



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA RIGOBELLO

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS MATERNOS
E NA PROLE**

Londrina
2020

CAMILA RIGOBELLO

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS MATERNOS
E NA PROLE**

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

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa.
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Estefânia Gastaldello
Moreira.

Londrina
2020

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

R572e Rigobello, Camila .
Exposição ao paracetamol durante a gestação e lactação em ratos: : avaliação de possíveis efeitos maternos e na prole / Camila Rigobello. - Londrina, 2020. 122 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa.
Coorientador: Estefânia Gastaldello Moreira.
Tese (Doutorado 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. Acetaminofeno - Tese. 2. Estresse oxidativo - Tese. 3. Toxicologia do neurodesenvolvimento - Tese. 4. Transtornos do neurodesenvolvimento - Tese. I. Barbosa, Décio Sabbatini . II. Moreira, Estefânia Gastaldello. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 615.9

CAMILA RIGOBELLO

**EXPOSIÇÃO AO PARACETAMOL DURANTE A
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO EM RATOS:
AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS MATERNOS
E NA PROLE**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. André Demambre Bacchi
Universidade Federal de Rondonópolis- UFR

Prof. Dr. Célio Roberto Estanislau
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Francis Fregonesi Brinholi
Universidade Norte do Paraná- UNOPAR

Prof. Dra. Graziela Sciantti Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 14 de Dezembro de 2020.

Dedico este trabalho a Deus, autor e princípio da vida que há em mim. À minha família, sobretudo meus pais, pelo apoio, compreensão e amor. Sem a força, exemplo e determinação proveniente de vocês, nenhuma conquista seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por todas as graças derramadas desde o meu nascer. Obrigada Jesus, por toda a proteção nas horas de estrada, por me afastar de todo o perigo e de qualquer tipo de imprudência em todos esses quilômetros percorridos. Obrigada minha Mãe Maria por vossa intercessão e meu anjo da guarda por vosso zelo.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Ciências da Saúde, por propiciar toda a estrutura e oportunizar a construção do meu saber.

Ao meu orientador Dr. Décio Sabbatini Barbosa não só pelo apoio e auxílio na execução desse trabalho, mas sobretudo pelo convívio e amizade. Obrigada prof!!!

À minha co-orientadora Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, pela qual tenho profunda admiração e carinho, não só pela dedicação e ensinamentos transmitidos durante a execução desse trabalho, mas sobretudo pelo exemplo de pessoa e humanidade. Quero expressar meu respeito e gratidão por sua amizade e total compreensão. Obrigada prof!!

À toda minha família agradeço o amor, força e cuidado, que um dia eu possa retribuir a vocês. Obrigada aos meus avós por me permitir dias de convívio preciosos que guardarei para sempre em meu coração. Obrigada aos meus tios e primos por todos os momentos de amor compartilhados. Obrigada aos meus pais, pelo sono interrompido em prol dessa conquista. Obrigada meu irmão, João, meu namorado Roger e minha psicóloga Juliana por todo o amor e apoio.

A todos do Laboratório de Pós-Graduação (LPG) do Hospital Universitário - UEL meu total agradecimento pelo auxílio, acolhimento e amizade, sobretudo à Denise, Pauli e Keiko. Com certeza, sem a leveza desse convívio, essa conquista seria mais difícil. Muito obrigada por toda a ajuda e contribuição, a todos os que me acompanharam nesses anos, registro meu agradecimento.

A todos do Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas do Departamento de Ciências Fisiológicas - UEL, sobretudo ao meu amigo Rodrigo Moreno Klein, aos acadêmicos Juliana Debiasi e Luis Ursini por toda a ajuda e esforços durante a execução desse trabalho. Sem o apoio de vocês, eu não conseguiria. Obrigada equipe!!

À professora Dra. Barbara Cristina Mazzucatto do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Maringá - Campus Umuarama pelo auxílio no processamento das amostras destinadas à análise histopatológica.

À Universidade Paranaense e todos os colaboradores com os quais pude contar nesses anos, muito obrigada pelo apoio durante a execução desse trabalho e amizade de cada um de vocês.

A todos os meus alunos pela compreensão do cansaço e pela ejeção de energia na forma de amor e acolhimento.

A todos meus amigos, obrigada pela compreensão de minha ausência em tantos momentos e pela força emanada para que essa etapa fosse concluída.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, o meu eterno agradecimento!!

“A vitória mais bela que se pode alcançar é a vitória sobre si mesmo.” Santo Inácio de Loyola

RIGOBELLO, Camila. **Exposição ao paracetamol durante a gestação e lactação em ratos:** avaliação de possíveis efeitos maternos e na prole. 2020. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Paracetamol (PAR) é um analgésico e antipirético empregado nas diferentes fases da gestação e lactação, uma vez que seu uso é considerado seguro pelas agências regulatórias. A livre passagem pela barreira placentária e a excreção pelo leite materno permitem que esse fármaco alcance fetos/neonatos em desenvolvimento. Estudos epidemiológicos populacionais descrevem que o uso pré-natal do PAR aumenta o risco para transtornos do neurodesenvolvimento, tais como, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) e transtornos do espectro autista (TEA). Nos estudos populacionais, o fraco controle das variáveis não permite o estabelecimento de relações de causalidades. Assim, a presente pesquisa objetivou avaliar, em ratos, os possíveis efeitos do PAR quando utilizado durante a gestação e lactação sobre o comportamento e marcadores do estresse oxidativo da prole. Ratas prenhes receberam, por gavagem, PAR (35 ou 350 mg/kg) ou água a partir do dia gestacional 6 até o desmame (dia pós-natal – DPN 21). A toxicidade geral foi avaliada pelo acompanhamento do peso corporal materno e da prole. O comportamento da prole foi avaliado através do teste de busca pelo ninho (DPN 10), estereotipia comportamental (DPN 27), teste de três câmaras de sociabilidade e teste do campo aberto (DPN 28). A concentração de glutatona reduzida (GSH), hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e a atividade da superóxido dismutase (SOD) foram determinadas no córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo dos filhotes com 22 dias. Além disso, na mãe e em filhotes (DPN 22) foi determinada a atividade sérica da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT), enquanto que, no fígado desses animais foram verificados os níveis de AOPP e GSH, e possíveis alterações histopatológicas. A exposição ao PAR não afetou as medidas de toxicidade geral. A exposição perinatal ao PAR (350 mg/kg) aumentou a intensidade de estereotipia comportamental induzida por apomorfina e a locomoção no campo aberto (35 mg/kg), ambos em machos. Ainda, reduziu a atividade exploratória no teste de três câmaras de sociabilidade (350 mg/kg) em ambos os sexos. O tratamento na menor dose testada diminuiu a concentração de GSH no hipocampo e a atividade de SOD no estriado. Mães expostas a ambas as doses do PAR apresentaram aumento da atividade de AST na ausência de alterações nos marcadores de estresse oxidativo hepático e na análise histopatológica do fígado, bem como na atividade de ALT em soro. Devido à presença de AST em outros órgãos, os resultados sugerem lesões extrahepáticas advindas da exposição ao PAR. Portanto, os dados indicam potencial neurotoxicidade do desenvolvimento do PAR. Hipocampo e estriado mostraram-se mais vulneráveis ao desequilíbrio redox e filhotes machos mais susceptíveis às alterações bioquímicas e comportamentais comparados às fêmeas. Tais observações podem ser relevantes para estudos de transtornos do neurodesenvolvimento em humanos.

Palavras-chave: acetaminofeno; estresse oxidativo; neurodesenvolvimento; toxicologia do desenvolvimento; transtornos do neurodesenvolvimento.

RIGOBELLO, Camila. **Exposure to paracetamol during pregnancy and lactation in rats:** assessment of possible effects in dams and their offspring. 2020. 122 f. Thesis (Doctoral degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Paracetamol (PAR) is an analgesic and antipyretic used in different phases of pregnancy and lactation, since it is considered safe by the regulatory agencies. The distribution through the placental barrier and its excretion through the breast milk allow this drug to reach the developing fetuses/neonates. Population-based studies reported that prenatal exposure to PAR increases the risk for developmental disorders, such as attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorders (ASD). In this type of epidemiological studies, the poor control of variables does not allow the establishment of causal relationships. This research aimed to evaluate the possible effects of PAR exposure during pregnancy and lactation on behavioral and oxidative stress markers in the progeny. Dams were gavaged with PAR (35 or 350 mg/kg) or water from gestational day 6 until weaning (postnatal day – PND - 21). General toxicity was evaluated through maternal and offspring body weight gain. Behavioral evaluation of the progeny included nest seeking test (PND 10), behavioral stereotypy (PND 27), three-chamber sociability test and open field test (PND 28). Reduced glutathione (GSH), lipid hydroperoxides (LOOH), advanced oxidation protein products (AOPP) and superoxide dismutase activity (SOD) were quantified in the prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum of the 22-day-old pups. Moreover, serum activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) as well as hepatic levels of AOPP and GSH and histopathology were evaluated in dams and pups (PND 22). PAR exposure did not affect animal's weight gain but it increased the intensity of apomorphine-induced stereotyped behavior (350 mg/kg) and locomotion in the open field test (35 mg/kg) in males. In contrast, reduced exploratory activity in the three-chamber sociability test (350 mg/kg), hippocampal GSH content (35 mg/kg) and striatal SOD activity (35 mg/kg) were observed in both sexes. Dams treated with PAR showed increased AST activity in the absence of alterations in hepatic oxidative stress markers, histopathology, as well as, in serum ALT activity. Due to the presence of AST in different organs, the results suggest extrahepatic lesions triggered by PAR treatment. In conclusion, data indicated potential developmental neurotoxicity of PAR, with the hippocampus and striatum being more vulnerable to redox imbalance and male pups being more susceptible than females. These observations can be relevant for studies of neurodevelopmental disorders in humans.

Keywords: acetaminophen; development toxicology; neurodevelopment; neurodevelopmental disorders; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diagrama do delineamento experimental empregado.....	33
-------------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos experimentais que avaliaram, em roedores, efeitos centrais decorrentes da exposição perinatal ao PAR.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos avançados de oxidação proteica
AST	Aspartato aminotransferase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE	Barreira hematoencefálica
CB	Cerebelo
CB1	Receptores canabinoides do tipo 1
COX	Ciclo-oxigenase
CPF	Córtex pré-frontal
DAMPs	Liberação de padrões moleculares associados a danos
DG	Dia gestacional
DL	Dia lactacional
DPN	Dia pós-natal
EO	Estresse oxidativo
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
HPC	Hipocampo
LOOH	Hidroperóxidos lipídicos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAPQI	N-acetil-p-benzo-quinona imina
PAR	Paracetamol
RMANOVA	Análise de variância para medidas repetidas
SIRT1	Inibição dos níveis da proteína sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
ST	Estriado
TDAH	Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade
TEA	Transtorno do espectro autista
TRPA1	Receptor de potencial transitório anquirina do tipo 1
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloides tipo 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DO PARACETAMOL	16
1.2	MECANISMO DE AÇÃO DO PARACETAMOL	16
1.3	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE FETOS E NEONATOS HUMANOS AO PAR.....	18
1.4	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE FETOS E NEONATOS ANIMAIS AO PAR.....	21
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO RELACIONADO AO USO DO PAR	28
1.6	ASPECTOS CRÍTICOS DA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO DESENVOLVIMENTO EM ANIMAIS	30
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1	DELINEAMENTO	33
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
3.3	ANIMAIS E TRATAMENTO.....	33
3.4	AMOSTRAS TECIDUAIS MATERNAS E DA PROLE	35
3.5	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	35
3.5.1	Teste da Busca pelo Ninho (Discriminação Olfatória)	36
3.5.2	Teste do Comportamento Estereotipado.....	36
3.5.3	Teste do Campo Aberto	36
3.5.4	Teste de Sociabilidade (Preferência Social).....	37
3.6	DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS SÉRICOS.....	37
3.7	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
3.7.1	Preparo do Homogenato de Tecido Encefálico	37
3.7.2	Preparo do Homogenato de Tecido Hepático	38
3.7.3	Quantificação de Proteínas Totais	38
3.7.4	Determinação de Produtos de Oxidação Proteica (AOPP)	38
3.7.5	Determinação de Glutathiona Reduzida (GSH).....	39
3.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO	40
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	ARTIGO 1	42
4.2	ARTIGO 2	73
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE	113
	APÊNDICE A- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO ENCEFÁLICO	114
	APÊNDICE B- DETERMINAÇÃO DE PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA EM TECIDO ENCEFÁLICO E HEPÁTICO DE RATOS (ADULTOS E FILHOTES)	116
	APÊNDICE C- DETERMINAÇÃO DE GLUTATIONA REDUZIDA EM TECIDO ENCEFÁLICO E HEPÁTICO DE RATOS (ADULTOS E FILHOTES).....	118
	APÊNDICE D- DETERMINAÇÃO DE HIDROPERÓXIDO LIPÍDICO EM TECIDO ENCEFÁLICO RATOS (ADULTOS E FILHOTES) POR QUIMIOLUMINESCÊNCIA.....	120
	APÊNDICE E- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDO ENCEFÁLICO DE RATOS (ADULTOS E FILHOTES)	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais do Paracetamol

Paracetamol (PAR), também denominado acetaminofeno ou N-(4-hidroxifenil) etanamida, está inserido na lista de medicamentos isentos de prescrição médica e encontra-se comercialmente disponível na sua forma isolada ou associado a outros fármacos (BRASIL, 2016). De fácil acesso à população, é regularmente utilizado por automedicação (MOREIRA DE BARROS et al., 2019). 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). O reflexo da sua ampla utilização é resultado da ausência de alternativas farmacológicas com perfil de segurança similar para esse grupo específico, uma vez que a ingestão do PAR é considerada segura (categoria B pela agência *Food and Drugs Administration*) em gestantes (TODA, 2017) e lactantes (SPIGSET; HÄGG, 2000).

Após sofrer absorção no duodeno, três vias principais estão envolvidas na metabolização hepática do PAR, tais como, glicuronidação (52–57%), sulfatação (30–44%) e oxidação (5%) (ZHAO; PICKERING, 2011). A fração conjugada é excretada na urina devido ao caráter hidrofílico dos metabólitos de fase II (PAR-glicoronídeo e PAR-sulfato). Entretanto, a fração que sofre metabolização de fase I por ação das enzimas do citocromo P450 (especialmente a CYP2E1) gera um metabólito intermediário reativo denominado N-acetil-p-benzo-quinona imina (NAPQI). Esse metabólito sofre destoxificação pela glutathione, uma molécula com potencial redutor. Em situações de superdosagem, em virtude da saturação das vias de metabolização por glicuronidação e sulfatação, uma fração maior do fármaco é direcionada para biotransformação pelas enzimas CYP. Desta forma, a depleção dos estoques de glutathione acarreta em menor destoxificação de NAPQI com consequentes danos às células hepáticas (necrose centrolobular), alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e formação de adutos de proteínas (MAZALEUSKAYA et al., 2015; MCGILL; JAESCHKE, 2013).

1.2 Mecanismo de ação do PAR

PAR tem efeito analgésico e antipirético similar aos inibidores seletivos da COX-2 e aos anti-inflamatórios não esteroidais, no entanto diferente

destes, possui fraca atividade anti-inflamatória (GRAHAM et al., 2013). Embora o mecanismo de ação exato do PAR não seja completamente elucidado, acredita-se que as propriedades farmacológicas desse composto ativo são resultados da atuação central e 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 (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 (GRAHAM et al., 2013; ANDERSON, 2008). Porém, devido à fraca inibição da COX-1 e 2, sugere-se associação da ação farmacológica do PAR com a redução dos estoques de glutathione durante a metabolização e consequente redução na síntese das prostaglandinas, uma vez que a glutathione é cofator para a manutenção das atividades da COX-1 e 2 envolvidas no processo inflamatório (GRAHAM; SCOTT, 2005).

De outra parte, 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, o PAR ativa os receptores de potencial transitório do tipo 1 (TRPA1) que promovem o quadro de hipotermia verificado após o uso desse fármaco (MIRRASEKHIAN et al., 2018).

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 (MALLET et al., 2010). Além disso, este metabólito intermediário aumenta a disponibilidade de endocanabinoides mediante a inibição da recaptação e da degradação destes compostos. Consequentemente, há

ativação dos receptores canabinoides 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 (BDNF) (PHILIPPOT et al., 2019) com reflexos na neurogênese e plasticidade sináptica (KOWIAŃSKI et al., 2018).

1.3 Efeitos da exposição de fetos e neonatos humanos ao PAR

Estudos ex-vivos demonstram que o PAR e seus metabólitos de fase II atravessam a placenta com maior taxa de fluxo no sentido materno-fetal devido à anatomia das vilosidades placentárias durante o desenvolvimento deste anexo embrionário. Difusão passiva é o mecanismo de transporte do PAR pela placenta, enquanto que os metabólitos necessitam de transportadores uma vez que o caráter hidrofílico reduz as taxas de transferência entre os compartimentos materno-fetal (CONINGS et al., 2019). A excreção deste fármaco no leite materno atinge níveis apicais após 1-2 horas da administração, com detecção dos metabólitos deste composto ativo na urina dos lactentes (LACTMED, 2018).

A permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) de fetos e neonatos a substâncias apolares de baixo tamanho molecular, a maior vulnerabilidade do encéfalo imaturo a fármacos maternalmente ingeridos que atravessam a placenta e são excretados no leite materno, tais como PAR, podem desencadear danos celulares e elevar os riscos do aparecimento de transtornos do neurodesenvolvimento em descendentes. É importante ressaltar que há controvérsias sobre a imaturidade da BHE ou de sua ausência durante as fases do desenvolvimento humano, uma vez que há estudos que relatam a presença de uma BHE funcional durante as fases embrionárias com mecanismos de influxo/efluxo e células endoteliais fortemente unidas (*tight-junctions*). A falta de clareza e completo entendimento nos processos de defesa do tecido nervoso em desenvolvimento frente a substâncias e a baixa disponibilidade de informações sobre os perfis de segurança de compostos maternalmente ingeridos, contribuem para o desconhecimento de potenciais efeitos deletérios de fármacos em fetos e neonatos

expostos (EK et al., 2012; JOHANSSON et al., 2008; SAUNDERS; LIDDELOW; DZIEGIELEWSKA, 2012, SAUNDERS et al., 2019).

A constatação de possíveis ações do PAR como desregulador hormonal amplia o alerta para o potencial risco de transtornos do neurodesenvolvimento relacionado ao uso durante a gestação e lactação. Isso porque, o neurodesenvolvimento de mamíferos é sensível à desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, pois depende da homeostase dos hormônios tireoidianos (JUGAN; LEVI; BLONDEAU, 2010), com influências significativas na neurogênese e nos processos de diferenciação, migração e conectividade neural (GHASSABIAN; TRASANDE, 2018). A programação fetal é prejudicada pelas alterações tireoideanas maternas, e em virtude de seu papel regulador no desenvolvimento humano, este desequilíbrio hormonal aumenta o risco de transtornos do neurodesenvolvimento, doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e hipertensão (ANDERSEN et al., 2017). Além do prejuízo no desenvolvimento de tecidos, o uso de desregulador hormonal em gestantes e lactantes pode alterar a atividade neuroendócrina e o controle da sinalização hormonal (NESAN; KURRASCH, 2020). Indivíduos expostos prenatalmente a esses compostos parecem apresentar maior susceptibilidade a efeitos deletérios induzidos pela exposição por outras substâncias químicas ao longo da vida (ANDERSEN et al., 2017).

Estudos disponíveis na literatura descrevem a relação entre exposição gestacional ao PAR e aumento do risco para diagnóstico de transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), transtorno do espectro autista (TEA) (JI et al., 2020; MASARWA et al., 2018) e sintomas de hiperatividade (MASARWA et al., 2018). Impactos nos aspectos psicométricos (THOMPSON et al., 2014), atraso no desenvolvimento da fala (BORNEHAG et al., 2018), prejuízo na função executiva e problemas comportamentais (RIFAS-SHIMAN et al., 2020) observados nas crianças estão relacionados com a exposição perinatal a este fármaco. Recentemente, observou-se efeito significativo do sexo sobre os resultados deletérios da exposição *in utero* ao PAR. Problemas emocionais e de hiperatividade/desatenção foram detectadas de forma significativa somente em crianças do sexo masculino, principalmente aos 6 anos de idade, expostas no período gestacional (TOVO-RODRIGUES et al., 2018). Do mesmo modo, Avella-Garcia e colaboradores (2016) observaram significativa associação entre a exposição pré-natal ao PAR e sintomas

do TEA em crianças do sexo masculino (idades de 1 e 5 anos). Os autores acreditam que a desregulação androgênica acarretada por PAR aumenta a susceptibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento aos agentes agressores. Ainda, Bauer e Kriebel (2013) verificaram correlação entre os elevados índices de TEA em crianças do sexo masculino e a taxa de circuncisão de oito países. Sugerem que a diferença de acometimento entre os sexos possa ser resultado do uso de PAR durante este procedimento específico realizado na primeira infância, já que este fármaco é altamente empregado neste tipo de intervenção para promover a anagelsia.

