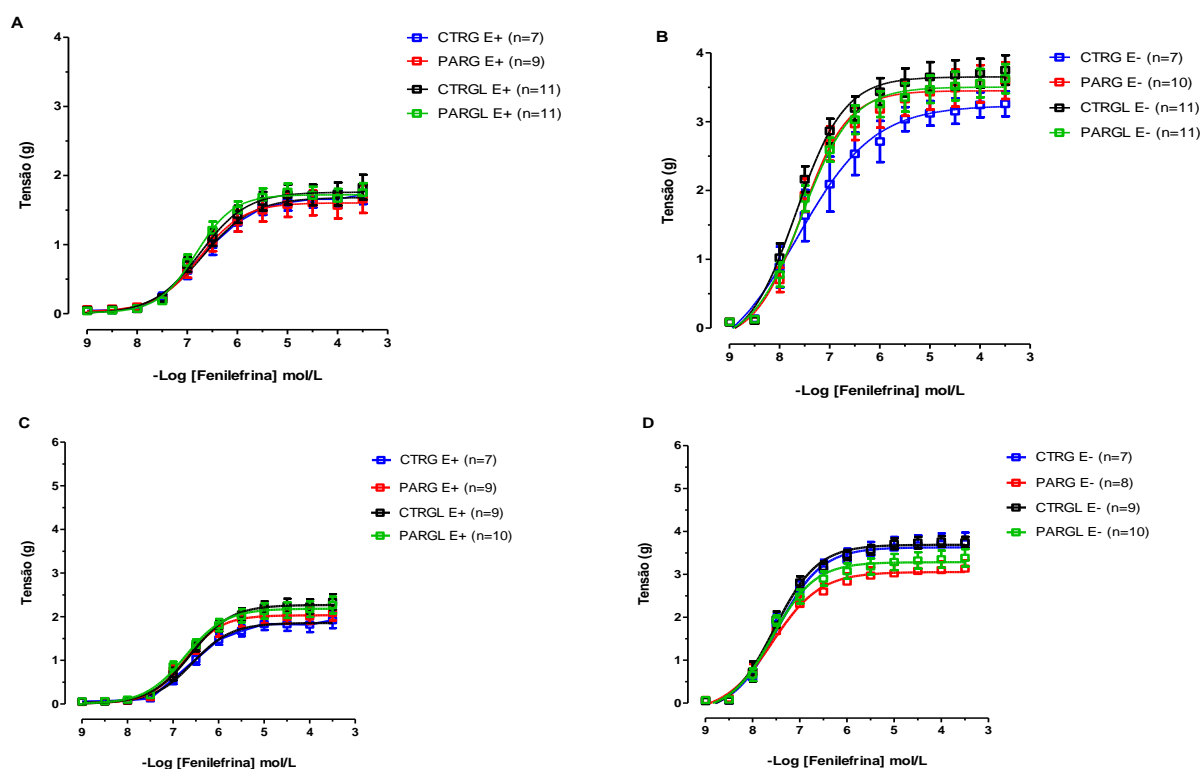
	Macho		Fêmea	
Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
CTRG	103,50± 1,65 (6)	342,20±5,21 (6)	100,60±4,37 (5)	362,20±10,25 (5)
PARG	109,8± 4,02 (9)	332,40±6,80 (9)	94,63±2,75 (8)	348,90±7,14 (8)
CTRGL	107,00±1,00 (5)	352,60±11,00 (5)	102,30±1,57 (7)	392,90±14,21 (7)
PARGL	107,70± 2,83 (7)	362,70±22,49 (7)	97,00±3,90 (6)	376,80±13,88 (6)

Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) da prole masculina e feminina exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL). Valores expressos como média ± EPM. (n) é o número de animais/grupo, p>0,05 (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

4.2.2 REATIVIDADE VASCULAR

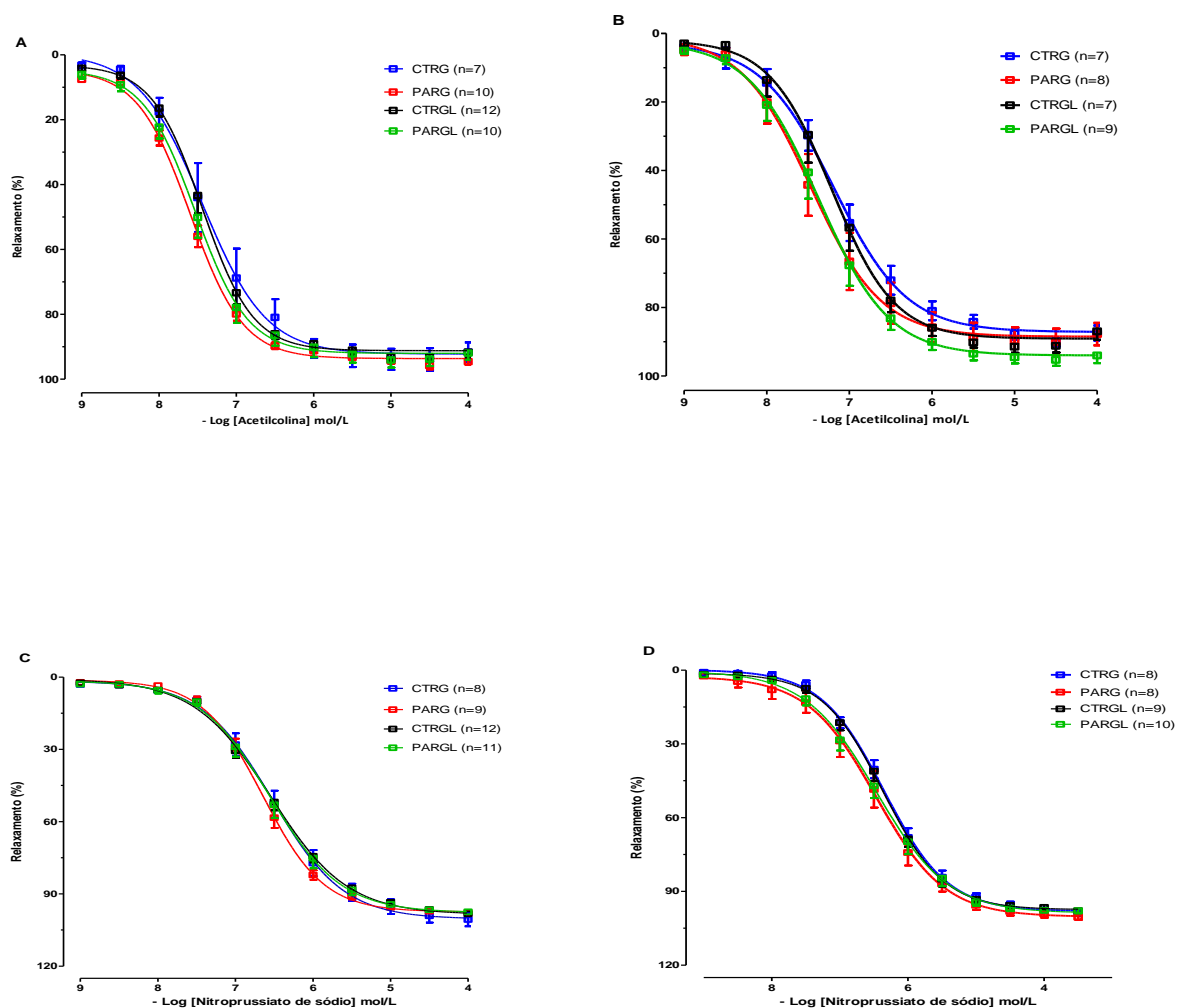
Em anéis aórticos isolados da prole masculina e feminina adulta exposta aos grupos paracetamol (PARG e PARGL) e controles (CTRG e CTRGL) induziram resposta dependente da concentração a Fenil, Ach e NPS (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Curvas concentração-efeito cumulativas para Fenilefrina em anéis aórticos com (E+) e sem endotélio (E-) da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional.



Curvas concentração-efeito cumulativas para Fenil E + (A) E- (B) da prole feminina adulta e curvas para Fenil E + (C) E- (D) da prole masculina adulta exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e lactacional. Valores expressos como média \pm EPM, (n=7-11/grupo). $p > 0,05$ (ANOVA de uma via). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

Figura 6. Curvas concentração-efeito cumulativas para Acetilcolina e Nitroprussiato de sódio em anéis aórticos da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional.



Curvas concentração-efeito cumulativas para Acetilcolina em anéis aórticos da prole feminina adulta (A) e da prole masculina (B) e curvas concentração-efeito cumulativas para Nitroprussiato de sódio em anéis aórticos da prole feminina adulta (C) e da prole masculina (D) expostas ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e lactacional. Valores expressos como média \pm EPM, (n=7-12/grupo). $p > 0,05$ (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil (R_{max}) a Fenil em anéis aórticos (E-) isolados de ratos CTR e PAR quando comparados com seus respectivos anéis com endotélio (E+) (Tabela 2). A R_{max} e o pD_2 para Fenil (Tabela 2), ACh e NPS (Tabela 3) foram semelhantes entre os anéis isolados dos grupos PAR e CTR.