É importante salientar que estudos em humanos podem apresentar como limitação o viés de memória (HASSAN, 2005), uma vez que acessam retrospectivamente crianças expostas ao PAR *in utero* a partir dos relatos das mães. Dessa forma, há dificuldades na coleta de dados fidedignos acerca das doses e tempo de exposição. No entanto, apesar de tais limitações, verificam-se na literatura achados deletérios significativamente influenciados pela frequência de uso do PAR e o estágio do desenvolvimento nos quais indivíduos foram maternalmente expostos

A exposição de longa duração (> 20 semanas) durante a gestação foi associada com aumento do risco para diagnóstico de TEA e sintomas hipercinéticos nos descendentes (LIEW et al., 2016a), bem como, de atrasos nos marcos do desenvolvimento motor e prejuízo nas habilidades de comunicação (≥ 28 dias) (BRANDLISTUEN et al., 2013; VLENTERIE et al., 2016). Ainda, exposição gestacional ao PAR por longa duração (22 a 28 dias) foi relacionada com o aumento do risco de TDAH, porém, com associação negativa quando uso a curto prazo (menor do que 8 dias) (YSTROM et al., 2017). O uso de curta duração (1 a 27 dias) do PAR foi também associado a prejuízos motores em crianças de até 3 anos (BRANDLISTUEN et al., 2013).

A etapa do desenvolvimento humano ao qual se dá a exposição influencia nos desfechos decorrentes do emprego deste fármaco em grávidas e lactantes. O uso do PAR durante o primeiro trimestre de gestação está relacionado com a diminuição do índice de peso corpóreo, paridade, idade gestacional e peso ao nascimento (BREMER et al., 2017), bem como, prejuízo da atenção total e função executiva (LIEW et al., 2016b). Elevado risco de diagnósticos de TDAH ou transtornos hipercinéticos nos descendentes reforçam os malefícios do uso do PAR no primeiro trimestre de gestação (LIEW et al., 2014). Exposição entre a 18^a e 32^a

semanas está relacionada com problemas de conduta e sintomas de hiperatividade, enquanto que o uso na 32ª semana de gestação também apresentou associação com alterações emocionais e no escore de dificuldade total, que considera sintomas emocionais, problemas de conduta, hiperatividade e problemas de relacionamento com colegas (STERGIAKOULI; THAPAR; SMITH, 2016). A exposição no terceiro trimestre de gestação está relacionada com problemas nos comportamentos internalizante e externalizante nas crianças (TRØNNES et al., 2020). No entanto, há resultados contraditórios na literatura, uma vez que não foram observadas alterações no neurodesenvolvimento ou problemas emocionais em crianças de 24 e 48 meses expostas *in utero* ao PAR (TOVO-RODRIGUES et al., 2020). Tais constatações comprovam a necessidade de mais estudos sobre o perfil de segurança desse fármaco em gestante e lactantes.

1.4 Efeitos da exposição de fetos e neonatos roedores ao PAR

O recrutamento de gestantes em estudos clínicos se defronta com questões bioéticas e com a vulnerabilidade desse grupo a possíveis efeitos teratogênicos. Conseqüentemente, há poucas informações sobre o perfil de segurança de medicamentos disponíveis comercialmente quanto à sua empregabilidade durante o período gestacional e lactacional. Assim, a ausência de protocolos de tratamento para gestantes e lactantes e os desconhecidos efeitos deletérios aos descendentes, sobretudo os de longo prazo, conferem ao prescritor a avaliação da viabilidade do tratamento (HEYRANA; BYERS; STRATTON, 2018). No entanto, em virtude da necessidade de alternativas terapêuticas seguras e considerando o direito à saúde materna/fetal, estudos disponíveis na literatura, encorajam a participação de gestantes em ensaios clínicos em consentimento parental (pai e mãe) do feto (van der GRAAF et al., 2018; HEYRANA; BYERS; STRATTON., 2018; KAYE, 2019; STRÖMMER et al., 2018; TURNER; KENNY; ALFIREVIC, 2019). Como há opiniões controversas sobre essa temática, modelos animais podem fornecer informações úteis sobre possíveis impactos na prole decorrente do uso materno de fármacos (KLEVEN; BELLINGER, 2019; YANAI; VIGODA; ORNOY, 2019).

A Tabela 1 apresenta trabalhos que avaliaram possíveis efeitos deletérios no tecido nervoso e impactos comportamentais da prole maternalmente exposta ao PAR. É possível observar que em ratos, a exposição perinatal ao PAR

está associada com alterações comportamentais que incluíram prejuízos na cognição, nas habilidades motoras e sociais (BLECHARZ-KLIN et al., 2018). Alterações em comportamentos exploratório e de habituação também são identificadas em animais expostos nos 3º e 10º dias pós-natais (DPN). Tais achados não são verificados em animais expostos no DPN 19, fase que corresponde ao terceiro trimestre de gestação em humanos. Desta forma, como verifica-se que a fase do desenvolvimento do animal ao qual se dá a exposição influencia nos resultados obtidos, demanda-se maiores investigações para determinar se o PAR constitui uma alternativa terapêutica segura em algum período gestacional (PHILIPPOT et al., 2017). Além disso, significativas alterações comportamentais na prole decorrentes do uso do PAR durante a gestação (350 mg/kg/dia do dia gestacional - DG 6 até parto) são recentemente relatadas por nosso grupo de pesquisa, tais como, diminuição da percepção olfatória (DPN 10), aumento do comportamento estereotipado induzido pela apomorfina (DPN 27), hiperatividade em fêmeas (DPN 28) e redução da emocionalidade (DPN 29) (KLEIN et al., 2020).

Em camundongos neonatos (DPN 10) verifica-se maior concentração do PAR no encéfalo que no soro (VIBERG et al., 2014), o que comprova o alcance deste fármaco no tecido nervoso central. Em conjunto, impactos bioquímicos e variações no sistema de monoaminas em várias regiões do encéfalo advindas do uso desse fármaco são observados. Ratos expostos a baixas doses (5 mg/kg/dia, do DG 0 ao DPN 60) apresentam aumento na concentração de dopamina e seus metabólitos ácido homovalínico (HVA) e ácido 3,4- diidroxifenilacético (DOPAC) no hipotálamo cujo efeito demonstra ser dose-dependente. Porém, verifica-se diminuição das concentrações de metabólitos de noradrenalina (BLECHARZ-KLIN et al., 2019). Flutuações nas concentrações dos produtos finais do catabolismo serotoninérgico (ácido 5-hidroxiindoleacético-5-HIAA) e noradrenérgico (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol-MHPG) também são relatadas no cerebelo de ratos em decorrência do uso do PAR (15 mg/kg/dia, do DG 0 ao DPN 60), achado este, que pode justificar os prejuízos cognitivos e emocionais provocados por este fármaco (BLECHARZ-KLIN et al., 2016). Impactos nas concentrações de serotonina, noradrenalina e dopamina no bulbo frente à exposição perinatal ao PAR reforçam a presença de alterações bioquímicas em outras partes do encéfalo, como no tronco encefálico. Sugere-se que o tecido nervoso em desenvolvimento tenha a liberação e recaptção de monoaminas prejudicada pela exposição ao PAR que inibe a

atividade de enzimas envolvidas nesse processo, tais como Na^+/K^+ ATPase e Mg^{++} ATPase (BLECHARZ-KLIN et al., 2015).

Exposição ao PAR em períodos críticos do neurodesenvolvimento altera os níveis do BDNF, importante neurotrofina para o desenvolvimento encefálico, e resulta em alterações comportamentais na fase adulta. Constata-se que o PAR diminui significativamente a concentração de BDNF no estriado nas doses de 5 e 15 mg/kg/dia (DG 0 ao DPN 60) (BLECHARZ-KLIN et al., 2018), aumenta no córtex frontal e reduz no córtex parietal de neonatos expostos (30 + 30 mg no DPN 10). Como o BDNF atua no neurodesenvolvimento, tais flutuações podem desencadear prejuízos neste processo e acarretar alterações comportamentais relacionadas à ansiedade nos animais adultos expostos (VIBERG et al., 2014). Apesar disso, SAAD e colaboradores (2016) não descrevem alterações no volume de áreas cerebrais ou na atividade locomotora na prole exposta.

Alterações hormonais foram observadas em animais ratos neonatos expostos a 350 mg/Kg de PAR no DPN 20 a 40, com significativa desregulação no eixo tireoide-fígado, que além de acarretar problemas hepáticos e hipotireoidismo, ocasiona um desequilíbrio redox (AHMED, 2019). Exposição perinatal a este fármaco também afeta outros hormônios envolvidos na diferenciação sexual hipotalâmica, com impactos significativos na prole masculina, sobretudo no comportamento sexual, na concentração de testosterona e no volume dos testículos (PEREIRA et al., 2020). Ademais, fêmeas expostas maternalmente apresentam sintomas semelhantes à síndrome da insuficiência ovariana prematura observada em humanos (ARENDRUP et al., 2017).

Tabela 1. Estudos experimentais que avaliaram, em roedores, efeitos centrais decorrentes da exposição perinatal ao PAR.

Autores	Espécies/ Exposição	Doses/ Via de administração	Parâmetros avaliados na prole	Resultados
BLECHARZ- KLIN et al., 2018	Ratos Wistar	5 mg/kg/dia 15 mg/kg/dia	DPN 60: - Comportamento social e memória episódica - Concentração de BDNF no hipocampo, córtex pré-frontal e estriado	<u>Dose 15 mg/kg/dia</u> - Menor interação social e comportamento exploratório - Aumento do comportamento de defesa - Prejuízos sutis nas funções cognitivas
	DG 0 ao DPN 60	Oral		
PHILIPPOT et al., 2017	Camundongos NMRI	Dose dupla (30+ 30 mg/kg entre 4 h)	DPN 60 - Comportamento espontâneo (locomoção, exploração e atividade total)	<u>Ambas doses</u> - Diminuição da concentração estriatal de BDNF <u>DPN 3 e 10</u> - Diminuição do comportamento exploratório (locomoção e levantar)
		DPN 3; 10 ou 19		
KLEIN et al., 2020	Ratos Wistar	350 mg/kg/dia	- Percepção olfatória (DPN 10) DPN 27-29 - Comportamentos estereotipado, social, exploratório, locomotor - Estado de ansiedade - Nocicepção - Concentração de BDNF, GSH e LOOH no córtex pré-frontal e hipocampo	- Diminuição da percepção olfatória com prejuízo na interação social (filhote-mãe) - Aumento do comportamento estereotipado - Diminuição da emocionalidade em ambiente aversivo - Hiperatividade em fêmeas
	DG 6 ao parto	Gavage oral		

continuação

Autores	Espécies/ Exposição	Doses/ Via de administração	Parâmetros avaliados na prole	Resultados
VIBERG et al., 2014	Camundongos NMRI	Dose única (30 mg/kg) Dose dupla (30+ 30 mg/kg entre 4 h) Subcutânea	DPN 60-70 - Concentração do PAR no encéfalo - Concentração de BDNF no córtex frontal e parietal, hipocampo - Comportamento espontâneo (locomoção, exploração e atividade total) e de ansiedade, aprendizagem espacial, resposta analgésica do PAR	<u>Dose dupla</u> - Diminuição da atividade locomotora e da aprendizagem espacial (função cognitiva) - Diminuição de resposta do animal adulto ao PAR (menor efeito analgésico e ansiolítico)
BLECHARZ- KLIN et al., 2019	Ratos Wistar	5 mg/kg/dia 15 mg/kg/dia Oral	DPN 60 - Concentração de dopamina, serotonina e noradrenalina e seus metabólitos no hipotálamo	<u>5 mg/kg/dia</u> - Aumento da concentração de dopamina e metabólitos - Diminuição dos metabólitos de noradrenalina - Diminuição das concentrações de ácido glutâmico (induz liberação do hormônio liberador do hormônio luteinizante)
BLECHARZ- KLIN et al., 2016	Ratos Wistar	5 mg/kg/dia 15 mg/kg/dia Oral	DPN 60 - Níveis de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina) e seus metabólitos no cerebelo	<u>5 mg/kg/dia</u> - Aumento da concentração do metabólito de serotonina <u>15 mg/kg/dia</u> - Aumento da concentração do metabólito de noradrenalina

continuação

Autores	Espécies/ Exposição	Doses/ Via de administração	Parâmetros avaliados na prole	Resultados
BLECHARZ -KLIN et al., 2015	Ratos Wistar	5 mg/kg/dia 15 mg/kg/dia	DPN 60 - Concentração de monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina) e seus metabólitos no bulbo	<u>5 mg/kg/dia</u> - Diminuição da concentração de alanina
	DG 0 ao DPN 60	Oral		<u>15 mg/kg/dia</u> - Elevação da concentração de serotonina - Diminuição da concentração de dopamina - Aumento da taxa de utilização da noradrenalina <u>Ambas doses</u> - Diminuição da concentração de noradrenalina e do metabólito de dopamina
SAAD et al., 2016	Camundongos CD1	150 mg/kg/dia	DPN 30 - Locomoção - Morfologia de 29 áreas encefálicas	- Ausência de diferenças significativas
SCHULTZ et al., 2011	DG 7 ao DPN 0	Gavage oral	- Viabilidade de células nervosas	- Não foram observadas diferenças em nenhuma das concentrações de PAR - Menor viabilidade celular após exposição a 1 a 100 µg/ mL de p-aminofenol e anandamida
	Neurônios corticais de ratos C5BL/6	1, 5, 50 e 100 µg/ mL de p- aminofenol, PAR, anandamida <i>In vitro</i> por 24 h		
	Dia embrionário 15			

continuação

Autores	Espécies/ Exposição	Doses/ Via de administração	Parâmetros avaliados na prole	Resultados
PHILIPPOT et al., 2018	Camundongos NMRI	PAR -30 mg/kg -30+ 30 mg/kg entre 4 h Combinação -30 mg PAR + 1 mg agonista CB-1/ kg -30 mg PAR , intervalo de 4 h, 30 mg do PAR +1 mg agonista CB-1/ kg <hr/> Subcutânea	DPN 60 - Comportamento espontâneo (locomoção, exploração e atividade total)	<u>Dose dupla de PAR</u> <u>Combinação em dose única</u> <u>Combinação em dose dupla</u> - Diminuição da atividade locomotora, comportamento exploratório em relação aos controles mas com aumento destas após os 20 min (40 e 60 min)
HAY- SCHMIDT et al., 2017	Camundongos C57BL/JBom Tac	PAR 50 mg/ mg/ dia 150 mg/kg/dia Anilina 30 mg/ mg/ dia 90 mg/kg/dia <hr/> Gavagem oral	DPN 90-100 - Determinação do número de células no núcleo dimórfico sexual DPN 60 - Comportamento urinário, sexual e agressividade (8 semanas de idade)	<u>150 mg/kg/dia do PAR</u> - Diminuição do número de células no núcleo dimórfico sexual - Prejuízo no comportamento sexual dos machos <u>90 mg/kg/dia de anilina</u> - Diminuição do número de células no núcleo dimórfico sexual em machos

Ainda, verifica-se que o metabólito intermediário (AM404) diminui a viabilidade *in vitro* de neurônios corticais de ratos em concentração similar ao agonista endógeno anandamida (1 a 100 µg/mL por 24 horas). Esse resultado indica que o mecanismo de morte celular provocado pela exposição ao PAR envolve a ativação do sistema endocanabinoide. É importante salientar que neste estudo não se observa morte *in vitro* significativa de células nervosas quando concentrações terapêuticas do PAR foram empregadas (10 a 250 µg/mL por 24 horas) (SCHULTZ et al., 2011). Recentemente, verificou-se que a ativação dos receptores CB1 está envolvida na neurotoxicidade observada com o uso do PAR durante estágios críticos do desenvolvimento do tecido nervoso em ratos (DPN 10, 30 + 30 mg/kg no intervalo de 4 h) com reflexos comportamentais na fase adulta, tais como prejuízos no comportamento espontâneo e capacidade de habituação (reduzida locomoção e exploração de ambiente novo) (PHILIPPOT et al., 2018).

Por fim, verificam-se alterações no comportamento sexual de ratos adultos expostos prenatalmente ao PAR (50 e 150 mg/kg/dia) e seu precursor anilina (30 e 90 mg/kg/dia) no DG 7 até o parto. A ação central se dá por meio da redução do número de neurônios nos núcleos sexualmente dimórficos na área pré-óptica do hipotálamo, conferindo prejuízo no processo de masculinização cerebral (programação neuro-comportamental) (HAY-SCHMIDT et al., 2017).

1.5 Estresse oxidativo relacionado ao uso do PAR

Acredita-se que o uso de PAR durante o desenvolvimento do tecido nervoso desencadeie transtornos do neurodesenvolvimento através da ativação da resposta inflamatória e do estresse oxidativo (EO) (PARKER et al., 2017). Reforçando tais pressupostos, está descrito que o PAR promove citotoxicidade aos macrófagos e assim, prejudica a resposta fagocítica na defesa tecidual pelo aumento do EO mitocondrial e da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em macrófagos murinos (J774.2). Também reduz os estoques mitocondriais e extramitocondriais de glutatona reduzida (GSH), induz a peroxidação lipídica e proteica, bem como aumenta a translocação nuclear do fator nuclear kappa B p65 (NF-kB-p65), um importante marcador do equilíbrio redox (AL-BELOOSHI et al., 2009).

Na lesão hepática ocasionada pelo uso do PAR, as ERO são geradas pelas mitocôndrias que têm o funcionamento prejudicado pela ação do

NAPQI. Esse metabólito reativo gera adutos proteicos com a membrana mitocondrial, com as enzimas ATP sintetase e glutathiona peroxidase, com consequente instabilidade da membrana celular, comprometimento da geração de energia na cadeia respiratória e prejuízo da capacidade antioxidante desta organela. Assim, o EO mitocondrial, a ativação da cascata de sinalização (DU; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2016), bem como o prejuízo na síntese de ATP e fragmentação do material genético mitocondrial acarretam em necrose hepática (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018), com indução do processo de autofagia (mitofagia) para a remoção de células danificadas pelo PAR (ISHITSUKA; KONDO; KADOWAKI, 2020). A hepatotoxicidade acarretada pelo uso do PAR é resultado do estímulo do processo inflamatório e do EO, uma vez que este fármaco provoca uma inflamação estéril, disfunção na microcirculação hepática (YAN et al., 2018), inibição dos níveis da proteína sirtuína 1 (SIRT1) (RADA et al., 2018), liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), com recrutamento de fagócitos hepáticos que contêm NADPH oxidase responsável por gerar as ERO no fagossomo, ou no espaço extracelular (JAESCHKE; RAMACHANDRAN, 2018). Em suma, a morte dos hepatócitos induzida pelo PAR ocorre em dois passos. No primeiro (fase metabólica) há depleção dos estoques de glutathiona e subsequente ligação com proteínas celulares. Posteriormente, há a ampliação do EO e aumento da permeabilidade da membrana, com consequente toxicidade (REID et al., 2005).

Estudos prévios avaliaram marcadores do EO em ratos neonatos expostos ao PAR materno. Klein e colaboradores (2020) não descrevem alterações nas concentrações de de GSH e hidroperóxidos lipídicos (LOOH), tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo de filhotes (DPN 22) após exposição gestacional (350 mg/kg/dia do DG 6 ao parto). Além disso, um recente estudo não relata diferenças significativas nas concentrações de GSH e glutathiona oxidada (GSSG) em homogenato de cérebros de camundongos (DPN 13) tratados ao PAR (100 e 150 mg/kg; via intraperitoneal) do DPN 7 ao 13. Este trabalho relata que há significativo aumento das concentrações de GSSG entre o último e o primeiro dia de uso de 100 mg/kg do PAR. Ainda, quanto ao marcador de peroxidação lipídica (4-hidroxi-2-nonenal), foi possível verificar que este está mais elevado nos animais expostos a 150 mg/kg de PAR tanto no primeiro quanto no último dia de tratamento (KIM, 2017).

1.6 Aspectos críticos da avaliação da toxicidade do desenvolvimento em animais

Modelos animais auxiliam na avaliação e previsão de riscos decorrentes do emprego de fármacos em humanos, mesmo que as respostas possam variar quali e quantitativamente entre as espécies (NRC, 2004). São instrumentos de informação às agências reguladoras e aos órgãos de saúde para tomadas de decisões quanto às recomendações do uso de medicamentos em gestantes e lactantes já disponíveis para comercialização, bem como, durante o processo de aquisição do registro (sobretudo na fase I), evitando exposição a fármacos cujo perfil de segurança é desconhecido para esses grupos específicos e seus descendentes. No entanto, a validade dos dados obtidos nos experimentos animais e o fornecimento de informações toxicológicas com valor para humanos dependem do protocolo de execução do estudo com atenção a vários viéses. Dentre esses, destaca-se o período de tratamento nos animais que deve corresponder ao tempo em que o feto humano seria exposto ao fármaco, bem como, a escolha das doses devem refletir as utilizadas em gestantes ao atender os princípios da extrapolação interespecie e escalas alométricas que consideram as diferenças biológicas entre humanos e animais (ZUCKER, 2017). Quanto às amostras, ninhadas com tamanhos não padronizados poderiam gerar interferências, da mesma maneira que o tamanho inapropriado podem gerar falsos negativos e conferir um perfil ilusório de segurança (ZUCKER, 2017). Ainda, deve-se considerar a ninhada como uma única unidade observacional (SETZER, 1992), sendo irmãos, se utilizados, considerados somente como uma unidade experimental (ROUSSEAU; GAD, 2013). A não observância desse pressuposto pode gerar conclusões errôneas uma vez que não se considera o efeito ninhada (FESTING, 2006).

Com o intuito de padronizar os estudos e orientar a condução de experimentos, a Agência Americana de Proteção Ambiental (EPA) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) elaboraram guias para estudos da toxicidade do desenvolvimento (EPA, 1991; OECD/OCDE, 2018) e especificamente para avaliação da toxicidade de xenobióticos no neurodesenvolvimento (EPA, 1998; OECD/OCDE, 2007).

Considerando a) elevada utilização do PAR por grávidas e lactantes em vários países; b) aumento do risco de transtornos do neurodesenvolvimento em razão da exposição perinatal ao PAR; c) questões bioéticas envolvidas no

recrutamento de gestantes e lactantes em estudos clínicos e o direito desse grupo específico, junto a neonatos, ao acesso de medicamentos cujo perfil de segurança seja conhecido; d) importância de estudos animais para a avaliação toxicológica de fármacos durante fases do registro e no período pós-comercialização; e) PAR atuar como desregulador endócrino e no sistema endocanabinoide, com alterações no neurodesenvolvimento e comportamentos a longo prazo; f) o envolvimento do EO nos danos celulares provocados pelo PAR; g) os guias internacionais disponíveis para a adequada condução de estudos que avaliam a toxicologia do desenvolvimento; este trabalho visa por meio de um experimento animal fornecer dados para o perfil de segurança do PAR durante o período perinatal através da avaliação de marcadores do EO encefálico e hepático na prole, análise histopatológica hepática materna e da prole, determinação da toxicidade geral (materna e do desenvolvimento), bem como, determinação de parâmetros bioquímicos hepáticos (maternos e na prole) e avaliação comportamental dos filhotes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar se a exposição de ratas ao PAR durante a gestação e amamentação altera o neurodesenvolvimento de filhotes machos e fêmeas.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Quantificar marcadores de EO (AOPP, GSH, LOOH e SOD) no córtex pré-frontal, hipocampo, cerebelo e estriado de filhotes machos e fêmeas expostos ao PAR durante a gestação e amamentação e no correspondente grupo controle.
- b) Quantificar marcadores hepáticos (histopatologia, atividade sérica de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT), concentração de GSH e AOPP) em filhotes machos e fêmeas expostos ao PAR durante a gestação e amamentação e no correspondente grupo controle.
- c) Avaliar os comportamentos nos testes do ninho (discriminação olfatória), campo aberto (atividade motora e emocionalidade), teste de sociabilidade e estereotipia induzida pela apomorfina em filhotes machos e fêmeas 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 afeta diferencialmente os marcadores comportamentais e de EO em filhotes machos e fêmeas.
- e) Avaliar o ganho de peso materno e dos filhotes como marcador de toxicidade geral.
- f) Avaliar, no dia do desmame, se mães expostas a 35 ou 350 mg/kg, via oral, do PAR durante a gestação e amamentação apresentam alterações em marcadores hepáticos (histopatologia, concentração hepática de GSH e de AOPP, e concentração sérica de AST e ALT).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento

Estudo experimental.

3.2 Desenho experimental

O esquema abaixo (Figura 1) demonstra resumidamente o desenho experimental empregado no presente trabalho.

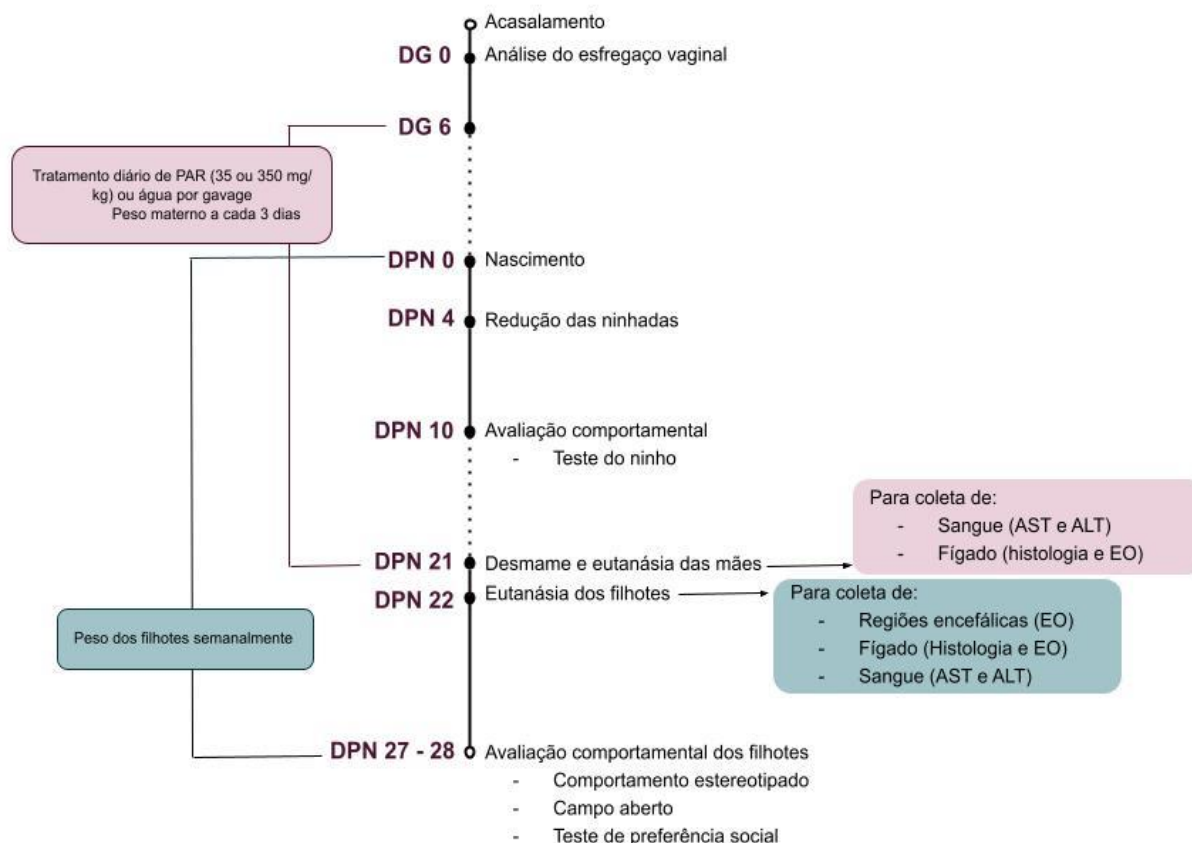


Figura 1. Diagrama do delineamento experimental empregado. DG: dia gestacional; DPN: dia pós-natal; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; EO: estresse oxidativo.

3.3 Animais e tratamento

Ratos adultos Wistar advindos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina- PR foram distribuídos em gaiolas (2 ratas virgens e 1 macho) para acasalamento durante a noite. Na manhã seguinte, mediante análise do esfregaço vaginal para detecção da presença de espermatozóides e das características da fase estro, determinou-se o dia gestacional 0 (DG 0). Trinta e nove ratas prenhes participaram do estudo, alocadas individualmente em gaiolas e distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais de acordo com o tipo de

tratamento e dose de tratamento. Para evitar problemas na implantação, o tratamento por gavage foi iniciado no DG 6 e mantido diariamente até o desmame no dia pós-natal 21 (DPN 21). O período de exposição foi determinado ao considerar as etapas embriológicas equivalentes entre animais e humanos, uma vez que o desenvolvimento encefálico de humanos ao final da gestação corresponde ao de ratos ao final da amamentação (RICE e BARONE, 2000).

As ratas pertencentes ao grupo controle (n= 14) foram tratadas com água; as do grupo PAR35 (n= 13) com a dose de 35 mg/kg/dia e as do grupo PAR350 (n=14) com a dose de 350 mg/kg/dia de PAR. O peso das ratas foi determinado a cada três dias para ajuste da dose. Comprimidos macerados de PAR (Tylenol®) foram diluídos em água. 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 (EPA, 2006). A dose mais alta representa a adição de um fator de segurança (10x) para considerar a variabilidade intra-espécie (NIELSEN; OSTERGAARD; LARSEN, 2008). No dia do nascimento (DPN 0), foram determinados o tamanho e peso da ninhada, sexo dos filhotes e número de natimortos. No DPN 4, a ninhada foi reduzida para 10 filhotes e mantidos quando possível, 5 filhotes de cada sexo. Ninhadas abaixo de 8 filhotes foram retiradas do estudo. Além do dia do nascimento, o peso dos filhotes foi determinado semanalmente até o desmame (DPN 21). Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6h), temperatura e umidade controladas e livre acesso à água e ração.

Os 5 pares de filhotes provenientes de cada ninhada (1 macho e 1 fêmea) foram distribuídos, quando possível, da seguinte maneira:

- 1º par: teste de busca pelo ninho.
- 2º e 3º pares: análise dos marcadores de EO.
- 4º par: teste do campo aberto e teste de sociabilidade (preferência social).
- 5º par: teste do comportamento estereotipado.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA- UEL: ofício nº. 80/2017 e 141/2017).

3.4 Amostras teciduais maternas e da prole

As mães foram decapitadas no DPN 21 para coleta de sangue e do fígado. O sangue foi centrifugado (Jouan[®]) a 700 G por 15 minutos a 4°C e o soro obtido mantido em freezer (Panasonic[®]) a -80°C até análise bioquímica. Do fígado removeu-se o lobo lateral esquerdo para análise histopatológica e o lobo médio direito para avaliação dos marcadores do EO.

Os filhotes foram decapitados no DPN 22 e o sangue do tronco, coletado. O soro foi obtido após centrifugação (Jouan[®]) a 700 G por 15 minutos a 4°C e mantidos em freezer (Panasonic[®]) a -80°C até análise bioquímica. O encéfalo foi isolado e quatro áreas foram dissecadas: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HPC), estriado (ST) e cerebelo (CB) para análise de marcadores do EO. Tais áreas foram selecionadas porque participam de funções motoras, emocionais, cognitivas e de memória, as quais estão alteradas nos transtornos do neurodesenvolvimento (STAAL, 2015). É importante padronizar o tamanho da ninhada sendo irmãos, se utilizados, considerados somente como uma unidade experimental. A não observância desse pressuposto pode gerar conclusões errôneas uma vez que não se considera o efeito ninhada. Ainda, foi removido o lobo médio direito para análise dos marcadores do EO hepático e o lobo lateral esquerdo para análise histopatológica. Todas as amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até análise.

3.5 Testes comportamentais

Todos os testes foram realizados em um animal de cada sexo por ninhada, quando possível, com avaliação prévia dos machos para evitar interferências de odores sexuais. Os experimentos foram executados em ambiente com temperatura e ruídos controlados, dotado de câmera filmadora digital (Sony[®], Handycam, DCR-DVD850) para captura de vídeo, com análise *a posteriori* dos arquivos por examinador desconhecedor do tratamento. Para a avaliação dos comportamentos foi utilizado o *software* X-PlotRat versão 2005 (TEJADA; CHAIM; MORATO, 2017), exceto para o teste do comportamento estereotipado em que escores foram atribuídos no momento do estudo.

3.5.1 Teste da busca pelo ninho (discriminação olfatória)

Seguiu-se o protocolo de Schneider e Przewłocki (2005) para a avaliação do comportamento de busca pelo ninho de filhotes no DPN 10. O teste consiste em colocar o filhote no centro de uma gaiola de acrílico (20 x 8 x 8 cm) separada em três quadrantes por caneta permanente. Em um lado é colocado 20g de maravalha da caixa moradia do animal e do outro, a mesma quantidade de maravalha limpa. Com livre exploração, contabilizou-se o tempo demandado pelo animal para atingir a maravalha da moradia, ou seja, quando houve o cruzamento da linha demarcada com as patas dianteiras e cabeça. Devido às características de movimentação de filhotes nesta idade, em padrão de movimento tipo “estrela” (GREGORY; PFAFF, 1971), o tempo gasto em locomoção foi analisado e não a distância percorrida. O teste tem duração máxima de 3 minutos e avalia a resposta de busca pelo ninho mediada pelo sistema olfatório (GREGORY; PFAFF, 1971).

3.5.2 Teste do comportamento estereotipado

No DPN 27, um filhote de cada sexo e ninhada recebeu 0,3 mg/Kg de apomorfina pela via subcutânea, que induz estereotipia pela ativação de receptores dopaminérgicos D1 e D2. Os animais foram alocados individualmente em gaiolas de acrílico (20 cm comprimento x 8 cm largura x 8 cm altura) e o comportamento observado por 120 minutos. Escores descritos por Setler, Sarau e McKenzie (1976) foram atribuídos a cada 10 minutos (10 segundos de observação) com variação de 0 (dormindo) a 6 (roer contínuo). A intensidade da estereotipia para cada animal foi determinada pela somatória dos escores obtidos após 30, 60, 90 e 120 minutos de observação.

3.5.3 Teste do campo aberto

No DPN 28, um animal de cada sexo e ninhada foi alocado individualmente no centro de uma arena circular de madeira (72 cm de diâmetro). Durante 5 minutos, foram avaliadas: a locomoção do animal pelos doze quadrantes desenhados no chão da arena; o comportamento de levantar sobre as patas traseiras para estimativa da atividade locomotora e exploratória. Ainda, o tempo de auto-limpeza (*grooming*) rostral e corporal bem como o tempo de permanência no centro da arena foram quantificados para avaliação da emocionalidade (ESTANISLAU et al., 2013).

3.5.4 Teste de sociabilidade (preferência social)

No DPN 28, um animal de cada sexo e de cada ninhada foi alocado no centro de um aparato de madeira retangular (120 x 40 x 40 cm) dividido por três câmaras de igual tamanho por 5 minutos para habituação. O teste foi realizado segundo Moy et al. (2004) e adaptações de Štefánik, Olexová e Krsková (2015) para ratos por 10 minutos. É importante salientar que durante esse período, o animal tinha livre acesso somente ao compartimento central uma vez que a exploração das demais áreas foi vedada pelo fechamento de portinholas. Em uma câmara lateral do aparato, foi alocado um animal da mesma idade e sexo, porém advindo de outra ninhada. Este foi aprisionado por uma cesta de plástico perfurada que permitia a visualização e interação por meio do ato de cheirar (área social). Do lado oposto, encontrava-se o mesmo artefato vazio, onde o objeto desconhecido e novo para o animal constitui a área não-social do teste. Após o período de habituação, as portinholas foram abertas para permitir livre exploração do aparato pelo animal. Estimou-se o número de entradas e o tempo que o animal permanecia em cada câmara (central, social ou não-social), número de cruzamentos entre as áreas, bem como o tempo de interação com o animal desconhecido pela identificação do ato de cheirar. O comportamento social foi estimado pelo índice de sociabilidade (BAMBINI-JUNIOR et al., 2014).

3.6 Determinação de parâmetros bioquímicos séricos

As atividades de AST e ALT foram determinadas pelo Sistema Integrado de Bioquímica Dimension® Rxl Max® (Siemens Healthineers).

3.7 Avaliação do estresse oxidativo

3.7.1 Preparo do homogenato de tecido encefálico

Todas as análises foram realizadas a partir do preparo de um homogenato de um *pool* de três amostras, quando possível, provenientes da mesma área removida de ratos do mesmo sexo e ninhada. O homogenato foi obtido pela maceração das amostras com o auxílio de um homogeneizador de tecido (Pyrex® Potter-Elvehjem) em tampão fosfato salina (PBS pH 7,4) diluído em 6 vezes peso/volume. Os homogenatos foram obtidos a partir da centrifugação por 15 minutos a 4°C em 1008 G, posteriormente centrifugado por 15 minutos a 4°C em 9072 G. Os sobrenadantes foram utilizados para análise dos marcadores do EO.

3.7.2 Preparo do homogenato de tecido hepático

Aproximadamente 100 mg do tecido hepático do lobo lateral do fígado de mães e de filhotes foram homogeneizados em homogeneizador de tecidos (Pyrex® Potter-Elvehjem) com PBS pH 7,4 na proporção de 15 vezes peso/ volume. O homogenato foi obtido a partir da centrifugação a 11.200 G por 20 minutos a 4°C.

3.7.3 Quantificação de proteínas totais

Baseado no método de Lowry e colaboradores (1951) e com as adaptações de Miller (1959), as proteínas totais foram estimadas nos homogenatos das regiões encefálicas (Apêndice A). A determinação se dá pela reação das proteínas com o reativo cúprico e posteriormente com o reativo de Folin-Ciocalteu. Os resultados foram todos expressos em mg/L e utilizados para a quantificação dos marcadores do EO.

3.7.4 Determinação de produtos de oxidação proteica (AOPP)

A quantidade de proteínas que sofreram oxidação no EO foi determinada a partir do método desenvolvido por Witko-Sarsat et al. (1996), adaptado por Hanasand et al. (2012) e com modificações volumétricas para a análise do tecido encefálico e hepático (Apêndice B). Esse marcador de EO é resultado da oxidação provocada pelas ERO provenientes das mieloperoxidases e formação de oxidantes clorados (WITKO-SARSAT; GAUSSON; DESCAMPS-LATSCHA, 2003) sendo derivados de albumina, fibrinogênio e lipoproteínas (PIWOWAR, 2010).

A metodologia desenvolvida primeiramente em plasma baseia-se no princípio da mensuração de absorbância a partir de cromóforos (ex: pentosidina, carbonilas e ditirosina) em meio acidificado na presença de iodeto de potássio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (modelo EnSpire, Perkin Elmer, USA) no comprimento de onda de 340 nm a 25°C com a utilização de uma curva de calibração de Cloramina T. Os resultados foram expressos em nmol de equivalente de cloramina T/mg de proteína de cada área encefálica e nmol/mL de equivalente de cloramina T para o tecido hepático.

3.7.5 Determinação de glutathiona reduzida (GSH)

O GSH é um tripeptídeo com radicais sulfidríla que participa do processo de destoxificação de substâncias no organismo e com ação antioxidante frente a ERO (ALANAZI; MOSTAFA; AL-BADR, 2015; DIETZEN, 2018). A concentração de GSH foi determinada por derivação com a utilização do reagente de Ellman (DTNB- ditiobios) de acordo com o método de Tietze (1969) adaptado por Anderson (1985). A reação de GSH com a substância cromogênica forma um composto de coloração amarelada que foi espectrofotometricamente (modelo EnSpire, Perkin Elmer, USA) determinada a 412 nm. Pequenas adaptações volumétricas foram necessárias para a determinação de GSH em tecido encefálico e hepático (Apêndice C). Os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína para tecido encefálico e mmol/g de tecido hepático.

3.7.6 Quantificação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

A quantificação de LOOH foi determinada pelo método de quimiluminescência estimulada por terc-butil, desenvolvido por Gonzalez-Flecha, Llesuy e Boveris (1991) com pequenas adaptações volumétricas (Apêndice D). A intensidade da emissão de luz é considerada proporcional à peroxidação lipídica (fase de propagação), bem como, o consumo das defesas antioxidantes. A análise foi realizada em ambiente com temperatura de 30° C ao abrigo da luz em luminômetro (Glomax®) pelo período de 60 minutos. Os resultados foram expressos em unidades relativas de luz (URL)/ mg de proteína.

3.7.7 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A cinética enzimática de SOD foi verificada pelo método espectrofotométrico descrito por Marklund e Marklund (1974) com algumas adaptações volumétricas (Apêndice E). A técnica baseia-se na inibição da auto-oxidação do composto fenólico (pirogalol) através da competição da SOD pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). As análises foram realizadas em espectrofotômetro (modelo EnSpire, Perkin Elmer, USA) pelo tempo de 6 minutos, sob a temperatura de 37°C a 420 nm. Os resultados foram expressos em USOD/min/mg de proteína.

3.8 Análise histopatológica do fígado

Para a análise histopatológica do fígado das mães (DPN 21) e filhotes (DPN 22) foram processados cortes do lobo lateral esquerdo. O material foi fixado em solução de formol a 10% por 48 horas e, posteriormente, mantido em solução de etanol a 70% até sofrer incorporação na parafina. Cortes com 5 μ m de espessura foram obtidos em criostato (CM1520, Leica Biosystem, USA) e corados com hematoxilina-eosina (H&E). Os cortes de tecido hepático foram examinados e pontuados independentemente por examinador que desconhecia o tratamento. Uma avaliação semi-quantitativa do dano do tecido hepático foi estimada em 10 campos de alta potência (HPF) selecionados aleatoriamente como descrito anteriormente com modificações (BORGHI et al., 2018; FATTORI et al., 2017). O escore histopatológico total foi analisado considerando alterações morfológicas: 1) alterações na arquitetura; 2) inflamação; 3) necrose; e 4) degeneração hidrópica. O grau de lesão hepática foi classificado em uma escala de 0–3 (0: normal, 1: leve, 2: moderado, 3: grave) e os resultados apresentados como escore histopatológico total. O maior escore total possível foi 12 (YAMAN et al., 2013).

3.9 Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos à análise exploratória de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Se os critérios foram alcançados ($p > 0,01$) testes paramétricos foram conduzidos. Dados que não alcançaram homogeneidade ou normalidade foram transformados apropriadamente. Se ainda não apresentaram distribuição normal e homogeneidade, foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A evolução do peso corporal materno e da prole foi analisada por ANOVA para medidas repetidas (RMANOVA). Se na RMANOVA os dados não passaram no critério de esfericidade, utilizamos os valores estatísticos (graus de liberdade e F) corrigidos pelo teste de Greenhouse-Geisser. Dados dos testes comportamentais foram analisados por ANOVA de duas vias com sexo e exposição gestacional como fatores. Dados do comportamento esterotipado da apomorfina foram submetidos a ANOVA de medidas repetidas de duas vias, na qual foram considerados os mesmos fatores. Se havia significativa interação entre os fatores, dados de machos e fêmeas foram analisados separadamente por ANOVA de uma via complementada com teste de Bonferroni. Conclusões foram estabelecidas com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

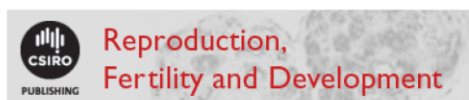
Conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), os resultados e a discussão estão apresentados como dois artigos científicos.