Tabela 2. Resposta máxima e pD2 para Fenil em anéis de aorta isolados com (E+) e sem (E-) endotélio da prole adulta masculina e feminina exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional

Machos				
Grupos	Rmax		pD2	
	E+	E-	E+	E-
CTRG	1,87±0,15 (7)	3,49±0,22 (7)*	6,57±0,05 (7)	7,51±0,07 (7)*
PARG	2,15±0,19 (7)	2,98±0,20 (8)**	6,70±0,06 (7)	7,64±0,09 (8)**
CTRGL	2,23±0,15 (9)	3,50±0,11 (9)*	6,62±0,08 (9)	7,56±0,09 (9)*
PARGL	2,11±0,17 (10)	3,17±0,16 (10)**	6,75±0,05 (10)	7,63±0,05 (10)**
Fêmeas				
Grupos	Rmax		pD2	
	E+	E-	E+	E-
CTRG	1,61±0,12 (7)	3,08±0,18 (7)*	6,66±0,12 (7)	7,42±0,29 (7)*
PARG	1,58±0,18 (9)	3,90±0,56 (10)**	6,75±0,10 (9)	7,56±0,07 (10)**
CTRGL	1,71±0,15 (11)	3,46±0,20 (11)*	6,72±0,08 (11)	7,69±0,08 (11)*
PARGL	1,74±0,12 (11)	3,27±0,18 (11)**	6,78±0,08 (11)	7,57±0,09 (11)**

Resposta máxima e pD2 para Fenil em anéis de aorta isolados com (E+) e sem (E-) endotélio da prole adulta masculina e feminina exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL)). Valores expressos como média ± EPM. (n=7-11/grupo). (ANOVA de uma via, pós-teste: Bonferroni); *p<0,05 vs E+ CTRG (controle gestacional) ou CTRGL (controle gestacional e lactacional) **p<0,05 vs E+ PARGL paracetamol gestacional e lactacional) ou PARG (paracetamol gestacional).

Tabela 3. Resposta máxima e pD2 a Ach a NPS em anéis de aortas isoladas de prole masculina e feminina exposta ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional.

Machos				
Grupos	Rmax		pD2	
	Ach	NPS	Ach	NPS
CTRG	86,04±2,19 (7)	93,52±1,30 (8)	7,20±0,09 (7)	6,33±0,07 (8)
PARG	87,28±2,41 (8)	95,41±0,89 (8)	7,42±0,14 (8)	6,52±0,14 (8)
CTRGL	89,37±1,60 (7)	94,35±0,70 (9)	7,24±0,12 (7)	6,37±0,07 (9)
PARGL	91,48±1,62 (9)	95,57±0,74 (10)	7,38±0,12 (9)	6,45±0,11 (10)

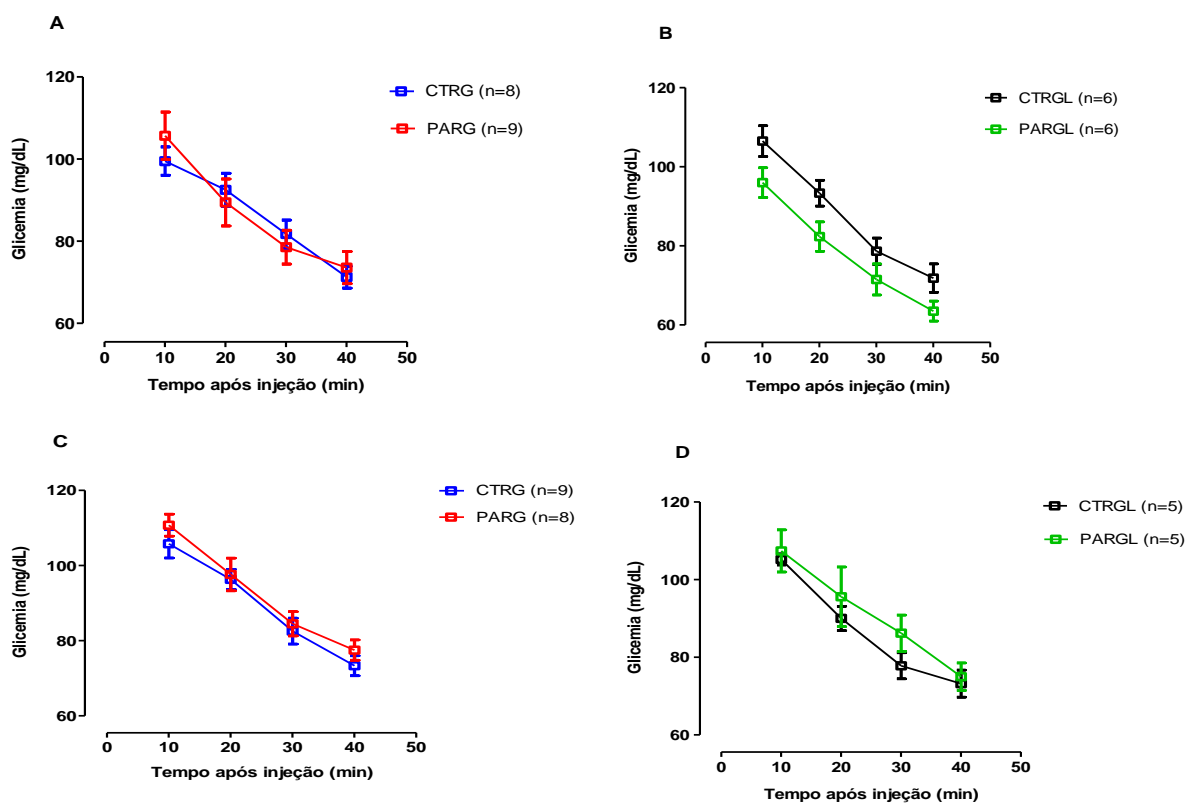
Fêmeas				
Grupos	Rmax		pD2	
	Ach	NPS	Ach	NPS
CTRG	90,15±3,70 (7)	94,11±2,77 (8)	7,38±0,15 (7)	6,51±0,10 (8)
PARG	91,50±1,74 (10)	94,09±0,81 (9)	7,59±0,05	6,64±0,06 (9)
CTRGL	89,83±1,52 (12)	96,16±0,90 (12)	7,45±0,07(12)	6,54±0,06(12)
PARGL	89,32±2,10 (10)	93,81±0,83 (11)	7,52±0,07	6,54±0,09 (11)