O grande projeto que originou essa tese também originou uma Dissertação de Mestrado junto ao PPGCS. Frente aos resultados obtidos, optamos por unir, para a publicação, os dados referentes à avaliação hepática materna e da prole (que fazem parte da presente tese) com os dados referentes à avaliação renal das mães e da prole (que fazem parte da Dissertação de Mestrado defendida em março de 2020). Assim, do artigo 1, somente os dados referentes à toxicidade geral e à avaliação hepática são objetos de discussão da presente Tese. O referido artigo foi aceito, em 22 de outubro de 2020, para publicação no periódico *Reproduction, Fertility and Development* (Qualis Capes A2). Vale mencionar que o texto em vermelho sinaliza as alterações solicitadas pelos revisores após a segunda revisão do manuscrito.

O artigo 2 foi submetido ao periódico *Behavioural Brain Research* e contém os dados referentes às análises comportamentais e de EO encefálico.

4.1 Artigo

Reproduction, Fertility and Development



HEPATIC AND RENAL EVALUATION IN RAT DAMS AND IN THEIR OFFSPRING AFTER EXPOSURE TO PARACETAMOL DURING GESTATION AND LACTATION.

Journal:	<i>Reproduction, Fertility and Development</i>
Manuscript ID	RD20142.R2
Manuscript Type:	Research paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Myasaki, Andrea; State University of Londrina, Pediatrics and Pediatrics Surgery Rigobello, Camila; State University of Londrina, Physiological Sciences Klein, Rodrigo; State University of Londrina, Physiological Sciences Crespigio, Jefferson; State University of Londrina, Pathology Flaiban, Karina; State University of Londrina, Preventive Veterinary Medicine Bracarense, Ana Paula; State University of Londrina, Preventive Veterinary Medicine Mazzucatto, Barbara ; State University of Maringá, Veterinary Medicine Barbosa, Decio; UEL, Research Laboratory, CCS Moreira, Estefania; UEL, Department of Physiological Science
Keyword:	developmental biology, fetal programming, oxidative stress, pharmacology

SCHOLARONE™
Manuscripts

<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

Paracetamol use by pregnant and nursing women may impact progeny development. We evaluated in rats possible effects on the maternal and progeny liver and kidneys and no gross sign of toxicity was detected. Apparently the hepatic and renal tissues from the offspring are not susceptible targets after maternal exposure to therapeutic doses of paracetamol.

For Review Only



39x72mm (72 x 72 DPI)

1 **HEPATIC AND RENAL EVALUATION IN RAT DAMS AND IN THEIR OFFSPRING AFTER**
2 **EXPOSURE TO PARACETAMOL DURING GESTATION AND LACTATION**

3

4 Andréa Morgato de Mello Miyasaki^{1,2*}, Camila Rigobello^{2*}, Rodrigo Moreno Klein², Jefferson
5 Crespigio³, Karina Keller Flaiban⁴, Ana Paula Bracarense⁴, Bárbara Cristina Mazzucatto⁵,
6 Décio Sabbatini Barbosa², Estefânia Gastaldello Moreira^{2,6**}

7

8 ¹Department of Pediatrics and Pediatrics Surgery, Universidade Estadual de Londrina (UEL),
9 86051-980, Londrina, PR, Brazil.

10 ²Graduate Program in Health Sciences, UEL, 86051-980, Londrina, PR, Brazil.

11 ³Department of Pathology, UEL, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

12 ⁴Department of Preventive Veterinary Medicine, UEL, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

13 ⁵Department of Veterinary Medicine, State University of Maringá, 87507-190, Umuarama,
14 PR, Brazil.

15 ⁶Department of Physiological Sciences, UEL, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

16

17 *AMMM and CR equally contributed to this manuscript.

18

19 **Corresponding author: egmoreira@uel.br

20 Depto de Ciências Fisiológicas, CCB

21 UEL - Campus Universitário

22 86057-970 - Londrina-PR-Brasil

23 Phone: +55 43 3371-4307

24

25 **ABSTRACT**

26 Paracetamol (PAR) is the analgesic/antipyretic of choice for pregnant and nursing
27 women. PAR may reach the foetus and/or neonate through the placenta and/or milk and
28 impact their development. This study evaluated possible hepatic and renal effects in rat dams
29 and their offspring exposed to human-relevant route and doses of PAR from gestational day 6
30 to postnatal day (PND) 21. Dams were gavaged daily with PAR (35 or 350 mg/kg) or water
31 (CON). Dams and pups were euthanized on PND21 and 22, respectively, and blood was
32 collected for biochemical analysis (AST, ALT, urea and creatinine). Kidneys and liver were
33 isolated and processed for histopathological as well as oxidative stress markers assessments.
34 Compared to CON animals, pups exposed to PAR 350 mg/kg presented increased levels of
35 renal GSH whereas dams exposed to both PAR doses presented increased AST levels. PAR
36 treatment did not influence parameters of general toxicity, renal and hepatic oxidative stress.
37 In conclusion, maternal exposure to human relevant route and doses of PAR was not
38 associated with hepatic or renal toxicity in the pups or dams but this exposure was not devoid
39 of effects. It induced an increase in GSH levels in the pups' kidneys, which could suggest an
40 adaptive antioxidant response, and impacted maternal serum activity of AST.

41

42 **Keywords:** acetaminophen, pregnancy, in utero, renal injury, hepatic injury

43

44 **Running head:** Perinatal paracetamol: hepatic and renal evaluation

45

46 INTRODUCTION

47 Paracetamol (PAR) is the most used over-the-counter analgesic and antipyretic drug
48 in the world (Thiele *et al.* 2013). Studies have identified its use in 20-75% of pregnant women
49 (Werler *et al.* 2005). This frequent use reflects its effectiveness associated to the perception
50 of safety for use during pregnancy and lactation.

51 PAR and phenacetin are derivatives of acetanilide. In the past, phenacetin, which is
52 now out of the market, was used indiscriminately and caused many severe chronic
53 intoxications, with a high incidence of renal papillary necrosis (Burry A 1972; Murray 1972). In
54 1948, Brodie and Axelrod demonstrated that PAR, the active metabolite of acetanilide and
55 phenacetin, was responsible for the pharmacologic activity of these compounds (Brodie and
56 Axelrod 1948). In the mid-1950s, PAR was commercially available and rapidly gained
57 worldwide popularity (Bertolini *et al.* 2006). Since then, dose-dependent hepatic and
58 nephrotoxicity have been recognized as adverse effects of PAR (Mazer and Perrone 2008;
59 Jaeschke *et al.* 2018; Pholmoo and Bunchorntavakul 2019).

60 Oxidative stress (OS) plays an important role in the hepatic and renal toxicity of PAR
61 (Wang *et al.* 2017). PAR metabolism by CYPs enzymes produces the reactive metabolite N-
62 acetyl-p-benzoquinonimine (NAPQI) which, if not detoxified by glutathione (GSH), may interact
63 with cellular proteins and impair mitochondrial function leading to tissue necrosis (Du *et al.*
64 2016; Ramachandran and Jaeschke 2017; Jaeschke and Ramachandran 2018).

65 PAR and its conjugated metabolites cross the placental barrier (Bertolini *et al.* 2006;
66 Conings *et al.* 2019) and are excreted in the breast milk (Notarianni *et al.* 1987) indicating that
67 the maternal use of this drug results in foetal/neonatal exposure. Since 2003, studies have
68 been describing an association between maternal use of PAR and neurodevelopmental
69 disorders (attention deficit and autism spectrum) in the descendants (for a list of the studies,
70 please refer to (Klein *et al.* 2020)). However, in reason to the conflicting results available in the
71 literature and to the epidemiological nature of the data, which do not support the assumption
72 of causal relationship, the regulatory authorities have not taken any action regarding the
73 recommendation for PAR use during pregnancy and lactation periods so far.

74 Considering the importance of animal models to establish causal relationship, we have
75 established a rat model of maternal exposure to human clinically relevant route of exposure
76 and doses of PAR and have been investigating possible consequences on different systems
77 of the offspring. So far, we have reported that maternal exposure to PAR: a) induced some
78 behavioural alterations in weaned rats that may be relevant for neurodevelopmental disorders
79 (Klein *et al.* 2020); b) impacted some markers of reproductive development as well as the
80 sexual behaviour of adult male (Pereira *et al.* 2020) and female (Aleixo 2019) pups.

81 In the present manuscript we describe the evaluation of renal (serum concentration of
82 creatinine and urea, histopathology) and liver (serum activity of alanine and aspartate
83 aminotransferases, histopathology) markers both in weaned pups and in their dams treated
84 with PAR during gestation and lactation. Moreover, we also evaluated two oxidative stress
85 markers: advanced oxidation protein products and glutathione, which is the main antioxidant
86 molecule that detoxifies NAPQI.

87 The evaluation of a possible impact of maternal exposure to PAR on the kidney and
88 liver morphology and physiology of the offspring is relevant considering that this drug has the
89 potential to induce hepatic and renal lesion (Mour *et al.* 2005; Stern *et al.* 2005) due to oxidative
90 stress mechanisms (Eguia and Materson 1997; Mour *et al.* 2005; Mazer and Perrone 2008).
91 Moreover, it is noteworthy that in this work dams were treated during both gestation and
92 lactation periods because in rats the nephrogenesis ends by postnatal days 7-10 (Frazier
93 2017), whereas in humans it ends by the 36th week of pregnancy. **We recognize that, in real-
94 world scenarios, it will be unlikely that a pregnant woman would take PAR every day. However,
95 toxicological studies are designed to evaluate possible hazards associated with a chemical,
96 so exposure must take place during the majority of the developmental period of conceptus
97 since it is not possible to predict the day(s) that a given woman would take the drug.**

98

99 MATERIAL AND METHODS

100

101 *Animals and treatment*

102 Male and female Wistar virgin rats obtained from the Central Vivarium of the State
103 University of Londrina were mated overnight in cages containing 1 male and 2 females.
104 Gestational day 0 (GD0) was determined through vaginal smear analysis the next morning, by
105 the presence of spermatozoa. On GD6, females were allocated to separate cages and started
106 being gavaged daily with water (control or CON, n=14) or PAR (Tylenol®, Johnson & Johnson,
107 Brazil) in the doses of 35 mg/Kg (PAR35, n=13) or 350 mg/Kg (PAR350, n=14). Treatment
108 lasted until weaning (i.e., postnatal day – PND21), when the dams were decapitated. Dams
109 were weighed every 3 days in order to adjust dosing. PAR lower dose (i.e., P35) represents a
110 dosimetric adjustment of 500mg/day in humans (65 kg) whereas for the higher dose (i.e.,
111 P350) it was added a security factor of 10 considering intraspecies variability (USEPA 2006;
112 Nielsen *et al.* 2008).

113 On the day of birth (PND0) the pups were counted and the litter, weighed. On PND4,
114 litters were culled to 10 pups (5 males and 5 females whenever possible). Litters with less than
115 8 pups were discarded. Litters were weighed weekly until weaning.

116 The litter was the experimental unit, i.e., in each analysis only one female and one male
117 pup from each litter were randomly selected for use. Exceeding animals were used in another
118 work aimed to evaluate neurobehavioral and neurochemical endpoints.

119 Animals were kept under controlled temperature ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$), 12h light/dark cycle (lights
120 on at 6:00 AM) and with free access to tap water and rat chow (Nuvital™, Nuvilab CR1, Paraná,
121 Brazil). All the experimental protocols were approved by the State University of Londrina Ethics
122 Committee for Animal Research (protocols 7900.2017.82 and 22993.2017.75).

123

124 *General reproductive toxicity*

125 The dams were weighed each 3 days throughout the treatment period and pups were
126 weighed at birth (PND0) and weekly until weaning (PND21). On the day of birth, the number
127 of pups in each litter was counted and sexed.

128

129 *Hepatic and renal biochemical markers*

130 Blood samples collected from dams (PND21) and pups (PND22) after decapitation
131 were centrifuged (3,000 rpm, 15 min, 4°C) and kept at -80°C until the day of analysis.

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

135

136 *Hepatic histopathology and renal histopathology and immunohistochemistry for caspase*

137 For this analysis, seven animals from each treatment group and from each sex were
138 randomly selected.

139 The liver and the left kidney isolated from dams (PND21) and pups (PND22) were fixed
140 in 10% formalin solution for 48 h and then kept in 70% ethanol solution until paraffin
141 embedding. Sections of $5\ \mu\text{m}$ from each organ were obtained using a cryostat (CM1520, Leica
142 Biosystem, USA) and stained with hematoxylin & eosin (H&E). Renal sections were also
143 stained with periodic acid-Schiff (PAS). Sections were examined at 40x and 100x magnification
144 and independently scored by two blind individuals (one pathologist and one experimenter)
145 under light microscopy. The scores obtained from both individuals were averaged. A semi-
146 quantitative evaluation of hepatic and renal tissues damage was estimated in 10 high power
147 fields (HPF) selected aleatory as described previously (Fattori *et al.* 2017; Borghi *et al.* 2018)
148 with slight modifications.

149 For the liver analysis, histological findings were classified using a grading scheme of 0
150 to 3 (0: normal, 1: mild, 2: moderate, 3: severe). Each of the following morphological alterations
151 was scored: 1) architecture changes; 2) inflammation; 3) necrosis and 4) hydropic

152 degeneration. Results are shown as total histopathological score. The highest possible total
153 score was 12 (Yaman *et al.* 2013).

154 For the kidney analysis, the total histopathological score was assayed considering
155 morphological alterations such as: 1) in the glomerulus; 2) impairment of brush border in
156 cortical and medullar zones; 3) presence of vacuoles in tubular cells (marker of hydropic
157 degeneration); and 4) degeneration of epithelial tubular cells (marker of tubular necrosis). The
158 degree of renal damage was classified on a scale of 0–3 (0: normal, 1: mild, 2: moderate, 3:
159 severe) and results are presented as the total histopathological score. The highest possible
160 total score was 12 (Fattori *et al.* 2017; Borghi *et al.* 2018).

161 As PAR treatment may activate caspases 9 and 3 in renal tubular epithelial cells (Lorz
162 2004), immunohistochemistry for caspase-3 was performed in the dam's kidney as a marker
163 of apoptosis. The immunohistochemical study of the kidneys was performed in 5µm thick
164 histological sections suspended on silanized slides. Antigen retrieval was performed in a water
165 bath with slides submerged in citrate buffer (pH 6) for 20 min, after cooling the slides at room
166 temperature (for at least 20 min). Endogenous peroxidase was blocked using 10% hydrogen
167 peroxide for 30 min, rinsed in running water for 10 min and again blocked with 5% non-fat
168 powder milk for 10 min. Rabbit anti-caspase-3 cleaved antibody (ASP175) was used (Cell
169 Signaling Technology, USA, Catalog 9664S). The primary antibody was applied diluted 1:200
170 in 1% bovine serum albumin (BSA) and incubated in a humid chamber at 4°C for 22 h. It was
171 washed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) twice for 5 min and then the secondary
172 antibody (PolyDetector) was added and incubated for 30 min and again washed with PBS
173 twice for 5 min. The final reaction was revealed by immersing the slides in 3,3-
174 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 3 min. Next, the slides were washed in running
175 water and counterstained by Harris hematoxylin for 2 min, dehydrated at increasing alcohol
176 concentrations, immersed in xylol and mounted using coverslips and a synthetic resin. It was
177 used positive control for caspase-3 and negative control, where the primary antibody was
178 removed from the reaction.

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

187

188 *Hepatic and renal oxidative stress*

189 The right kidney and the liver of each pup were isolated on PND22 and frozen at -80
190 °C until the day of analysis. Quantification of reduced glutathione (GSH) and advanced protein
191 oxidation products (AOPP) was performed in homogenates from both tissues.

192 In dams, oxidative stress markers (GSH and AOPP) were evaluated only in the liver
193 because only one kidney was collected and it was used for the histopathological evaluation.

194 To obtain the homogenates, the tissues were weighed and immediately macerated with
195 a Potter-type homogenizer in the presence of phosphate-buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.4),
196 The tissue weight (g) by PBS volume (mL) ratios were 1:20 for renal tissue and 1:15 for hepatic
197 tissue. The homogenates were centrifuged (10,000 rpm, 20 min, 4°C) and the supernatants
198 used to quantify the markers.

199 AOPP was quantified according to the technique described by Hanasand et al
200 (Hanasand *et al.* 2012). It is a colorimetric method in which the amount of oxidized proteins
201 (chromophores) is determined in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) at 340nm
202 and 25°C. Results were expressed as nmol/ mL Chloramine-T equivalent.

203 GSH was quantified according to the technique described by Anderson (Anderson
204 1985). This is a colorimetric method in which a decrease in absorbance promoted by NADPH
205 oxidation during the reduction of glutathione oxidized by glutathione reductase is determined
206 in a microplate reader (EnSpire, Perkin Elmer, USA) at 412nm and 25°C. The results were
207 expressed as µmol of GSH/g renal tissue or mmol of GSH/g liver tissue.

208

209 *Statistical analysis*

210 Initially, data were submitted to an exploratory analysis of normality (Shapiro-Wilk test)
211 and homogeneity of variances (Levene's test). If the criteria were reached ($p > 0.01$) parametric
212 tests were conducted. Data that did not reach homogeneity or normality underwent Ln
213 transformation, and were retested. If the criteria failed again, the non-parametric test of
214 Kruskal-Wallis was employed. We used one-way ANOVA complemented with Bonferroni to
215 analyse number of pups per litter, maternal serum levels of AST, ALT, creatinine and urea and
216 immunohistochemistry score for caspase. We used repeated measures ANOVA - RMANOVA
217 - to analyse maternal and offspring body weight profile. Considering that in RMANOVA our
218 data did not pass the criterion of sphericity, we used the statistical values (degrees of freedom
219 and F) corrected by Greenhouse-Geiser's test. Two-way ANOVAs were used to analyse the
220 data from pups (serum AST, ALT, and creatinine as well as renal concentration of GSH and
221 AOPP – as LnAOPP). The factors considered were sex and maternal exposure (i.e., CON,
222 PAR35 or PAR350). Urea and the parameters from the histopathological analysis of the
223 kidneys and liver were evaluated by Kruskal Wallis.

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

226 RESULTS

227

228 *General reproductive toxicity*

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

231 Dams' body weight is presented in **Fig. 1A**. RMANOVA indicated an effect of time on
232 this measure [$F_{(5.26; 189.47)}=252.90$, $p<0.001$] reflecting the changes that are expected to occur
233 during gestation and lactation. There was no interaction between treatment and time of
234 evaluation [$F_{(10.53; 189.47)}=0.807$, $p=0.628$] indicating that the changes in weight were similar
235 through the experimental period for the 3 groups. However, as can be seen in **Fig. 1A**, dams
236 from the CON group were heavier than dams from both PAR groups during the entire
237 experiment, even before the beginning of treatment (GD0). This difference was significant as
238 indicated by RMANOVA [$F_{(2; 36)}=7.28$, $p=0.002$] complemented with Bonferroni test.

239 ANOVA indicated that the number of pups per litter did not differ among the groups [$F_{(2;$
240 $38)}=0.06$, $p=0.94$] and the means \pm SD for CON, PAR35 and PAR350 groups were,
241 respectively, 12.23 ± 2.83 ; 12.17 ± 1.47 and 11.93 ± 2.56 pups.

242 Regarding pups' body weight in the first three weeks of life (**Fig. 1B**), RMANOVA also
243 indicated an effect of time of evaluation [$F_{(1.36; 42.01)}=2767.78$, $p<0.001$] which did not interact
244 with exposure to PAR [$F_{(2.71; 42.01)}=1.26$, $p=0.30$].

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

247

248 *Hepatic and renal biomarkers evaluated in dams*

249 In dams, PAR treatment did not influence serum concentration of creatinine [$F_{(2; 35)}=$
250 0.54 , $p=0.59$] and urea [$F_{(2; 35)}=0.23$, $p=0.80$] as well as ALT activity [$F_{(2; 34)}=1.99$, $p=0.15$].
251 For AST, ANOVA complemented with Bonferroni indicated that both doses of PAR increased
252 this marker [$F_{(2; 34)}=5.13$, $p=0.01$] (**Table 1**) when compared to CON group.

253 Regarding the oxidative stress markers evaluated in the liver, PAR treatment did not
254 influence AOPP [$F_{(2; 36)}=1.55$, $p=0.226$] and GSH [$F_{(2; 36)}=1.15$, $p=0.327$] levels as indicated
255 by ANOVA (**Table 1**)

256 Total histopathological scores for hepatic or renal damage after staining with HE (liver
257 and kidneys) and PAS (kidneys) are presented in **Table 2**. Kruskal-Wallis indicated lack of
258 difference among the three experimental regarding histopathological analysis of the dam's
259 liver [HE: $H_{(2, 21)}=1.33$, $p=0.51$] and kidney [HE: $H_{(2, 21)}=0.92$, $p=0.63$; PAS: $H_{(2, 21)}=3.52$, $p=$
260 0.17]. Representative sections are presented in Figures 2 (A-C) and 3 (A-C), respectively.
261 Despite the lack of statistical significance among groups, alterations were observed in some
262 animals, as reported in **Table 2** (prevalence). In the liver, one dam from each group presented

263 hepatocytes with scarce degenerative changes in the form of vacuolar and hydropic
264 degeneration. Focal areas of necrosis infiltrated with mononuclear cells were observed in one
265 dam from the CON and one dam from the P35 group. In these animals, the portal areas
266 showed mild mononuclear infiltration. In the kidney, mild loss of brush border in the cortical
267 tubules and/or vacuolization was observed in all the dams. Representative images of these
268 alterations are presented in **Supplementary Figures 1** (liver) and **2** (kidney).