Resposta máxima (% de relaxamento) e pD2 a Ach a NPS em anéis de aortas isoladas de prole masculina e feminina exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL). Valores expressos como média ± EPM. (n=7-12/grupo). p>0,05 (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

4.2.3 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA

Como demonstrado na Figura 7, não houve diferença na porcentagem de decaimento da glicose (KITT) após a injeção de insulina na prole masculina e feminina adulta paracetamol (PARG ou PARGL) comparado aos seus respectivos grupos controles (CRTG ou CTRGL).

Figura 7 – Porcentagem de decaimento de glicose após injeção de insulina (kITT) em machos e fêmeas adultas expostas ao paracetamol ou água durante os períodos gestacional e gestacional e lactacional.



Porcentagem de decaimento de glicose após injeção de insulina (kITT) da prole feminina exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) (A) e gestacional e lactacional (GL) (B) e da prole masculina exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) (C) e gestacional e lactacional (GL) (D). Valores expressos como média \pm EPM. (n=5-9/grupo). $p > 0,05$ (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

4.2.4 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

Nenhuma diferença foi observada no peso corporal e índice de Lee da prole masculina e feminina adulta PARG e PARGL comparados aos seus controles (CTRG e CTRGL). Do mesmo modo, as gorduras retroperitoneal, perigonadal e marrom não apresentaram diferença entre os grupos em ambos os sexos (Tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação da obesidade da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL).

Machos				
Grupos	Índice de Lee	Tecido adiposo		
		Perigonadal (g/100g)	Retroperitoneal (g/100g)	marrom (g/100g)
CTRG	30,15± 0,99 (11)	0,84±0,07 (11)	1,06±0,05 (11)	0,06±0,01 (11)
PARG	29,94± 0,16 (12)	0,74±0,08 (12)	1,08±0,08 (12)	0,07±0,01 (12)
CTRGL	30,43± 0,39 (9)	0,69±0,06 (9)	0,97±0,04 (9)	0,07±0,01 (9)
PARGL	30,14± 0,36 (9)	1,00±0,07 (9)	0,73±0,12 (9)	0,06±0,01 (9)
Fêmeas				
Grupos	Índice de Lee	Tecido adiposo		
		Perigonadal (g/100g)	Retroperitoneal (g/100g)	marrom (g/100g)
CTRG	30,25± 0,23 (10)	0,43±0,05 (10)	0,62±0,08 (10)	0,08±0,01 (10)
PARG	30,43± 0,27 (11)	0,49±0,05 (11)	0,61±0,06 (11)	0,07±0,01 (11)
CTRGL	30,50± 0,28 (11)	0,43±0,04 (11)	0,64±0,07 (11)	0,08±0,01 (11)
PARGL	29,91± 0,16 (12)	0,36±0,29 (12)	0,53±0,04 (12)	0,09±0,01 (12)

Avaliação da obesidade da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL). Valores expressos como média ± EPM. (n=9-12/grupo). p>0,05 (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

4.2.5 MARCADORES HEPÁTICOS

Na fase adulta nenhuma diferença foi observada nas dosagens de transaminases (marcadores hepáticos) da prole masculina e feminina PARG e PARGL comparados aos seus controles (CTRG e CTRGL) (Tabela 5).

Tabela 5 – Dosagem transaminases hepáticas da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL).

Grupos	Machos		Fêmeas	
	AST	ALT	AST	ALT
CTRG	125,70±15,59 (6)	74,33±6,97 (6)	135,60±11,85 (6)	69,83±6,75 (6)
PARG	108,40±10,12 (5)	67,60±9,15 (5)	159,90±9,77 (6)	74,33±6,97 (6)
CTRGL	120,60±14,00 (5)	74,80±10,31 (5)	118,10±10,70 (6)	81,18±14,53 (6)
PARGL	112,70±15,46 (6)	73,60±5,75 (6)	148,30±20,94 (6)	83,08±14,40 (6)