269 Lack of difference among groups was also indicated by ANOVA regarding the
270 immunostaining for caspase [$F_{(2; 17)} = 0.11$, $p = 0.89$] in the kidneys and representative sections
271 immunostained for caspase can be observed in **Figure 4**.

272

273 *Hepatic and renal biomarkers evaluated in male and female pups*

274 **Table 3** shows renal and liver serum markers as well as oxidative stress markers
275 evaluated in pups' liver and kidney homogenates. The only parameter that differed among
276 groups was renal levels of GSH [$F_{(2; 63)} = 5.40$, $p = 0.007$] and Bonferroni post-hoc test indicated
277 that pups exposed to 350 mg/kg of PAR presented higher levels of GSH when compared to
278 both CON and PAR35 groups. The statistical results for the other parameters were: serum
279 creatinine [$F_{(2; 51)} = 0.33$, $p = 0.72$]; serum urea [$H_{(2; 56)} = 3.00$, $p = 0.22$]; serum ALT [$F_{(2; 51)} = 0.04$,
280 $p = 0.96$]; serum AST [$F_{(2; 50)} = 1.04$, $p = 0.36$]; renal AOPP [$F_{(2; 63)} = 1.38$, $p = 0.26$]; hepatic AOPP
281 [$F_{(2; 63)} = 1.98$, $p = 0.147$] and hepatic GSH [$F_{(2; 63)} = 1.93$, $p = 0.153$].

282 Total histopathological scores for hepatic and renal damage in male and female pups
283 after staining with HE (liver and kidneys) and PAS (kidneys) are presented in **Table 4**.
284 Representative sections are presented in Figures 2 (D-F) and 3 (D-F), respectively. As
285 observed in the dams' kidney and liver, some alterations were observed in animals from the
286 three groups and Kruskal-Wallis test indicated that the scores among the groups were similar
287 for the kidney [HE: $H_{(5, 42)} = 9.86$, $p = 0.08$; PAS: $H_{(5, 42)} = 3.89$, $p = 0.57$] as well as for the liver
288 [$H_{(5, 42)} = 5.43$, $p = 0.37$]. In the kidney, there were some animals that presented mild tubular cell
289 vacuolization and loss of brush border in the cortical tubules. In the liver, mild hydropic
290 degeneration was the most common alteration observed but in one male and in one female
291 pup from the same P350 litter we observed moderate necrosis and alteration of the liver
292 architecture.

293

294 **DISCUSSION**

295 In the present study, PAR did not influence weight profile of dams or pups or number
296 of delivered pups. Our results corroborate studies in which the experimental design involved
297 gavaging of pregnant (Kristensen *et al.* 2011; Axelstad *et al.* 2014; Dean *et al.* 2016; Klein *et*
298 *al.* 2020; Pereira *et al.* 2020) or pregnant and lactating (Pereira *et al.* 2020) rats with similar
299 doses of PAR investigated in the present study. These studies indicate that this regimen of

300 exposure to PAR does not induce overt general toxicity to rats. In humans, there is a study
301 reporting that the estimated growth curves of foetal parameters did not differ between women
302 reporting use of any medication containing PAR (n=932) and women with no reported use
303 (n=1359) of it (Smarr *et al.* 2019).

304 PAR may induce hepatotoxicity and nephrotoxicity and cytochrome P450s (CYP 450)
305 play an important role in these because they produce the highly reactive metabolite N-acetyl-
306 p-benzoquinoneimine (NAPQI). At therapeutic doses of PAR, the main metabolizing pathways
307 are glucuronidation (40-57%) and sulfation (20-46%). CYPs accounts for 5-15% of the
308 metabolism and the resultant NAPQI is detoxified through conjugation to GSH (Brune *et al.*
309 2015). Hepatic and renal toxicities usually occur if the glucuronidation and sulfation pathways
310 are overwhelmed by higher doses of PAR or if there is a deficiency in GSH. In these cases,
311 NAPQI accumulates and can lead to cell injury (Bessemers and Vermeulen 2001).

312 The evaluation of hepatotoxicity and nephrotoxicity markers in the dams at weaning,
313 i.e., after approximately 36 days of treatment (15 days during pregnancy and 21 days during
314 lactation) showed that both doses of PAR significantly increased seric activity of AST in the
315 absence of alterations in ALT, urea and creatinine as well as in histopathology of kidneys and
316 liver. ALT is a more sensitive marker for liver toxicity whereas AST is more diffusely distributed
317 into different organs/tissues, including heart, skeletal muscle, kidneys, brain and red blood
318 cells (Giannini 2005). Moreover, in PAR-induced hepatotoxicity, both enzymes peak but AST
319 returns to normal values twice faster than ALT (McGovern *et al.* 2015). Since only AST was
320 altered in our study, it could be indicative of PAR-induced toxicity in another tissue rather than
321 the liver. It possibly does not reflect nephrotoxicity either because urea and creatinine seric
322 levels were normal and there was no significant alteration in the kidney morphology nor on the
323 number of apoptotic cells. We could not find in the literature other studies that investigated
324 these markers in pregnant and/or lactating rats after exposure to a human relevant dose and
325 route of exposure. In mice, which are more sensitive than rats to PAR toxicity (Eakins *et al.*
326 2015) and considered a better model to study PAR-induced hepatotoxicity (McGill *et al.* 2012),
327 treatment with 150 mg/kg, gavage, from GD7-21 did not alter ALT on GD 18 (Saad *et al.* 2016).
328 In a study designed to evaluate hepatic adaptation to PAR toxicity, adult male rats were
329 gavaged with 500, 1000 or 1500 mg/kg PAR for 4 consecutive days (Eakins *et al.* 2015). It was
330 observed that only the higher dose resulted in increased AST and ALT activities and
331 hepatocellular damage observed on the second day, but these alterations were all resolved by
332 the fourth day despite the fact that the animals were still being treated. Our study was not
333 designed to induce hepatotoxicity since we used doses therapeutically relevant and not toxic
334 ones. In this way, the study from Eakins (Eakins *et al.* 2015) reinforces that the dose we used
335 was safe for the rat's liver and indicates that even if it had impacted somehow the liver, the

336 process should have been solved after 36 days of treatment. The mechanism of auto
337 protection to PAR has been reported both in humans and animals and seems to involve
338 alterations in the expression of enzymes that transform PAR to the reactive metabolite NAPQI
339 (e.g. CYP2E1), efflux transporters (e.g. ABCC3 and ABCC4) and proteins that regulate GSH
340 levels, which is the main antioxidant molecule that participates in NAPQI detoxification (for a
341 list of references, please refer to (Eakins *et al.* 2015)).

342 In pups, biochemical and morphological markers of hepatic and renal toxicities were
343 not influenced by PAR exposure. Interestingly, pups exposed to the higher dose of PAR, i.e.,
344 350 mg/kg, presented increased antioxidant renal defence as indicated by higher levels of
345 GSH when compared to both CON and PAR35 groups. This result was observed in the
346 absence of alteration in indicators of renal injury such as renal AOPP and histopathology
347 scores as well as seric levels of creatinine and urea. This increased renal GSH concentration
348 could be a homeostatic mechanism triggered by the exposure to a prooxidant (i.e., PAR) during
349 nephrogenesis in order to protect the kidneys from oxidative stress. However, since we did not
350 conduct any evaluation of protein and/or mRNA levels of key markers of this homeostatic
351 mechanism, the biological significance of the observed increased GSH concentration remains
352 to be determined.

353 In toxicological studies, dose selection and period of treatment are points of intense
354 debate and the choices made in each study are usually arguable. For PAR, the most common
355 single-drug formulations out in the market are 500 and 750 mg tablets and the maximum daily
356 dose in humans is 4 g/day divided into four intakes of 1g each 6 h. In the present study, the
357 lower dose (i.e., 35mg/kg, once a day) was extrapolated considering a precautionary approach
358 in which a pregnant woman would take the minimum dose (i.e., single daily use of 500 mg of
359 PAR). But we did include a 10-times higher dose (i.e., 350mg/kg, once a day). If we would
360 consider human daily use of 500 mg each 6 hours, multiple administrations would need to
361 have occurred adding extra challenges to the experimental design. To a certain extent, when
362 a drug is administered once a day but for a certain period of time (in our study, 36 days) in a
363 toxicological study, you may be accounting for shorter exposure to higher doses as well, even
364 though a deep discussion in pharmacokinetics can be made regarding this assumption. Those
365 are the uncertainties inherent to any toxicological study.

366 In conclusion, our results suggest that maternal exposure to human relevant route of
367 exposure and doses of PAR is not associated with hepatic and renal toxicities in rat pups or
368 dams. Noteworthy is that this exposure was not devoid of effects. It induced an increase in
369 GSH levels in the pups' kidneys, which could suggest an adaptive antioxidant response, and

370 impacted the maternal seric activity of AST. Studies are needed to further investigate the origin
371 of this increased AST.

372

373 **CONFLICT OF INTEREST**

374 Nothing declared.

375

376 **ACKNOWLEDGEMENTS**

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

For Review Only

379 **REFERENCES**

- 380 Aleixo J. F. (2019). Tratamento materno com paracetamol: avaliação da toxicidade reprodutiva
381 na prole feminina de ratas. State University of Londrina.
- 382 Anderson M. (1985). Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological
383 samples. *Methods Enzymol.* **113**, 548–555.
- 384 Axelstad M., Christiansen S., Boberg J., Scholze M., Jacobsen P. R., Isling L. K., Kortenkamp
385 A., and Hass U. (2014). Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse
386 developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* **147**, 489–501. doi:10.1530/REP-
387 13-0447
- 388 Bertolini A., Ferrari A., Ottani A., Guerzoni S., Tacchi R., and Leone S. (2006). Paracetamol:
389 New vistas of an old drug. *CNS Drug Rev.* **12**, 250–275. doi:10.1111/j.1527-
390 3458.2006.00250.x
- 391 Bessems J. G. M., and Vermeulen N. P. E. (2001). Paracetamol (Acetaminophen)-induced
392 toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches.
393 *Crit. Rev. Toxicol.* **31**, 55–138. doi:10.1080/20014091111677
- 394 Borghi S. M., Fattori V., Ruiz-Miyazawa K. W., Bertozzi M. M., Lourenco-Gonzalez Y.,
395 Tatakihara R. I., Bussmann A. J. C., Mazzuco T. L., Casagrande R., and Verri W. A.
396 (2018). Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits mouse acute kidney injury induced by
397 diclofenac by targeting oxidative damage, cytokines and NF-κB activity. *Life Sci.* **208**,
398 221–231.
- 399 Brodie B., and Axelrod J. (1948). The fate of acetanilide in man. *J Pharmacol Exp Ther.* **94**,
400 29–38.
- 401 Brune K., Renner B., and Tiegs G. (2015). Acetaminophen/paracetamol: A history of errors,
402 failures and false decisions. *Eur. J. Pain* **19**, 953–965. doi:10.1002/ejp.621
- 403 Burry A H. J. (1972). Phenacetin and analgesic nephropathy. *Med J Aust* **1**, 879–882.

- 404 Conings S., Tseke F., Broeck A. Van Den, Qi B., Paulus J., Amant F., Annaert P., and
405 Calsteren K. Van (2019). Transplacental transport of paracetamol and its phase II
406 metabolites using the ex vivo placenta perfusion model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **370**,
407 14–23. doi:10.1016/j.taap.2019.03.004
- 408 Dean A., Van Den Driesche S., Wang Y., McKinnell C., Macpherson S., Eddie S. L., Kinnell
409 H., Hurtado-Gonzalez P., Chambers T. J., Stevenson K., Wolfinger E., Hrabalkova L.,
410 Calarrao A., Bayne R. Al, Hagen C. P., Mitchell R. T., Anderson R. A., and Sharpe R. M.
411 (2016). Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-
412 generational reproductive consequences. *Sci. Rep.* **6**, 1–12. doi:10.1038/srep19789
- 413 Du K., Ramachandran A., and Jaeschke H. (2016). Oxidative stress during acetaminophen
414 hepatotoxicity: Sources, pathophysiological role and therapeutic potential. *Redox Biol.*
415 **10**, 148–156. doi:10.1016/j.redox.2016.10.001
- 416 Eakins R., Walsh J., Randle L., Jenkins R. E., Schuppe-Koistinen I., Rowe C., Starkey Lewis
417 P., Vasieva O., Prats N., Brillant N., Auli M., Bayliss M., Webb S., Rees J. A., Kitteringham
418 N. R., Goldring C. E., and Park B. K. (2015). Adaptation to acetaminophen exposure
419 elicits major changes in expression and distribution of the hepatic proteome. *Sci. Rep.* **5**,
420 16423. doi:10.1038/srep16423
- 421 Eguia L., and Materson B. J. (1997). Acetaminophen-related acute renal failure without
422 fulminant liver failure. *Pharmacotherapy* **17**, 363–370. doi:10.1002/j.1875-
423 9114.1997.tb03721.x
- 424 Fattori V., Borghi S. M., Guazelli C. F. S., Giroldo A. C., Crespigio J., Bussmann A. J. C.,
425 Coelho-Silva L., Ludwig N. G., Mazzuco T. L., Casagrande R., and Verri W. A. (2017).
426 Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative
427 stress, apoptosis, cytokine production, and NF-κB activation in mice. *Pharmacol. Res.*
428 **120**, 10–22. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.039
- 429 Frazier K. S. (2017). Species differences in renal development and associated developmental

- 430 nephrotoxicity. *Birth Defects Research* **109**, 1243–1256. doi:10.1002/bdr2.1088
- 431 Giannini E. G. (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can. Med. Assoc. J.* **172**,
432 367–379. doi:10.1503/cmaj.1040752
- 433 Hanasand M., Omdal R., Norheim K. B., Gøransson L. G., Brede C., and Jonsson G. (2012).
434 Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin. Chim. Acta*
435 **413**, 901–906. doi:10.1016/j.cca.2012.01.038
- 436 Jaeschke H., Duan L., Akakpo J. Y., Farhood A., and Ramachandran A. (2018). The role of
437 apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* **118**, 709–718.
438 doi:10.1016/j.fct.2018.06.025
- 439 Jaeschke H., and Ramachandran A. (2018). Oxidant stress and lipid peroxidation in
440 acetaminophen hepatotoxicity. *React. Oxyg. Species* **5**, 145–158.
- 441 Klein R. M., Rigobello C., Vidigal C. B., Moura K. F., Barbosa D. S., Gerardin D. C. C., Ceravolo
442 G. S., and Moreira E. G. (2020). Gestational exposure to paracetamol in rats induces
443 neurofunctional alterations in the progeny. *Neurotoxicol. Teratol.* **77**, 1068.
444 doi:10.1016/j.ntt.2019.106838
- 445 Kristensen D. M., Hass U., Lesn L., Lottrup G., Jacobsen P. R., Desdoits-Lethimonier C.,
446 Boberg J., Petersen J. H., Toppari J., Jensen T. K., Brunak S., Skakkebaek N. E.,
447 Nellemann C., Main K. M., Jgou B., and Leffers H. (2011). Intrauterine exposure to mild
448 analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and
449 rat. *Hum. Reprod.* **26**, 235–244. doi:10.1093/humrep/deq323
- 450 Lorz C. (2004). Paracetamol-induced renal tubular injury: a role for ER stress. *J. Am. Soc.*
451 *Nephrol.* **15**, 380–389. doi:10.1097/01.ASN.0000111289.91206.B0
- 452 Mazer M., and Perrone J. (2008). Acetaminophen-induced nephrotoxicity: pathophysiology,
453 clinical manifestations, and management. *J. Med. Toxicol.* **4**, 2–6.
454 doi:10.1007/BF03160941

- 455 McGill M. R., Williams C. D., Xie Y., Ramachandram A., and Jaeschke H. (2012).
456 Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts,
457 mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol.*
458 *Appl. Pharmacol.* **264**, 387-394. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.015.
- 459 McGovern A. J., Vitkovitsky I. V., Jones D. L., and Mullins M. E. (2015). Can AST/ALT ratio
460 indicate recovery after acute paracetamol poisoning? *Clin. Toxicol.* **53**, 164–167.
461 doi:10.3109/15563650.2015.1006399
- 462 Mour G., Feinfeld D. A., Caraccio T., and McGuigan M. (2005). Acute renal dysfunction in
463 acetaminophen poisoning. *Ren. Fail.* **27**, 381–383. doi:10.1081/JDI-65428
- 464 Murray R. M. (1972). Analgesic nephropathy: removal of phenacetin from proprietary
465 analgesics. *Br. Med. J.* **4**, 131–132. doi:10.1136/bmj.4.5833.131
- 466 Nielsen E., Ostergaard G., and Larsen J. (2008). 'Toxicological Risk Assessment of
467 Chemicals: A Practical Guide.' (Informa Healthcare USA,: New York)
- 468 Notarianni L., Oldham H., and Bennett P. (1987). Passage of paracetamol into breast milk and
469 its subsequent metabolism by the neonate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **24**, 63–67.
470 doi:10.1111/j.1365-2125.1987.tb03137.x
- 471 Pereira M. R. F., Aleixo J. F., Cavalcanti L. de F., Costa N. O., Vieira M. L., Ceravolo G. S.,
472 Moreira E. G., and Gerardin D. C. C. (2020). Can maternal exposure to paracetamol
473 impair reproductive parameters of male rat offspring? *Reprod. Toxicol.* **93**, 68–74.
474 doi:10.1016/j.reprotox.2019.12.007
- 475 Pholmoo N., and Bunchorntavakul C. (2019). Characteristics and outcomes of acetaminophen
476 overdose and hepatotoxicity in Thailand. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **7**, 132–139.
- 477 Ramachandran A., and Jaeschke H. (2017). Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity
478 and their translation to the human pathophysiology. *J. Clin. Transl. Res.*
479 doi:10.18053/jctres.03.2017S1.002

- 480 Saad A., Hegde S., Kechichian T., Gamble P., Rahman M., Stutz S. J., Anastasio N. C.,
481 Alshehri W., Lei J., Mori S., Kajs B., Cunningham K. A., Saade G., Burd I., and Costantine
482 M. (2016). Is there a causal relation between maternal acetaminophen administration and
483 ADHD? *PLoS One* **11**, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0157380
- 484 Smarr M. M., Bible J., Gerlanc N., Buck Louis G. M., Bever A., and Grantz K. L. (2019).
485 Comparison of fetal growth by maternal prenatal acetaminophen use. *Pediatr. Res.* **86**,
486 261–268.
- 487 Stern S. T., Bruno M. K., Hennig G. E., Horton R. A., Roberts J. C., and Cohen S. D. (2005).
488 Contribution of acetaminophen-cysteine to acetaminophen nephrotoxicity in CD-1 mice:
489 I. Enhancement of acetaminophen nephrotoxicity by acetaminophen-cysteine. *Toxicol.*
490 *Appl. Pharmacol.* **202**, 151–9. doi:10.1016/j.taap.2004.06.030
- 491 Thiele K., Kessler T., Arck P., Erhardt A., and Tiegs G. (2013). Acetaminophen and pregnancy :
492 short- and long-term consequences for mother and child. **97**, 128–139.
- 493 USEPA (2006). Harmonization in interspecies extrapolation: use of BW 3/4 as default method
494 in derivation of the oral RfD. 1–34.
- 495 Wang X., Wu Q., Liu A., Anadón A., Rodríguez J. L., Martínez-Larrañaga M. R., Yuan Z., and
496 Martínez M. A. (2017). Paracetamol: overdose-induced oxidative stress toxicity,
497 metabolism, and protective effects of various compounds in vivo and in vitro. *Drug Metab.*
498 *Rev.* **49**, 395–437. doi:10.1080/03602532.2017.1354014
- 499 Werler M. M., Mitchell A. A., Hernandez-Diaz S., and Honein M. A. (2005). Use of over-the-
500 counter medications during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **193**, 771–777.
501 doi:10.1016/j.ajog.2005.02.100
- 502 Yaman H., Cakir E., Akgul E. O., Aydin I., Onguru O., Cayci T., Kurt Y. G., Agilli M., Aydin F.
503 N., Gulec M., Altinel O., Isbilir S., Ersoz N., Yasar M., Turker T., Bilgi C., and Erbil K. M.
504 (2013). Pentraxin 3 as a potential biomarker of acetaminophen-induced liver injury. *Exp.*

505 *Toxicol. Pathol.* **65**, 147–51. doi:10.1016/j.etp.2011.07.003

506

For Review Only

507 **Table 1. Hepatic and renal markers in dams treated or not with paracetamol.**
 508 Data are means \pm SD of 12-14 animals in each group. * $p < 0.05$ compared to CON (ANOVA
 509 complemented with Bonferroni). ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate
 510 aminotransferase; AOPP: advanced oxidation protein products; GSH: reduced glutathione;
 511 CON: control group; PAR35: group treated with 35mg/kg of paracetamol; PAR 350: group
 512 treated with 350mg/kg of paracetamol.