Dosagem das transaminases hepáticas (AST e ALT) da prole masculina e feminina adulta exposta ao paracetamol (PAR) ou água (CTR) durante os períodos gestacional (G) e gestacional e lactacional (GL). Valores expressos como média ± EPM. (n=5-6/grupo). p>0,05 (Teste T). CTRG: controle gestacional; PARG: paracetamol gestacional CTRGL: controle gestacional e lactacional; PARGL: paracetamol lactacional e gestacional.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração de paracetamol (350mg/Kg/dia) às mães durante a gestação ou gestação e lactação não causou sinais de toxicidade às mães e seus filhos, uma vez que não interferiu no peso materno, peso ao nascer e tamanho da ninhada. Esses resultados reproduziram estudos anteriores de nosso grupo que usaram o mesmo modelo para exposição precoce ao paracetamol (KLEIN et al., 2020; RANGEL et al., 2019). A segurança do paracetamol em relação ao peso materno também foi descrita por Van Den Driesche e colaboradores (2015), que demonstraram que o tratamento com paracetamol - 350 mg / kg / dia - durante a gravidez em ratas Wistar não influencia o peso corporal de mães e filhotes. Similarmente aos nossos resultados, foi descrito que o tratamento com paracetamol (350 mg/kg/dia) do 13^o ao 21^o dia de gestação não afeta o tamanho da ninhada (KRISTENSEN et al., 2011b).

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo avaliando os efeitos cardiovasculares da exposição intrauterina e lactacional ao paracetamol em ratos adultos. Um estudo em gestantes demonstrou que o uso de paracetamol foi associado ao aumento do desenvolvimento de pré-eclâmpsia, tromboembolismo e hipertensão gestacional, que pode estar relacionado à disfunção endotelial por redução dos fatores de relaxamento endotelial, como IGP2 e NO (REBORDOSA et al., 2010). Além disso, ratos tratados com paracetamol (400 mg/kg/dia na água de beber) por 14 dias, apresentaram maior estresse oxidativo e comprometimento do vaso relaxamento endotélio-dependente e independente (PORTO et al., 2019). Apesar do trabalho descrito por Porto e colaboradores (2019) mostrar um prejuízo na resposta vasodilatadora, levando à disfunção endotelial, o tratamento com paracetamol não alterou a pressão arterial sistólica em ratos, corroborando com os nossos resultados. Assim, o presente estudo demonstrou que a exposição ao paracetamol, por meio de tratamento materno durante toda a gestação e lactação, não influenciou a função endotelial, a pressão arterial e a frequência cardíaca na prole.

Nós também demonstramos em ratos que a exposição ao paracetamol no início da vida não interferiu na deposição de tecido adiposo e no IMC de filhos adultos. De forma semelhante aos nossos resultados, os camundongos Kunming analisados no PND 21 não tiveram alteração no peso corporal após a

exposição ao paracetamol (300 mg / kg / dia) nos dias 13 e 14 de gestação (WU et al., 2016). Por outro lado, foi descrito em humanos que a exposição ao paracetamol durante a gravidez está associada à obesidade na idade de 3–5 anos e elevada concentração plasmática de lipídios (SORROW et al., 2019). Além de aumento do IMC em crianças e adolescentes (MURPHY et al., 2015) e sobrepeso em meninas aos 11 anos (LIEW et al., 2019).

No entanto, todos esses trabalhos descritos anteriormente sugerem a necessidade de mais estudos para investigar tais alterações metabólicas, pois estas podem estar associadas a fatores hormonais, período da adolescência, estilo de vida ou outros fatores de confusão. Além disso, as diferenças observadas entre nosso estudo e os demais podem estar relacionadas às espécies avaliadas (humanos vs ratos) e à idade de avaliação da prole (infância e adolescência vs PND 75-80, idade adulta).

Em relação às alterações no metabolismo da glicose, nossos resultados diferem dos descritos por Wu e colegas (2016), que demonstraram que os filhos expostos ao paracetamol apresentavam metabolismo da glicose alterado relacionado com a sinalização insulino-dependente. As diferenças entre o presente estudo e o citado podem ser devido às diferentes espécies (camundongos vs ratos), período de exposição à droga (DG 13 e 14 vs gravidez inteira e lactação), diferente dose de paracetamol (300 mg / kg / dia vs 350 mg/kg/dia) e período de análise (PND 21 vs PND 75-80).

Além disso, os nossos resultados demonstraram que a exposição intrauterina e lactacional ao paracetamol 350mg/kg/dia não causou hepatotoxicidade na prole adulta, pois não foi observado aumento dos marcados hepáticos (AST e ALT), que são indicadores de hepatotoxicidade (CIGREMIS et al., 2009). A dose máxima diária é de 4000 mg/dia (WATKINS et al., 2006), o que é equivalente a cerca de 400 mg/kg/dia para ratos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008). Ao contrário dos nossos resultados, estudos realizados em animais, onde os mesmos foram expostos ao paracetamol em níveis de doses terapêuticas, apresentaram elevação de 5 a 8 vezes nas transaminases hepáticas (CIGREMIS et al., 2009; WATKINS et al., 2006). As diferenças encontradas em nosso estudo e desses outros estudos citados, pode ser devido a diferença de tratamento, enquanto em nosso estudo os animais foram

expostos maternoalmente ao PAR 350mg/kg/dia esses outros estudos trataram os animais diretamente na fase adulta com o PAR. Corroborando com nossos resultados, camundongos expostos maternoalmente a PAR 300mg/kg/dia não apresentou diferença estatística na alanina aminotransferase (ALT) no PND 21 (WU et al., 2016).