	CON	PAR35	PAR350
SERUM			
ALT (U/L)	137.92 \pm 28.57	163.08 \pm 34.24	152.69 \pm 23.73
AST (U/L)	176.33 \pm 23.45	245.33 \pm 74.88*	231.54 \pm 57.00*
Creatinine (mg/dL)	0.288 \pm 0.097	0.325 \pm 0.076	0.298 \pm 0.101
Urea (mg/dL)	81.77 \pm 11.35	78.42 \pm 10.61	80.38 \pm 14.58
LIVER			
AOPP (nmol/mL)	1561.33 \pm 294.49	1685.41 \pm 292.36	1470.35 \pm 338.58
GSH (mmol/g)	14.45 \pm 6.29	17.08 \pm 10.34	18.39 \pm 6.82

513

514

515 **Table 2. Total histopathological scores for hepatic and renal damage in dams treated**
 516 **or not with paracetamol and number of animals that presented any type of lesion**
 517 **(prevalence).**

518 Score data from HE and PAS staining are medians (minimum-maximum values) and were
 519 analysed by Kruskal-Wallis whereas score data from caspase immunohistochemistry are
 520 means \pm SD and were analysed by ANOVA ($p > 0.05$). HE: hematoxylin & eosin; PAS:
 521 periodic acid-Schiff; IHC: immunohistochemistry; CON: control group; PAR35: group treated
 522 with 35mg/kg of paracetamol; PAR 350: group treated with 350mg/kg of paracetamol.

		CON	PAR35	PAR350
Liver (HE)	Score	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-1.0)	0.0 (0.0-1.0)
	Prevalence	3/7	2/7	1/7
Kidney (HE)	Score	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-1.0)
	Prevalence	6/7	5/7	5/7
Kidney (PAS)	Score	2.0 (2.0-3.0)	3.0 (2.0-4.0)	2.0 (0.0-4.0)
	Prevalence	7/7	7/7	6/7
Kidney (caspase IHC)	Score	10.68 \pm 8.93	11.46 \pm 9.33	12.96 \pm 8.31
		(n=6)	(n=7)	(n=7)

523

524

Table 3. Hepatic and renal markers in 22-day-old female and male pups maternally exposed or not to paracetamol.

525

Data are means \pm SD and were analysed by two-way ANOVA except for urea data, which were analysed by Kruskal-Wallis. $p > 0.05$. AST:

526

aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; CON: control group; PAR35: group exposed to 35mg/kg of paracetamol; PAR 350:

527

group exposed to 350mg/kg of paracetamol.

	CON		PAR35		PAR350	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
SERUM	n=9	n=10	n=10	n=9	n=9	n=10
ALT(U/L)	90.78 \pm 11.86	86.20 \pm 28.50	88.70 \pm 13.57	84.00 \pm 15.02	92.11 \pm 34.06	82.20 \pm 22.44
AST (U/L)	425.78 \pm 65.92	393.40 \pm 147.98	366.70 \pm 81.21	382.67 \pm 81.67	393.67 \pm 172.32	332.22 \pm 64.69
Creatinine (mg/dL)	0.067 \pm 0.087	0.090 \pm 0.099	0.070 \pm 0.067	0.122 \pm 0.083	0.089 \pm 0.092	0.110 \pm 0.088
Urea (mg/dL)	49.33 \pm 8.88	50.40 \pm 13.07	46.33 \pm 6.00	46.11 \pm 9.71	50.11 \pm 3.89	49.2 \pm 5.43
LIVER	n=13	n=11	n=10	n=11	n=13	n=11
AOPP (nmol/mL)	1102.07 \pm 244.12	1135.60 \pm 338.21	1099.99 \pm 192.95	1284.24 \pm 308.78	1271.23 \pm 309.77	1337.75 \pm 481.81
GSH (mmol/g)	21.69 \pm 10.17	16.50 \pm 6.43	14.62 \pm 4.47	16.19 \pm 5.72	16.88 \pm 5.21	15.43 \pm 6.71
KIDNEY	n=13	n=11	n=10	n=11	n=13	n=11
AOPP (nmol/mL)	1126.47 \pm 64.92	1328.52 \pm 189.68	1286.90 \pm 114.59	1505.77 \pm 88.24	1143.23 \pm 84.21	1447.18 \pm 175.09
GSH (μ mol/g)	90.46 \pm 8.67	89.81 \pm 7.04	94.72 \pm 7.32	97.44 \pm 5.95	104.62 \pm 7.33*	122.12 \pm 6.72*

529 **Table 4. Total histopathological scores for hepatic and renal damage in 22-day-old**
 530 **male and female pups maternally exposed or not to paracetamol and number of pups**
 531 **that presented any type of lesion (prevalence).**

532 Score data are medians (minimum-maximum values) and were analysed by Kruskal-Wallis
 533 ($p > 0.05$). HE: hematoxylin & eosin; PAS: periodic acid-Schiff; CON: control group; PAR35:
 534 group exposed to 35mg/kg of paracetamol; PAR 350: group exposed to 350mg/kg of
 535 paracetamol.

	CON	PAR35	PAR350
LIVER (HE)			
Male Score	1.0 (0.0-3.0)	2.0 (0.0-2.0)	2.0 (0.0-8.0)
Male Prevalence	4/7	6/7	7/7
Female Score	2.0 (0.0- 2.0)	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-8.0)
Female Prevalence	6/7	7/7	7/7
KIDNEY (HE)			
Male Score	0.0 (0.0-2.0)	0.0 (0.0-0.0)	1.0 (0.0-1.0)
Male Prevalence	2/7	0/7	4/7
Female Score	1.0 (0.0-2.0)	0 (0.0-1.0)	1.0 (0.0-1.0)
Female Prevalence	5/7	2/7	4/7
KIDNEY (PAS)			
Male Score	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-2.0)	2.0 (0.0-3.0)
Male Prevalence	4/7	5/7	4/7
Female Score	2.0 (0.0-3.0)	2.0 (0.0-4.0)	1.0 (0.0-4.0)
Female Prevalence	5/7	5/7	5/7

536

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

543 **Fig. 2:** Representative sections of dams' (A-C) and pup' livers (D-F) stained with HE (4x
544 magnification). A and D: control; B and E: 35 mg/kg of paracetamol; C and F: 350 mg/kg of
545 paracetamol. Scale= 25 μ m.
546

547

548 **Fig. 3:** Representative sections of dams' (A-C) and pups' kidneys (D-F) stained with HE (4x
549 magnification). A and D: control; B and E: 35 mg/kg of paracetamol; C and F: 350 mg/kg of
550 paracetamol. Scale= 25 μ m.

551

552 **Fig. 4:** Representative sections (magnification 400x) of dams' kidney immunostained for
553 caspase-3. Circles indicate the nucleus immunostaining. A: control group; B: 35 mg/kg of
554 paracetamol; C: 350 mg/kg of paracetamol. Scale= 25 μ m.

555

556

557 **Suppl Fig. 1:** Representative sections of dams' livers stained with HE (A-C). A: normal hepatic
558 architecture (200x magnification). Independently from the treatment group it was observed
559 portal tract with scarce inflammatory cells including eosinophils (B, arrow, 400x magnification)
560 as well as sinusoidal eosinophil (C, circle, 400x magnification). Scale= 25 μ m.

561

562 **Suppl Fig. 2:** Representative sections (magnification 400x) of dams' kidney stained with HE.
563 Independently of treatment, loss of brush border (B, arrow) and cytoplasmic vacuolization (C,
564 arrow) were observed in the kidney of the animals. Scale= 25 μ m.

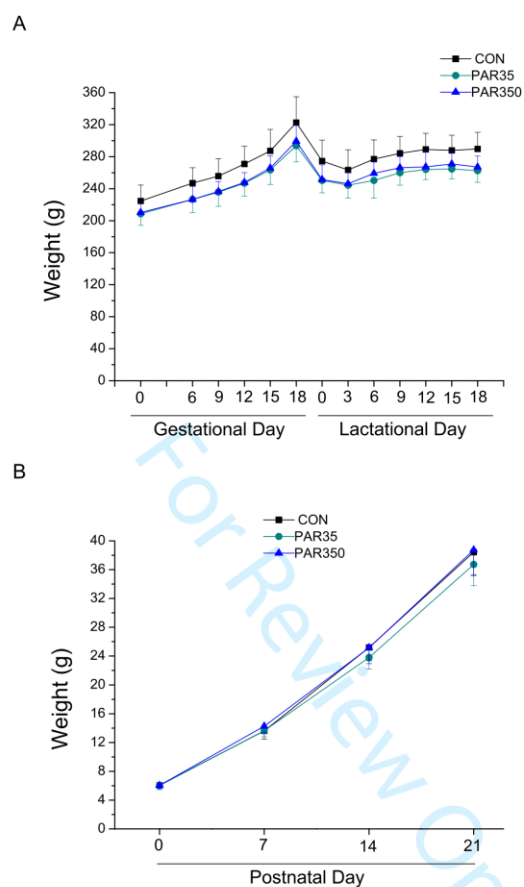


Fig. 1. Dams' body weight during gestation and lactation (A) and litter weight (male and female pups combined) divided by the number of pups in the litter during the first three weeks of life (B). Data are means \pm SD ($n=12-13$). In A, RMANOVA complemented with Bonferroni indicated that PAR treatment 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 ($p>0.05$).

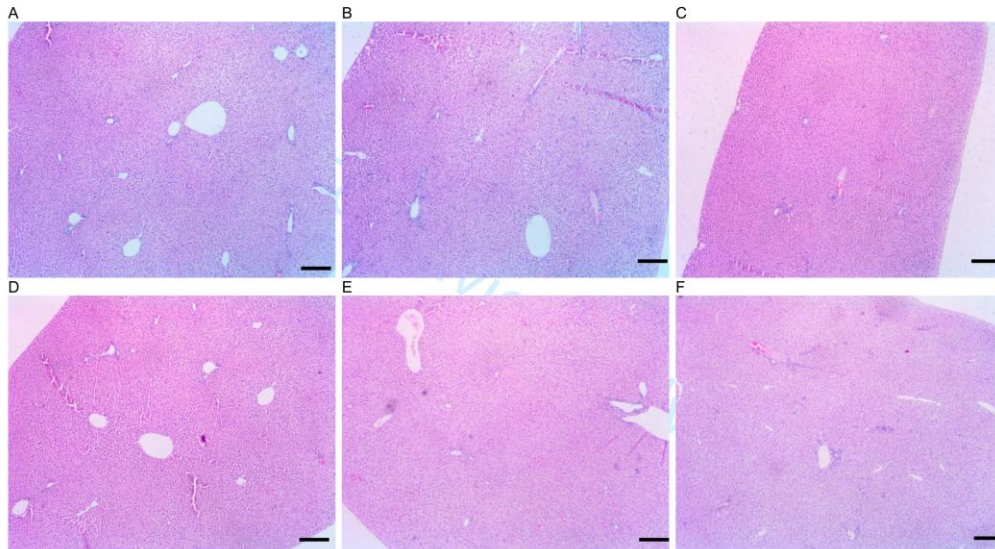


Fig. 2: Representative sections of dams' (A-C) and pups' livers (D-F) stained with HE (4x magnification). A and D: control; B and E: 35 mg/kg of paracetamol; C and F: 350 mg/kg of paracetamol. Scale= 25 μ m.

<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

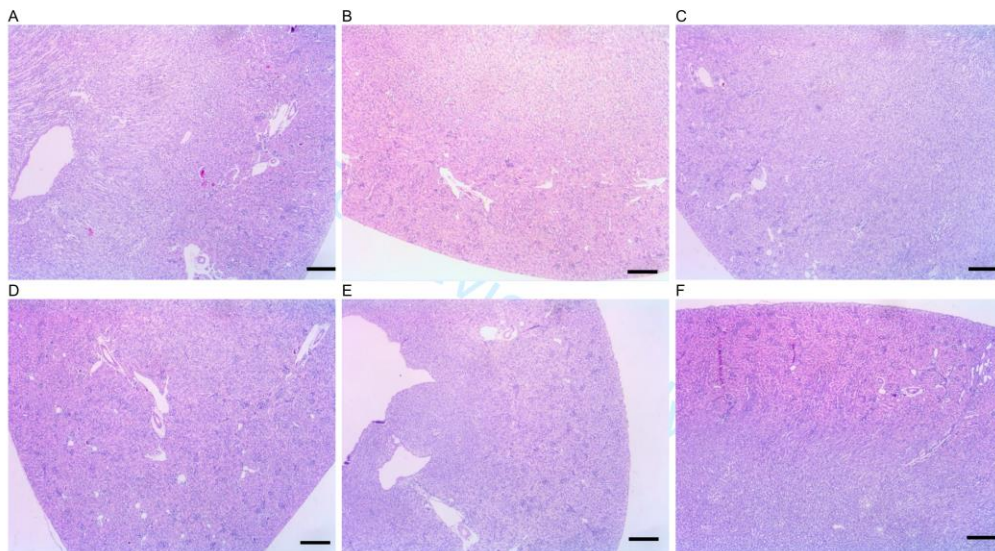
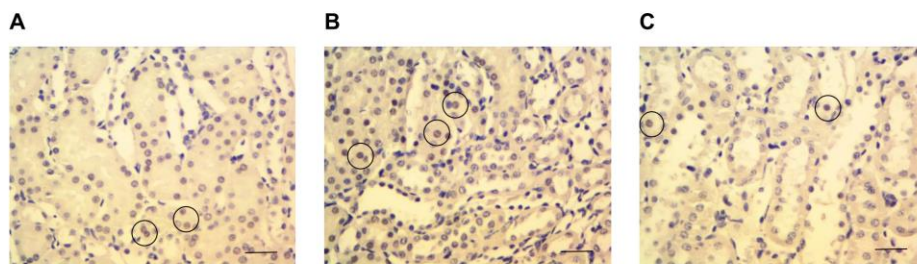


Fig. 3: Representative sections of dams' (A-C) and pups' kidneys (D-F) stained with HE (4x magnification). A and D: control; B and E: 35 mg/kg of paracetamol; C and F: 350 mg/kg of paracetamol. Scale= 25 μ m.

<http://www.publish.csiro.au/journals/rfd>

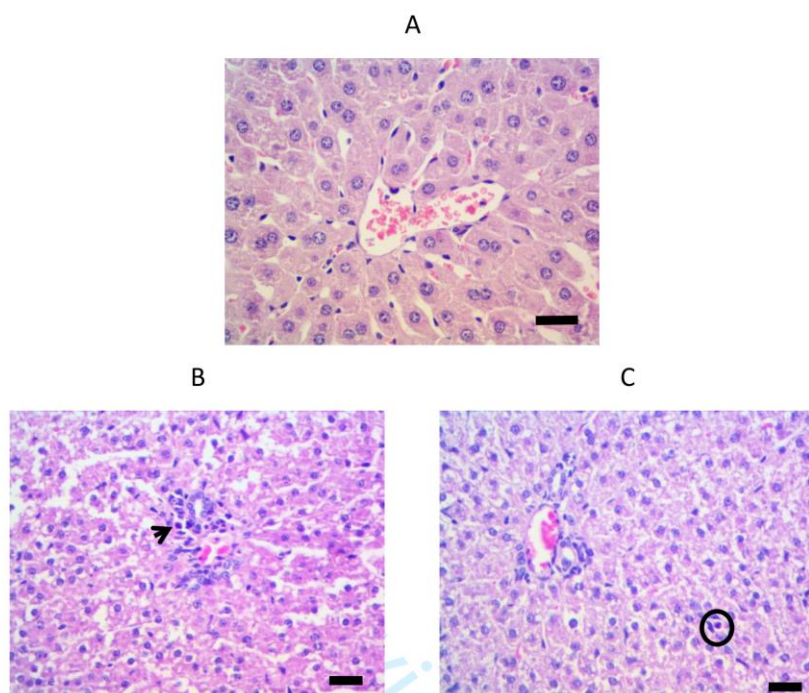


1

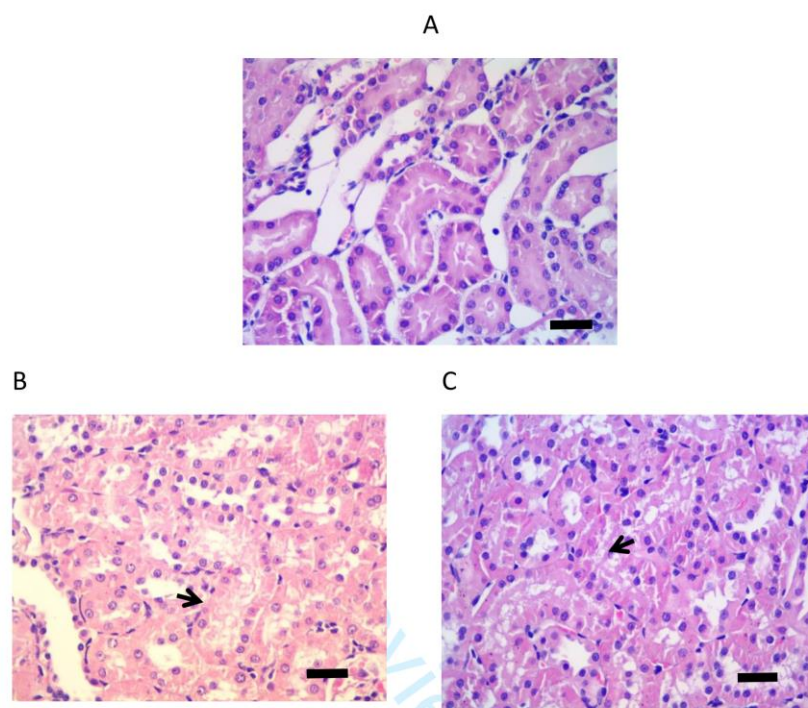
2 **Fig. 4:** Representative sections (magnification 400x) of dams' kidney immunostained for
3 caspase-3. Circles indicate the nucleus immunostaining. A: control group; B: 35 mg/kg of
4 paracetamol; C: 350 mg/kg of paracetamol. Scale= 25 μ m.

5

For Review Only



Suppl Fig. 1: Representative sections of dams' livers stained with HE (A-C). A: normal hepatic architecture (200x magnification). Independently from the treatment group it was observed portal tract with scarce inflammatory cells including eosinophils (B, arrow, 400x magnification) as well as sinusoidal eosinophil (C, circle, 400x magnification). Scale= 25 μm .



- 1 **Suppl Fig. 2:** Representative sections (magnification 400x) of dams' kidney stained with HE.
- 2 Independently of treatment, loss of brush border (B, arrow) and cytoplasmic vacuolization (C,
- 3 arrow) were observed in the kidney of the animals. Scale= 25 μ m.
- 4

4.2 Artigo 2

Behavioural Brain Research
PERINATAL EXPOSURE TO PARACETAMOL: DOSE AND SEX-SPECIFIC
EFFECTS IN BEHAVIOUR AND BRAIN'S OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
PROGENY
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Acetaminophen; developmental neurotoxicity; neurodevelopmental disorders; reduced glutathione; superoxide dismutase activity
Corresponding Author:	Estefania Gastaldello Moreira, PhD State University of Londrina Londrina, Parana BRAZIL
First Author:	Camila Rigobello, Master
Order of Authors:	Camila Rigobello, Master Rodrigo Moreno Klein, Master Juliana Diosti Debiasi Luis Guilherme Ursini Ana Paula Michelin, Master Andressa Keiko Matsumoto, Master Décio Sabbatini Barbosa, PhD Estefania Gastaldello Moreira, PhD
Abstract:	Paracetamol (PAR) has been employed worldwide for pain and fever treatment during pregnancy and lactation. Epidemiologic studies have shown that exposure to PAR can increase the risk for developmental disorders, such as attention-deficit hyperactive disorder and autism spectrum disorder. This study aimed to investigate if gestational and lactational exposure to human-relevant doses of PAR could alter behavioural and brain oxidative stress parameters in the rat's offspring. Wistar dams were gavaged daily with water or PAR (35 mg/kg/ or 350 mg/kg) during gestational day 6 to weaning (postnatal day 21). Behavioural assessments occurred at post-natal days 10 (nest seeking test), 27 (behavioural stereotypy) and 28 (three chamber sociability test and open field). Concentration of advanced oxidation protein products (AOPP), reduced glutathione (GSH), lipid hydroperoxides (LOOH) and activity of superoxide dismutase (SOD) were estimate in prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum of 22-days-old rats. Compared to CON animals, males exposed to PAR during pregnancy and lactation augmented apomorphine-induced stereotyped behaviour (350 mg/kg) and ambulation in open-field test (35 mg/kg). Reduced exploratory behaviour in three chamber sociability test was observed in pups exposed to PAR at 350 mg/kg in both sexes. PAR treatment decreased hippocampal GSH level and striatal SOD activity in males exposed to 35 mg/kg, suggesting the vulnerability of these areas in PAR-induced developmental neurotoxicity. Findings suggest PAR use during pregnancy and lactation as a potential risk factor for neurodevelopmental disorders with more susceptibility in males.

PERINATAL EXPOSURE TO PARACETAMOL: DOSE AND SEX-DEPENDENT
EFFECTS IN BEHAVIOUR AND BRAIN'S OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
PROGENY

Camila Rigobello^a, Rodrigo Moreno Klein^a, Juliana Diosti Debiasi^b, Luis Guilherme Ursini^b,
Ana Paula Michelin^a, Andressa Keiko Matsumoto^a, Décio Sabbatini Barbosa^a, Estefânia
Gastaldelo Moreira^{a,b,*}

^aGraduation Program in Health Sciences, State University of Londrina, 86038-350, Londrina,
PR, Brazil

^bDepartment of Physiological Sciences, State University of Londrina, 86057-970, Londrina,
PR, Brazil

*Corresponding author: egmoreira@uel.br

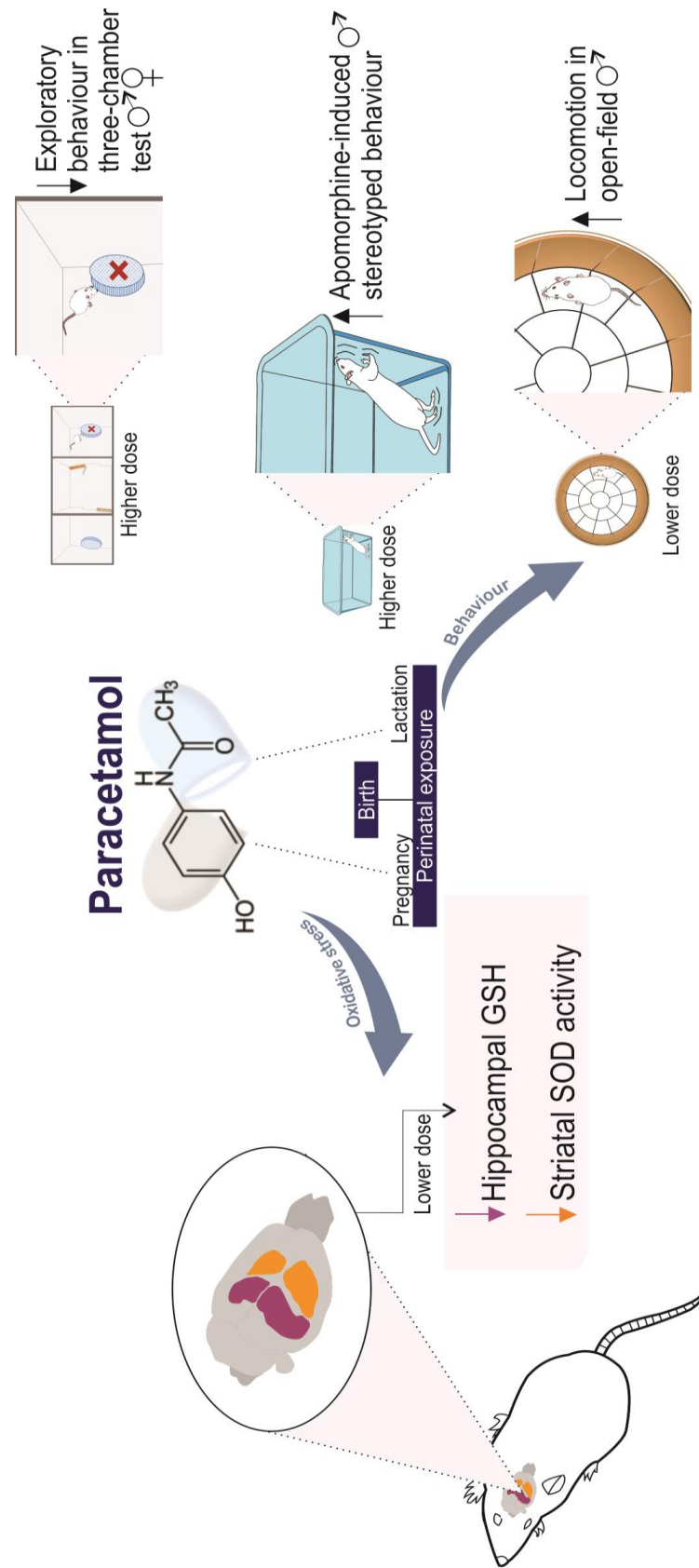
Depto de Ciências Fisiológicas, CCB

UEL- Campus Universitário

86057-970 – Londrina-PR- Brasil

+55 43 3371-4307

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Paracetamol (PAR) has been employed worldwide for pain and fever treatment during pregnancy and lactation. Epidemiologic studies have shown that exposure to PAR can increase the risk for developmental disorders, such as attention-deficit hyperactive disorder and autism spectrum disorder. This study aimed to investigate if gestational and lactational exposure to human-relevant doses of PAR could alter behavioural and brain oxidative stress parameters in the rat's offspring. Wistar dams were gavaged daily with water or PAR (35 mg/kg or 350 mg/kg) during gestational day 6 to weaning (postnatal day 21). Behavioural assessments occurred at post-natal days 10 (nest seeking test), 27 (behavioural stereotypy) and 28 (three-chamber sociability test and open field). Concentration of advanced oxidation protein products (AOPP), reduced glutathione (GSH), lipid hydroperoxides (LOOH) and activity of superoxide dismutase (SOD) were estimated in prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum of 22-day-old rats. Compared to CON animals, males exposed to PAR during pregnancy and lactation augmented apomorphine-induced stereotyped behaviour (350 mg/kg) and ambulation in open-field test (35 mg/kg). Reduced exploratory behaviour in three-chamber sociability test was observed in pups exposed to PAR at 350 mg/kg in both sexes. PAR treatment decreased hippocampal GSH level and striatal SOD activity in males exposed to 35 mg/kg, suggesting the vulnerability of these areas in PAR-induced developmental neurotoxicity. Findings suggest PAR use during pregnancy and lactation as a potential risk factor for neurodevelopmental disorders with males being more susceptible.

Keywords: Acetaminophen, developmental neurotoxicity, neurodevelopmental disorders, reduced glutathione, superoxide dismutase activity

1 INTRODUCTION

Paracetamol (PAR, acetaminophen) is an over-the-counter analgesic and antipyretic medication widely used in pregnancy [1–4] mainly in the third trimester [5, 6], which is an important neurodevelopmental period [7]. This drug and its metabolites may reach the fetus/neonates [8] through placental transfer [8,9] and excretion into breast milk [10].

Epidemiological data have been suggesting that maternal exposure to PAR increases the risk for neurodevelopmental disturbances, such as Autism Spectrum Disorders (ASD) [11,12] and Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) [13–17]. Tardive neurobehavioural alterations have been observed in children exposed to PAR perinatally such as: hyperactivity, impulsivity, autism spectrum symptoms (1 and 5 years old) [15], impaired attention and executive functions (5 years old) [18], language delay/impairment (18-months and 5 years old) [18–21], poor/delayed motor development (18-months and 3-years old) [21,22], externalizing and internalizing behaviour problems (3 years old) [21] and emotional alterations (7 years old) [23]. However, population-based research does not support the assumption of causality considering the difficulty for controlling confounding factors.

Studies in experimental animals showed that PAR maternal treatment (5 and 15 mg/kg/ day) during gestational day (GD) 0 to postnatal day (PND) 60 resulted in neurochemical and behavioural alterations in 2-month-old rats offspring such as: a) impaired cognitive function, exploratory abilities and poor social interaction [23]; b) altered monoaminergic metabolism in the hypothalamus [24], cerebellum [25], bulb [26] and spinal cord [27]. Administration of PAR (2 doses of 30 mg/kg, s.c.) at PND 3 and 10 but not at PND 19 decreased the habituation pattern (locomotory and exploratory activities) in 2-month-old mice [28]. Moreover, the same protocol resulted in decreased analgesic and anxiolytic effect induced by an acute administration of PAR to adult mice that have been maternally exposed to this drug [29]. Klein et al [30] described that gestational exposure (350 mg/kg, gavage, GD 6 until delivery) impaired olfactory discrimination and emotionality whereas augmented apomorphine-induced stereotyped behaviour in the progeny.

At therapeutic doses of PAR, glucuronidation (40-57%) and sulfation (20-46%) are the main metabolic pathways, whereas the oxidative route by CYP450 accounts for 5-15%. This later route produces the reactive metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) which is neutralized by reduced glutathione [31]. At higher doses of PAR, the main metabolic pathways are saturated leading to excessive NAPQI generation and glutathione depletion. In this scenario, cell damage may occur [32]. The presence of CYP isoforms in the brain indicates a potential for local production of NAPQI [33,34] and, consequently, induction of

oxidative stress. Mice maternally exposed to PAR (150 mg/kg, i.p., PND 7 to 13) [35] presented increased brain lipid peroxidation at PND 13 reinforcing the hypothesis that oxidative stress may play a role in PAR-induced developmental neurotoxicity [36,37]. However, perinatal exposure to PAR did not alter reduced glutathione and lipid hydroperoxides levels in the prefrontal cortex and hippocampus from rats (350 mg/kg, gavage, DG 6 until delivery) [30], as well as reduced and oxidized glutathione levels in mice's brain (100 e 150 mg/kg, i.p., PND 7 to 13) [35].

Based on the above considerations, we aimed to investigate the potential developmental neurotoxicity of PAR through analysis of behavioural and oxidative stress markers. We evaluated, in male and female pups maternally exposed to PAR, behavioural parameters (olfactory discrimination, locomotor activity, sociability and stereotypy) as well as oxidative markers (concentration of advanced oxidation protein products, reduced glutathione, lipid hydroperoxides as well as superoxide dismutase activity) in four encephalic regions (prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cerebellum) which have been reported to be involved in the pathophysiology of neurodevelopmental disorders [38–40]. Our study was designed with human-relevant PAR doses and followed international guidelines for designing developmental neurotoxicity studies [41].

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and treatment

For parent generation, adult male and female Wistar rats from the State University of Londrina colony were mated overnight (two virgin females and one male per cage). Gestational day (GD) 0 was ascertained by spermatozoa presence in vaginal smears. Thereon, the dams were individually housed under environmentally-controlled conditions, such as $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ temperature, 12 h dark/light cycle (lights on at 06:00 AM) and free access to rat chow (Nuvital™, Nuvilab CR1, Paraná, Brazil) and tap water. Thirty-nine mated females were randomly allocated into three experimental groups. Treatment started after implantation period (GD 6) and finished at weaning (PND 21). PAR (Tylenol®, Johnson & Johnson, Brazil) was daily administered through gavage in the doses of 35 mg/kg (PAR35; n= 13) or 350 mg/kg (PAR350; n= 14) whereas control group (CON; n= 14) received tap water. PAR35 dose represents a dosimetric adjustment of the dose of 500 mg/day in humans (65 kg) [42] whereas for PAR350 a security factor of 10 was added considering intraspecies variability

[43]. Dams were weighted every 3 days during gestation and lactation, starting at GD 6, and administration volume was adjusted according to body weight.

At PND 4, litters were culled to 10 pups (sex-balanced whenever possible). Litters smaller than 8 pups were discarded. Litter weight was registered on PND 0, 7, 14 and 21, the day in which pups were weaned and housed separated by sex until behavioural evaluation or euthanasia.

The 5 pairs (1 male and 1 female) of infant rats from each litter were distributed across the different analysis as follows:

- pair 1: nest seeking and oxidative stress markers;
- pairs 2 and 3: oxidative stress markers;
- pair 4: open field and three-chamber sociability;
- pair 5: behavioural stereotypy.

All experimental protocols were approved by the State University of Londrina Ethics Committee for Animal Research (n° 80/2017 and n° 141/2017).

2.2 Behavioural tests

All the tests were conducted in a quiet room containing a video recording system for further analysis by an examiner unaware of the exposure. Behavioural assessments were performed in 1 male and 1 female pup from each litter, which were randomly assigned. Males were tested first in order to avoid sexual odor interferences in outcomes.

2.2.1 Nest seeking test (olfactory discrimination)

The latency of infant rats to reach nest bedding based on olfactory cues was evaluated in the morning of PND 10, as described by Schneider and Przewłocki [44]. Animals (n=78) were individually placed in the center of a rectangular acrylic container (20 cm L × 8 cm W × 8 cm H) divided into three equal areas demarcated with permanent ink. One of the side compartments was filled with 10 g of bedding from home cage whereas the opposite side with 10 g of fresh clean shavings. Positive entry was considered when the head and forepaws crossed the delimited zone towards one of the compartments. The test duration was 3 min. Considering the limited locomotion at this age [45], the time spent in locomotion was analyzed, instead of distance traveled.

2.2.2 Behavioural stereotypy

On PND 27, after subcutaneous injection of apomorphine (0.3 mg/kg, Sigma, USA), the pups (n= 78) were individually tested in acrylic rectangular boxes (20 cm L × 8 cm W × 8 cm H) for 120 minutes. Stereotyped behaviour was scored each 10-minutes intervals with 10-seconds observational period accordingly to a 6-point scoring scale proposed by Setler et al [46]. The intensity of stereotypies was evaluated by cumulatively summing scores (total scores after 30, 60, 90 and 120 min).

2.2.3 Three-chamber sociability test

Sociability and social novelty preference were evaluated in a 120 cm L × 40 cm W × 40 cm H wooden apparatus composed by three equally sized chambers separated by hand-operated doors [47,48]. At PND 28, pups (n=56) were individually confined in the central compartment (neutral area) for preconditioning (habituation and pretest) with the doors to the lateral chambers closed, and so, the animal would be habituated only to the central area. Five minutes later, the doors were opened, and the animal was allowed to access the lateral chambers for 10-minutes of free exploration. One side chamber contained an unfamiliar pup of the same sex and age enclosed in a plastic basket with holes (social area) while in the opposite side chamber there was a novel object, i.e., an empty plastic basket (novel object area). Time spent in each of the three areas and numbers of transitions across chambers were recorded. An entry began when the rat placed all four paws into one of the three chambers and finished only after placing them into another. The time spent by subjects in each area was measured during the period with placement of all four paws in the compartment. Social behaviour was established as sociability index (SI) following a mathematical equation: $SI = [(time\ in\ social\ area - time\ in\ novel\ object\ area) / (time\ in\ social\ area + time\ in\ novel\ object\ area)]$ [49]. The time the animal spent in sniffing near the social area has also been registered as a measure of active social interaction. The apparatus was cleaned with a 70% ethanol solution and dried with paper towels after each trial.

2.2.4 Open field test (locomotion and emotionality)

At PND 28, pups (n=70) were placed individually in the center of a circular wooden arena (72 cm in diameter) which floor was divided into 12 equal quadrants and allowed 5 min to freely explore it. Ambulation (quadrants crossed with all four paws) and rearing (standing on hind legs) were counted to estimate locomotor activity. Time spent in central quadrants and in rostral (self-grooming of nose and head region) and body grooming (trunk, tail and

anogenital regions) were evaluated as measures of emotionality [50]. The apparatus was cleaned with a 5% ethanol solution and dried with paper towels after each trial.

2.3 Tissue sampling and brain oxidative stress assessment

At PND 22, prefrontal cortex (PFC), striatum (ST), hippocampus (HPC) and cerebellum (CB) were isolated from the brain right after decapitation. All samples were maintained at -80° C freezer until oxidative stress analysis.

Brain areas of three pups from each sex from the same litter (CON= 12; PAR35= 10; PAR350= 12) were pooled, whenever possible. The pool was homogenized in phosphate buffered saline (0.1 M PBS, pH 7.4) in a Pyrex® Potter-Elvehjem tissue grinder (1:6 wet weight/volume) and centrifuged (Hettich® Rotanta 46R centrifuge) for 15 minutes at 4 °C and 1000 G. The final supernatant employed in the biomarkers analysis was further centrifuged at 4 °C and 9072 G for 15 min.

AOPP levels were determined using a method [51] with volumetric modifications. Absorbance measurements at 340 nm were performed in a microplate spectrophotometer reader (model EnSpire, Perkin Elmer, USA) and the results were expressed as nmol Chloramine T equivalent/mg protein.

GSH concentration was determined accordingly to Tietze et al. [52] with further modifications [53]. Absorbance at 412 nm was measured and the results were expressed as nmol/mg protein.

LOOH were assayed by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence in a Glomax luminometer (model TD 20/20, Turner Designers, USA) [54]. The readings were performed protected from light at 30 °C for 60 minutes and the results were expressed as relative light units (RLU)/mg protein through the determination of the area under the curve (OriginLab® 7.5 software).

SOD activity was estimated using a kinetic/colorimetric procedure [55]. The enzymatic activity was measured in a microplate reader at 420 nm and 37 °C for 6 minutes. Optical densities (OD) were recorded in each minute and the final result is presented as USOD/min/mg protein.

Total protein quantification was determined using the Lowry's colorimetric method [56], with modifications [57]. The absorbance at 660 nm was determined in the microplate spectrophotometer reader and the data obtained as mg/L was used to normalize oxidative stress markers.

2.4 Statistical analysis

Gaussian distribution (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test) were verified for each variable. If the criteria were reached ($p > 0.01$) for the raw data or after Ln transformation, data were analyzed by two-way ANOVA (factors were maternal exposure and pup's sex) followed by Bonferroni post-hoc test. Behavioural stereotypy data were submitted to repeated measures ANOVA (RMANOVA), considering the same factors. Whenever there was a significant interaction between exposure and sex, data from males and females were analyzed separately through one-way ANOVA complemented with Bonferroni. The non-parametric test of Kruskal-Wallis was employed when the assumptions for ANOVA were violated (latency to nest bedding in nest seeking test, time spent in sniffing in the three-chamber test and grooming in open-field). As a measure of effect size we determined partial eta squared (partial η^2) for all the analysis. We used the IBM-SPSS Windows version 22 to analyze the data. Conclusions were established at $p \leq 0.05$ but marginal significances, i.e., $p < 0.10$ are described.

3 RESULTS

From 41 litters, 2 were excluded (1 CON e 1 PAR35) because they contained less than 8 pups. Stillborn occurred in 1 out of 13 CON (2 stillborns), 1 out of 12 PAR35 (1 stillborn) and 3 out of 14 PAR350 (1, 1 and 2 stillborns in each of the 3 affected litters). Data from dams' and pups' weight gain are reported elsewhere [58].

Readers may refer to the Supplementary Tables 1 and 2 in order to have access to the statistical values (F/H, df, p and partial η^2) for each factor from all the endpoints analyzed.

3.1 Behavioural tests

3.1.1 Nest-seeking test (olfactory discrimination)

None of the pups exhibited eye opening at the time of testing. Clean bedding side was visited by 2 animals (1 female and 1 male) exposed to PAR350. One male CON did not reach nest bedding chamber and was excluded from the statistical analysis. Lack of significant PAR exposure effect was indicated by two-way ANOVA on locomotion time [$F_{(2, 69)} = 0.678$; $p = 0.511$, partial $\eta^2 = 0.019$] and by Kruskal-Wallis on latency to nest bedding [$H_{(5; 78)} = 1.959$, $p = 0.855$, partial $\eta^2 = 0.030$] (Fig. 1).

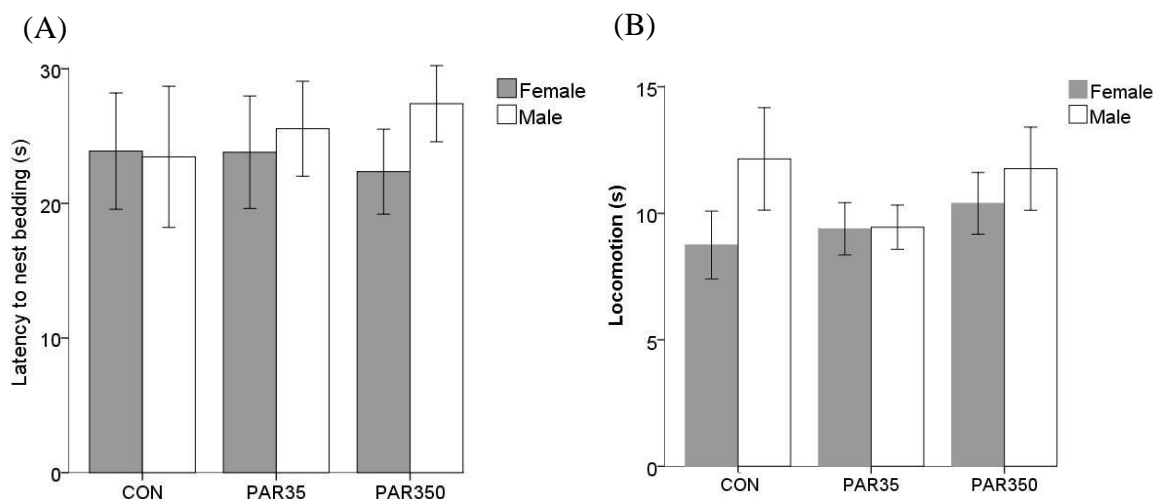


Figure 1. Evaluation of latency to reach nest bedding (A) and time spent in locomotion (B) in 10-day-old rats exposed or not to PAR (35 or 350 mg/kg) during gestation and lactation in the nest seeking test. Data are means \pm SEM of 11-14 animals in each group. CON: animals exposed to water; PAR35: animals exposed to 35 mg/kg; PAR350: animals exposed to 350 mg/kg.

3.1.2 Behavioural stereotypy

All animals exhibited apomorphine-induced stereotypies. Two-way RMANOVA showed an interaction between time of evaluation (i.e., 30, 60, 90 and 120 min), sex and PAR exposure [$F_{(6; 216)} = 2.456$, $p = 0.026$, partial $\eta^2 = 0.064$] in stereotypy intensity. So, one-way ANOVAs for each sex at each time-point were conducted. There was an exposure effect in males at 90 min [$F_{(2; 38)} = 5.599$, $p = 0.008$, partial $\eta^2 = 0.237$] and 120 min [$F_{(2; 38)} = 4.376$, $p = 0.020$, partial $\eta^2 = 0.196$] and Bonferroni test pointed that in both cases, PAR350 males presented higher stereotypy scores than CON males (Figure 2).