Em resumo, nós demonstramos que a exposição intrauterina e lactacional ao acetaminofeno (350 mg/Kg/dia), apesar do tratamento materno, não foi capaz de causar distúrbios cardiovasculares e metabólicos em filhos adultos de ambos os sexos. Apesar de nossos resultados demonstrarem que a exposição ao paracetamol em fases iniciais da vida não causou doença cardiometabólica em ratos, nosso grupo e outros demonstraram que essa exposição pode causar deficiências comportamentais e reprodutivas (DEAN et al., 2016; KLEIN et al., 2020; LIND et al., 2016; RANGEL et al., 2019). Além disso, considerando que o paracetamol é um dos principais fármacos indicados para gestantes, pelo fato de ser de fácil acesso e pela escassez de estudos que avaliem as consequências cardiometabólicas da exposição precoce ao paracetamol, é importante recomendar novos estudos de avaliação dos parâmetros cardiovasculares em diferentes modelos e espécies animais.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi observado em ratos que a exposição ao paracetamol (350mg/Kg/dia) por meio de tratamento materno durante a gestação e lactação não foi tóxico para mães e para os filhotes. Além disso não interferiu na reatividade vascular, sensibilidade à insulina, deposição de tecido adiposo, pressão arterial e não apresentou aumento dos marcadores hepáticos na prole adulta masculina e feminina.

Esses dados sugerem que o protocolo de tratamento utilizado não causou alterações cardiovasculares e metabólicas que possam contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas na vida adulta.

REFERÊNCIAS

- ALEIXO, J. et al. Effect of paracetamol treatment on maternal care and reproductive outcomes in female rat offspring. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 32, n. 18, p. 1311–1325, 2020.
- ANDERSON, B. J. Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. **Paediatric Anaesthesia**, v. 18, n. 10, p. 915–921, 2008.
- ANDRADE, C. Use of acetaminophen (paracetamol) during pregnancy and the risk of autism spectrum disorder in the offspring. **J Clin Psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 152–154, 2016.
- AVELLA-GARCIA, C. B. et al. Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms. **International Journal of Epidemiology**, p. 1–9, 2016.
- AYOUB, S.; BOTTING, R. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proc Natl Acad Sci**, v. 101, p. 11165–11169, 2004.
- AYOUB, S. S.; FLOWER, R. J. Loss of hypothermic and anti-pyretic action of paracetamol in cyclooxygenase-1 knockout mice is indicative of inhibition of cyclooxygenase-1 variant enzymes. **European Journal of Pharmacology**, v. 861, n. August, p. 172609, 2019.
- BANNWARTH, B.; PÉHOURCQ, F. Pharmacological Rationale for the Clinical Use of Paracetamol. **Drugs**, v. 63, n. Special Issue 2, p. 5–13, 2003.
- BARKER, D. J. P. Intrauterine programming of adult disease. **Molecular Medicine**, 1995.
- BARROS, G. A. M. DE et al. The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study. **Brazilian Journal of Anesthesiology (English Edition)**, v. 69, n. 6, p. 529–536, 2019.
- BAUER, A. Z. et al. Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: A review. **Hormones and Behavior**, v. 101, n. October 2017, p. 125–147, 2018.
- BAUER, A. Z. et al. Paracetamol use during pregnancy — a call for precautionary action. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 0123456789, 2021.
- BEAULAC-BAILLARGEON, L.; ROCHELEAU, S. Paracetamol pharmacokinetics during the first trimester of human pregnancy. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 451–454, 1994.
- BLACK, R. A.; HILL, D. A. Over-the-counter medications in pregnancy. **Am. Fam. Physician**, v. 67, p. 2517–2524, 2003.
- BONNEFONT, J. et al. Mechanism of the antinociceptive effect of paracetamol. **Drugs**, v. 63, n. SPEC. ISS. 2, p. 1–4, 2003.
- BRANDLISTUEN, R. E.; YSTROM, E.; NULMAN, I. Prenatal exposure and child neurodevelopment; a sibling-controlled cohort study. **Int J Epidemiol**, v. 42, n. 6, p. 1702–1713, 2013.
- BYER, A. J.; SEMMER, J. R. Acetaminophen overdose in the third trimester of