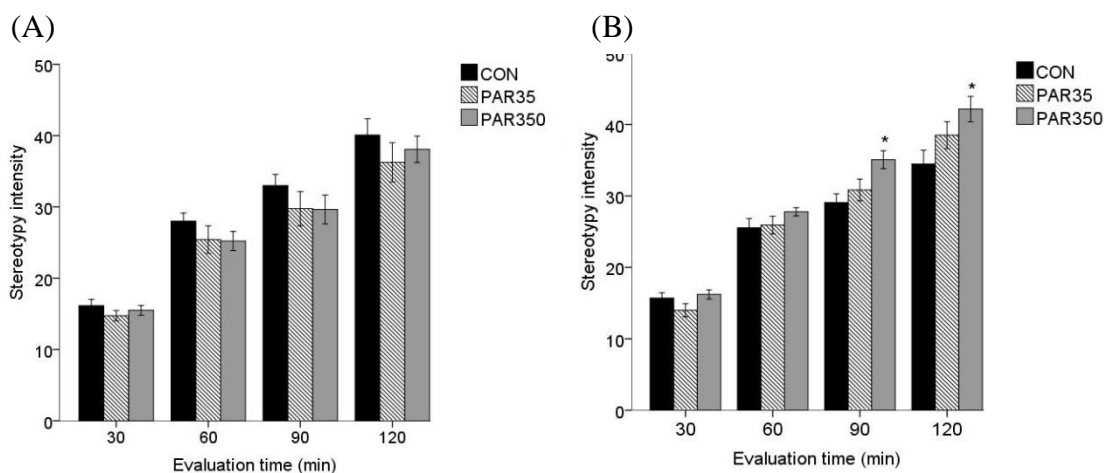


Figure 2. Assessment of apomorphine-induced stereotyped behaviour in 27-day-old female (A) and male (B) rats exposed or not to PAR (35 or 350 mg/kg) during gestation and

lactation. Data are means \pm SEM of 12-14 animals in each group. * $p < .05$ ANOVA complemented with Bonferroni. CON: animals exposed to water; PAR35: animals exposed to 35 mg/kg; PAR350: animals exposed to 350 mg/kg.

3.1.3 Three-chamber sociability test

Data from the three-chamber sociability test are presented in Table 1. Animals (1 female and 2 males) from PAR350 and 1 CON male remained immobile in the central area during the whole session and were excluded from the statistical analysis. Two-way ANOVA indicated a PAR exposure effect on number of transitions across chambers [$F_{(2;50)} = 3.339$; $p = 0.044$, partial $\eta^2 = 0.118$] and Bonferroni post-hoc test indicated that PAR350 pups transited less than CON ones. Marginal significances were indicated by two-way ANOVA for time spent in the novel object area [$F_{(2;49)} = 2.470$; $p = 0.095$, partial $\eta^2 = 0.092$] and sociability index [$F_{(2; 48)} = 2.890$, $p = 0.065$, partial $\eta^2 = 0.107$]. Time spent in the social area [$F_{(2; 50)} = 0.307$, $p = 0.737$, partial $\eta^2 = 0.012$], central area [$F_{(2; 50)} = 0.055$, $p = 0.946$, partial $\eta^2 = 0.02$] and in sniffing [$F_{(2; 50)} = 1.497$, $p = 0.234$, partial $\eta^2 = 0.057$] did not reach any significance (Table 01).

3.1.4 Open Field (locomotion and emotionality)

Data from open-field evaluation are presented in Table 1. Two-way ANOVA indicated a significant interaction between sex and maternal exposure on the number of peripheral ambulation [$F_{(2; 65)} = 4.703$, $p = 0.012$, partial $\eta^2 = 0.126$]. One-way ANOVA complemented with Bonferroni indicated that PAR35 males ambulated more than CON males [$F_{(2; 35)} = 6.488$, $p = 0.004$, partial $\eta^2 = 0.282$]. No difference in peripheral ambulation was observed among females [$F_{(2; 35)} = 0.834$, $p = 0.443$, partial $\eta^2 = 0.050$]. Significant sex effect was observed in number of total ambulation [$F_{(1; 66)} = 9.598$, $p = 0.003$, partial $\eta^2 = 0.127$] and rearing [$F_{(1;64)} = 5.012$, $p = 0.029$, partial $\eta^2 = 0.073$]. As expected, females displayed higher horizontal and vertical motor activity than males. The measures of emotionality, i.e., time spent in the central area [$F_{(2; 62)} = 0.126$, $p = 0.882$, partial $\eta^2 = 0.004$], rostral grooming [$H_{(5; 72)} = 4.899$, $p = 0.428$, partial $\eta^2 = 0.070$] and body grooming [$H_{(5; 72)} = 7.378$, $p = 0.194$, partial $\eta^2 = 0.100$] were similar among groups.

3.2 Brain oxidative stress analysis

Oxidative stress data are presented in Table 2. Two-way ANOVA indicated an interaction between sex and PAR exposure in the hippocampal GSH levels [$F_{(2;63)} = 3.841$, $p =$

0.027, partial $\eta^2=0.109$] as well as in the striatal SOD activity [$F_{(2;61)}= 3.454$, $p= 0.038$, partial $\eta^2=0.102$]. One-way ANOVAs complemented with Bonferroni for each sex in separate indicated reduced striatal SOD activity in PAR35 males compared to CON males [$F_{(2;31)}= 5.312$, $p= 0.011$, partial $\eta^2=0.268$] and reduced hippocampal GSH levels compared to CON and PAR350 males [$F_{(2;33)}= 4.409$, $p= 0.021$, partial $\eta^2=0.221$]. No difference was observed in females [SOD: $F_{(2;35)}= 1.480$, $p= 0.243$, partial $\eta^2=0.085$; GSH: $F_{(2;35)}= 0.935$, $p= 0.403$, partial $\eta^2=0.055$].

There was a marginal significance towards an exposure effect in cortical GSH levels [$F_{(2;63)}= 2.515$, $p= 0.089$, partial $\eta^2=0.074$] and as can be observed in Table 2, PAR35 animals presented decreased cortical GSH levels compared to CON and PAR350 animals. The other endpoints did not reach statistical significance.

Table 1. Behavioural evaluation of rats exposed or not to PAR (35 or 350 mg/kg) during pregnancy and lactation.

	CON		PAR35		PAR350	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Open Field	n=10	n=13	n=11	n=11	n=13	n=12
Peripheral ambulation (count)	48.18 ± 3.74	25.83 ± 2.17	42.18 ± 4.34	40.50 ± 3.60^a	42.00 ± 3.37	32.67 ± 2.69
Total ambulation (count)	76.10 ± 5.71^b	52.23 ± 5.30	69.64 ± 6.04^b	63.17 ± 4.97	71.46 ± 5.28^b	60.08 ± 5.65
Rearing (n)	32.10 ± 2.36^b	22.61 ± 3.02	27.09 ± 3.60^b	21.00 ± 2.23	32.69 ± 3.78^b	29.25 ± 4.59
Central area time (s)	63.06 ± 7.32	57.57 ± 8.78	62.77 ± 11.55	49.22 ± 8.60	51.13 ± 5.64	66.98 ± 10.08
Rostral grooming (s)	9.04 ± 1.63	15.29 ± 3.09	10.27 ± 2.11	9.24 ± 2.47	12.15 ± 3.59	8.85 ± 2.02
Body grooming (s)	0.70 ± 0.35	1.11 ± 0.30	2.84 ± 1.50	0.69 ± 0.46	0.71 ± 0.40	2.21 ± 2.02
Three-chamber test	n=12	n= 12	n= 9	n= 9	n= 8	n= 6
Sniffing time (s)	163.82 ± 10.65	141.63 ± 15.94	182.37 ± 18.02	165.19 ± 29.48	164.28 ± 21.04	109.40 ± 28.27
Transition across chambers (count)	35.17 ± 3.49	32.08 ± 2.66	26.11 ± 3.81	28.00 ± 4.81	23.50 ± 1.77^c	26.83 ± 3.49^c
Social area (s)	342.19 ± 19.39	339.55 ± 29.42	343.81 ± 29.91	352.93 ± 35.35	364.96 ± 37.68	365.07 ± 24.27
Novel object area (s)	97.86 ± 11.91	81.47 ± 12.62	69.78 ± 11.92	81.05 ± 17.65	35.11 ± 6.53	83.35 ± 12.28
Central area (s)	159.94 ± 11.95	178.98 ± 31.13	186.41 ± 27.34	136.48 ± 23.59	187.67 ± 41.60	151.58 ± 16.89
Sociability index	0.55 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.63 ± 0.07	0.82 ± 0.03	0.62 ± 0.06

Data are means ± SEM.

^a p < .05 compared to CON males (two-way ANOVA indicated interaction effect and was complemented with one-way ANOVA and Bonferroni).

^b p < .05 compared to males (two-way ANOVA, sex effect).

^c p < .05 compared to CON males and females (two-way ANOVA, exposure effect, complemented with Bonferroni).

CON: animals exposed to water; PAR35: animals exposed to 35 mg/kg; PAR350: animals exposed to 350 mg/kg.

Table 2. Evaluation of AOPP, GSH, LOOH concentrations and SOD activity in PFC, HPC, ST and CB of rats exposed or not to PAR (35 or 350 mg/kg) during pregnancy and lactation.

	CON		PAR35		PAR350	
	Female n= 12	Male n= 11	Female n= 10	Male n= 10	Female n= 12	Male n= 12
PFC						
AOPP (nmol/mg protein)	10.97 ± 0.92	10.44 ± 1.21	12.69 ± 1.38	10.82 ± 1.32	12.25 ± 0.96	11.53 ± 1.27
GSH (nmol/mg protein)	51.19±4.4	47.1 ± 4.3	41.83 ± 3.2	38.5 ± 5.1	48.18 ± 3.7	41.89 ± 2.0
LOOH x10 ³ (RLU/mg protein)	37.59±1.74	35.24 ± 2.82	39.27 ± 3.20	35.02 ± 3.21	36.04 ± 2.28	36.48 ± 3.28
SOD (USOD/min/mg prot)	10.71±2.48	9.68 ± 3.0	8.11 ± 3.24	6.44 ± 1.55	7.70 ± 2.17	9.14 ± 1.76
HPC						
AOPP (nmol/mg protein)	11.44 ± 1.24	11.92 ± 1.48	11.78 ± 0.84	11.24 ± 1.72	11.57 ± 0.93	11.29 ± 1.14
GSH (nmol/mg protein)	39.06 ± 3.43	52.08 ± 7.27	46.81 ± 5.39	32.66 ± 3.43^a	40.50 ± 3.46	51.22 ± 3.83
LOOH x10 ³ (RLU/mg protein)	34.44 ± 2.87	34.88 ± 3.36	37.56 ± 2.26	31.46 ± 3.30	34.78 ± 2.49	39.49 ± 0.18
SOD (USOD/min/mg prot)	9.69 ± 2.67	12.66 ± 3.12	6.75 ± 1.78	5.14 ± 0.85	9.57 ± 1.98	5.50 ± 1.30
ST						
AOPP (nmol/mg protein)	14.41 ± 2.04	13.91 ± 1.14	13.18 ± 1.62	12.55±1.66	17.72±1.44	12.90±1.54
GSH (nmol/mg protein)	48.06 ± 5.65	53.43 ± 4.23	45.57 ± 4.36	48.65±7.19	52.97±4.18	51.27±8.32
LOOH x10 ³ (RLU/mg protein)	29.38± 2.14	30.88 ± 1.89	34.36 ± 2.73	34.34±1.59	34.63±2.08	27.80±2.80
SOD (USOD/min/mg prot)	7.90 ± 1.82	11.72 ± 2.28	9.17 ± 3.16	3.60±1.37^b	14.77±3.73	5.97±1.52
CB						
AOPP (nmol/mg protein)	11.60± 1.11	12.71±0.83	13.27 ± 1.13	12.64 ± 0.89	12.45 ± 1.17	12.80 ± 1.53
GSH (nmol/mg protein)	59.18 ± 5.34	59.18 ± 4.07	61.00 ± 5.06	60.89 ± 5.66	58.66 ± 4.43	68.49 ± 7.33
LOOH x10 ³ (RLU/mg protein)	25.57± 1.82	26.43± 1.52	31.53 ± 2.41	27.81 ± 1.37	27.16 ± 2.63	24.90 ± 1.54
SOD (USOD/min/mg prot)	8.76 ± 1.88	8.47 ± 2.07	8.28 ± 1.38	8.15 ± 2.11	5.56 ± 0.88	10.43 ± 2.84

Data are means ± SEM

^a p < .05 compared to CON and PAR350 males (two-way ANOVA indicated interaction effect and was complemented with one-way ANOVA and Bonferroni).

^b p < .05 compared to CON males (two-way ANOVA indicated interaction effect and was complemented with one-way ANOVA and Bonferroni).

PFC: prefrontal cortex; HPC: hippocampus; ST: striatum; CB: cerebellum; CON: animals exposed to water; PAR35: animals exposed to 35 mg/kg; PAR350: animals exposed to 350 mg/kg.

4 DISCUSSION

Gestational and lactational exposure to PAR induced some behavioural alterations and oxidative imbalance in infant rats in a dose- and sex-dependent manner.

The higher dose of PAR resulted in an intensified response of male pups to the dopaminergic agonist apomorphine, as demonstrated by the increased stereotype intensity observed in these animals. A similar result had already been reported by our laboratory when animals were exposed to 350 mg/kg only during gestation [30]. Apomorphine-induced stereotyped behaviour occurs through activation of the dopaminergic mesolimbic and nigrostriatal pathways [59-61]. Increased dopamine and its metabolite DOPAC in the striatum have been reported in 60-day-old male rats exposed and treated with PAR (5 and 15 mg/kg, drinking water) from pregnancy until behavioural analysis [62]. Even though it is a pretty different protocol of exposure, this neurochemical data on the top of our behavioural data reinforce that the dopaminergic system may be susceptible to PAR exposure during neurodevelopment and that modifications of this circuitry may be present in the brain of the progeny. Noteworthy is that alterations in dopaminergic pathways are implicated in the pathophysiology of ADHD [38,63] and ASD [64,65] which have been associated with maternal PAR exposure in epidemiological studies. Moreover, male sex is a risk factor for both disorders [66-68]. The manner by which PAR exposure could impact the development and/or functionality of the brain and specifically of the dopaminergic system is unknown but Bohler et al [69] may have shed some light to this topic. These authors described molecular similarities between dopamine and PAR that would allow this drug to be transported by the dopamine transporter located in the presynaptic neurons as dopamine is. The consequence of this would be an impact on dopamine availability during critical periods of brain development as well an easy transport of PAR into dopaminergic neurons, where it can be metabolized by local CYPs and generate the reactive metabolite NAPQI, which, if not detoxified, may induce cytotoxicity.

Another behaviour known to be facilitated by dopaminergic transmission is ambulation in the open-field test. In the present study, PAR35 males ambulated more compared to CON animals and this was the only exposure-related effect observed in the open-field, but we did obtain some sex-related effects. As traditionally reported [70-72], females were more active than males, as demonstrated by the higher counts of ambulation and rearing.

In the three-chamber sociability test, which evaluates exploratory and social behaviour, PAR exposure impacted only parameters related to exploration. Both males and females from the PAR350-exposed group displayed impaired exploratory behaviour, as

indicated by the reduced transitions across chambers [73, 74]. Effects in social behaviour of 60-day-old rats exposed to PAR (5 and 15 mg/kg, oral) during pregnancy were described in a recent study [75] but both exposure regimen as well as context of the behavioural evaluation (1x1m area, 0.3 m height; 24h habituation before testing; 5 min of evaluation) were different from ours.

Regarding oxidative stress markers in different brain regions, only males from the lower exposure group, i.e., P35 have been impacted. These animals presented decreased hippocampal GSH content as well as decreased SOD activity. Moreover, there was also a marginal effect towards reduced GSH in the prefrontal cortex. Reduced GSH content is expected following exposure to PAR because this molecule is consumed during the detoxification process of the metabolite NAPQI. Similarly, reduced SOD activity may be a consequence of this oxidative stress activation that may be consuming the antioxidants. The non-monotonic relationship observed, i.e., the apparent normal levels of the antioxidants observed in the pups exposed to the higher dose of PAR may be a consequence of an adaptive response, in which at a certain level, oxidative stress may activate gene transcription of antioxidant molecules [76] leading to stress resistance. However, since we did not evaluate the key players involved in this adaptive response (such as Nrf2, MAPK, etc), this is a speculative hypothesis that warrants future studies.

Seven out of behavioural and neurochemical outcomes evaluated in the present work showed a statistically significant effect. The effect size calculated here by the partial η^2 would classify the effects obtained as medium (transitions across chambers, total ambulation and rearing) and large (apomorphine-induced stereotypy (90 and 120 min), peripheral ambulation, hippocampal GSH and striatal SOD) [77]. Considering the frequent use of PAR during pregnancy and lactation, the easy access of this over-the-counter drug, as well as, the potential neurodevelopmental toxicity of PAR suggested in epidemiological and experimental studies; our findings are relevant.

5 CONCLUSION

In conclusion, our study describes behavioural and brain oxidative stress parameters altered in infant rats after gestational and lactational exposure to human-relevant doses of PAR. Male pups are more susceptible than female pups. Moreover, the dopaminergic system, the hippocampus and the striatum seem to be targets of PAR-induced developmental neurotoxicity. Interestingly, behavioural outcomes were more common after exposure to the higher dose of PAR whereas oxidative-stress imbalance occurred after exposure to the lower

dose, possibly reflecting adaptative mechanisms in the antioxidant status that may have occurred at higher doses.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

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

REFERENCES

- [1] G. Bandoli, K. Palmsten, C. Chambers, Acetaminophen use in pregnancy: examining prevalence, timing, and indication of use in a prospective birth cohort, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 34 (2020) 237–246. <https://doi.org/10.1111/ppe.12595>.
- [2] S.K. Aagaard, A. Larsen, M.F. Andreasen, I. Lesnikova, R. Telving, A.L. Vestergaard, N. Tørring, N. Ulbjerg, P. Bor, Prevalence of xenobiotic substances in first-trimester blood samples from Danish pregnant women: a cross-sectional study, *BMJ Open.* 8 (2018) e018390. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-018390>.
- [3] S.L. Ray-Griffith, B. Morrison, Z.N. Stowe, Chronic pain prevalence and exposures during pregnancy, *Pain Res. Manag.* (2019) 6985164. <https://doi.org/10.1155/2019/6985164>.
- [4] A. Lupattelli, O. Spigset, M.J. Twigg, K. Zagorodnikova, A.C. Márdby, M.E. Moretti, M. Drozd, A. Panchaud, K. Hämeen-Anttila, A. Rieutord, R.G. Juraski, M. Odalovic, D. Kennedy, G. Rudolf, H. Juch, A. Passier, I. Björnsdóttir, H. Nordeng, Medication use in pregnancy: a cross-sectional, multinational web-based study, *BMJ Open.* 4 (2014) e004365. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-004365>.
- [5] J.N. Trønnes, M. Wood, A. Lupattelli, E. Ystrom, H. Nordeng, Prenatal paracetamol exposure and neurodevelopmental outcomes in preschool-aged children, *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 34 (2020) 247–256. <https://doi.org/10.1111/ppe.12568>.
- [6] L. Bremer, J. Goletzke, C. Wiessner, M. Pagenkemper, C. Gehbauer, H. Becher, E. Tolosa, K. Hecher, P.C. Arck, A. Diemert, G. Tiegs, Paracetamol medication during pregnancy: insights on intake frequencies, dosages and effects on hematopoietic stem cell populations in cord blood from a longitudinal prospective pregnancy cohort,

- EBioMedicine. 26 (2017) 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.023>.
- [7] N.N. Andescavage, A. du Plessis, R. McCarter, A. Serag, I. Evangelou, G. Vezina, R. Robertson, C. Limperopoulos, Complex trajectories of brain development in the healthy human fetus, *Cereb. Cortex*. 27 (2017) 5274–5283. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw306>.
- [8] S. Conings, F. Tseke, A. Van den Broeck, B. Qi, J. Paulus, F. Amant, P. Annaert, K. van Calsteren, Transplacental transport of paracetamol and its phase II metabolites using the ex vivo placenta perfusion model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 370 (2019) 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.03.004>.
- [9] N.R. Saunders, K.M. Dziegielewska, K. Møllgard, M.D. Habgood, Recent developments in understanding barrier mechanisms in the developing brain: drugs and drug transporters in pregnancy, susceptibility or protection in the fetal brain?, *Annu. Rev. Pharmacology Toxicol.* 59 (2019) 487–505. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021430>.
- [10] L.J. Notarianni, H.G. Oldham, P.N. Bennett, Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 24 (1987) 63–67. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1987.tb03137.x>.
- [11] S.S. Bittker, K.R. Bell, Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: an epidemiological study, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 14 (2018) 1399–1414. <https://doi.org/10.2147/NDT.S158811>.
- [12] S.T. Schultz, G.G. Gould, Acetaminophen use for fever in children associated with autism spectrum disorder, *Autism Open Access*. 6 (2016) 1000170. <https://doi.org/10.4172/2165-7890.