- pregnancy. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 247, p. 3114–3115, 1982.
- CARVALHO, M. H. et al. Reactivity of aorta and mesenteric microvessels to drugs in spontaneously hypertensive rats: role of the endothelium. **Journal of hypertension**, v. 5, n. 3, p. 377–82, 1987.
- CERAVOLO, G. S. et al. Conjugated equine estrogen treatment corrected the exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341–346, 2013.
- CHAN, A. T. et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, acetaminophen, and the risk of cardiovascular events. **Circulation**, v. 113, n. 12, p. 1578–1587, 2006.
- CIGREMIS, Y. et al. The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 323, n. 1–2, p. 31–38, 2009.
- CURHAN, G. C. et al. Frequency of analgesic use and risk of hypertension in younger women. **Archives of Internal Medicine**, v. 162, n. 19, p. 2204–2208, 2002.
- DEAN, A. et al. Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. **Scientific reports**, v. 6, n. January, p. 19789, 2016.
- FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. The third pathway: endothelium-dependent hyperpolarization. **J Physiol Pharmacol.**, v. 50, n. 4, p. 525–534, 1999.
- FISHER, B. G. et al. Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. **Human Reproduction**, v. 31, n. 11, p. 2642–2650, 2016.
- FORMAN, J. P.; RIMM, E. B.; CURHAN, G. C. Frequency of analgesic use and risk of hypertension among men. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 4, p. 394–399, 2007.
- FULTON, R. L. et al. Acetaminophen use and risk of myocardial infarction and stroke in a hypertensive cohort. **Hypertension**, v. 65, n. 5, p. 1008–1014, 2015.
- FURGHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors *FASEB J.* v.3, n.9, p. 2007-2018, 1989. **FASEB J.**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, 1989.
- GLASSER, S. P.; KHODNEVA, Y. Should Acetaminophen Be Added to the List of Anti-Inflammatory Agents That Are Associated With Cardiovascular Events? **Hypertension**, v. 5, n. 65, p. 991–992, 2015.
- GLUCKMAN, P. D. et al. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 401–408, 2009.
- GRAHAM, G. G. et al. The modern pharmacology of paracetamol: Therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 201–232, 2013.
- GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Mechanism of Action of Paracetamol. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, p. 46–55, 2005.
- HIGASHI, C. M. et al. Does fish oil or folic acid prevent vascular changes in female

progeny caused by maternal exposure to fluoxetine? **Life Sciences**, v. 152, p. 165–170, 2016.

HINZ, B.; CHEREMINA, O.; BRUNE, K. Acetaminophen (paracetamol) is a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in man. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 2, p. 383–390, 2008.

HODGMAN, M. J.; GARRARD, A. R. A Review of Acetaminophen Poisoning. **Critical Care Clinics**, v. 28, n. 4, p. 499–516, 2012.

HOOVER, R. M.; HAYES, V. A.; ERRAMOUSPE, J. Association Between Prenatal Acetaminophen Exposure and Future Risk of Attention Deficit/Hyperactivity Disorder in Children. **Ann Pharmacother.**, v. 49, n. 12, p. 1357–1361, 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KLEIN, R. M. et al. Gestational exposure to paracetamol in rats induces neurofunctional alterations in the progeny. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 77, p. 106838, 2020.

KLINGER-GRATZ, P. P. et al. Acetaminophen relieves inflammatory pain through CB 1 cannabinoid receptors in the rostral ventromedial medulla. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 2, p. 322–334, 2018.

KOWIAŃSKI, P. et al. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 3, p. 579–593, 2018.

KRISTENSEN, D. M. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. **Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 235–244, 2011a.

KRISTENSEN, D. M. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. **Hum Reprod**, v. 26, n. 1, p. 235–244, 2011b.

KRISTENSEN, D. M. et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 3, p. 377–384, 2012.

LIEW, Z. et al. Maternal use of acetaminophen during pregnancy and risk of autism spectrum disorders in childhood: A Danish national birth cohort study. **Autism Research**, v. 9, n. 9, p. 951–958, 2016.

LIEW, Z. et al. Prenatal Exposure to Acetaminophen and Overweight in Childhood. **Obesity**, v. 27, n. 8, p. 1314–1322, 2019.

LIND, D. V. et al. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother–child pairs. **Human Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 1–9, 2016.

LUTZ, B. H. et al. Medication use among pregnant women from the 2015 pelotas (Brazil) birth cohort study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 3, p. 1–14, 2020.

MALLET, C. et al. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.

MAZALEUSKAYA, L. L. et al. PharmGKB summary: Pathways of acetaminophen

metabolism at the therapeutic versus toxic doses. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 25, n. 8, p. 416–426, 2015.

MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: Recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 9, p. 2174–2187, 2013.

MIRRASEKHIAN, E. et al. The antipyretic effect of paracetamol occurs independent of transient receptor potential ankyrin 1–mediated hypothermia and is associated with prostaglandin inhibition in the brain. **FASEB Journal**, v. 32, n. 10, p. 5751–5759, 2018.

MITCHELL, A. A. et al. Medication use during pregnancy, with particular focus on prescription drugs: 1976-2008. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 205, n. 1, p. 51.e1-51.e8, 2011.

MURPHY, R. et al. Association between paracetamol use in infancy or childhood with body mass index. **Obesity**, v. 23, n. 5, p. 1030–1038, 2015.

NOTARIANNI, L.; OLDHAM, H.; BENNETT, P. Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 1, p. 63–67, 1987.

NOVI, D. R. B. S. et al. Can maternal treatment with metformin during gestation and lactation cause metabolic and cardiovascular disorders in rat offspring? **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2018.

OECD. Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. n. October, 2007.

OECD Guideline for the testing of chemicals - Draft Proposal for a new Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity Study. **Organization for Economic**, v. 408, p. 1–25, 1998.

PHILIPPOT, G. et al. A single Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) dose during brain development affects markers of neurotropy, oxidative stress, and apoptosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. October, p. 1–9, 2019.

PORTO, H. K. P. et al. Exposure to acetaminophen impairs vasodilation, increases oxidative stress and changes arterial morphology of rats. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 7, p. 1955–1964, 2019.

PRZYBYŁA, G. W.; SZYCHOWSKI, K. A.; GMIŃSKI, J. Paracetamol – An old drug with new mechanisms of action. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 1, p. 3–19, 2021.

RANGEL, M. P. F. et al. Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring? **Reproductive Toxicology**, 2019.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**, v. 22, n. 3, p. 659–661, 2008.

REBORDOSA, C. et al. Use of acetaminophen during pregnancy and risk of preeclampsia, hypertensive and vascular disorders: a birth cohort study. **J Matern Fetal Neonatal Med**, v. 23, n. 5, p. 371–378, 2010.

RICE, K. M. et al. Chronic paracetamol treatment influences indices of reactive oxygen species accumulation in the aging Fischer 344 X Brown Norway Rat Aorta. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 42, n. 2, p. 152–161, 2012.

ROBERTS, E. et al. Paracetamol: Not as safe as we thought? A systematic literature review of observational studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 3, p. 552–559, 2016.

SAHAJWALLA, C. G.; AYRES, J. W. Multiple-dose acetaminophen pharmacokinetics. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 9, p. 855–860, 1991.

SCHENKEL, L. et al. Drugs in Pregnancy and Lactation - Medications Used in Swiss Obstetrics. **Zeitschrift fur Geburtshilfe und Neonatologie**, v. 222, n. 4, p. 152–164, 2018.

SERVEY, J.; CHANG, J. Over-the-counter medications in pregnancy. **American Family Physician**, v. 90, n. 8, p. 548–555, 2014.

SINCLAIR, KD; LEA, RG; REES, WD; YOUNG, L. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 64, p. 425–443, 2007.

SORROW, P. et al. Elevated metabolites of acetaminophen in cord blood of children with obesity. **Pediatric Obesity**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2019.

STANLEY, A. Y. et al. Contact Hours Over-the-Counter MEDICATIONS. **Wolters Kluwer Health**, v. 44, n. 4, 2019.

SUDANO, I. et al. Acetaminophen increases blood pressure in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 122, n. 18, p. 1789–1796, 2010.

THIELE, K. et al. Acetaminophen and pregnancy: Short- and long-term consequences for mother and child. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 97, n. 1, p. 128–139, 2013.

TURTLE, E. J.; DEAR, J. W.; WEBB, D. J. A systematic review of the effect of paracetamol on blood pressure in hypertensive and non-hypertensive subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1396–1405, 2013.

VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. **Science translational medicine**, v. 7, n. 288, p. 288ra80, 2015.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193–222, jun. 2009.

VOLQVARTZ, T. et al. Use of stimulants, over-the-counter and prescription drugs among Danish pregnant women. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 127, n. 3, p. 205–210, 2020.

WATKINS, P. B. et al. Aminotransferase elevations in healthy adults receiving 4 grams of acetaminophen daily: A randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 1, p. 87–93, 2006.

WEIGAND, U. W. et al. Assessment of biotransformation during transfer of propoxyphene and acetaminophen across the isolated perfused human placenta. **Pediatr Pharmacol (New York)**, v. 4, n. 3, p. 145–153, 1984.

WHITE, W. B. Cardiovascular effects of the cyclooxygenase inhibitors. **Hypertension**, v. 49, n. 3, p. 408–418, 2007.

WU, K. et al. Impact of perinatal exposure to acetaminophen on hepatocellular metabolic function in offspring. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 12, p. 5646–5652, 2016.

ZELOP, C. M. Is it time to re-evaluate our use of acetaminophen in certain sub-groups of pregnant women? **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 11, p. 761–762, 2008.

ZHAO, L.; PICKERING, G. Paracetamol metabolism and related genetic differences. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, n. 1, p. 41–52, 2011.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 7900-2017.82, 80/2017).



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 80/2017

Londrina, 14 de Junho de 2017.

Prezado (a) professor (a)


Certificamos que o projeto intitulado: "**Avaliação de efeitos reprodutivos e cardiovasculares na prole de mãe tratadas com paracetamol durante a gestação e lactação.**" protocolo CEUA nº 7900.2017.82 sob a responsabilidade de **Daniela Cristina Ceccato Gerardin Cantamessa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em reunião realizada em **30/05/2017**.

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

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

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

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


 Prof. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Daniela Cristina Ceccato Gerardin Cantamessa
 Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central do CCB
 C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB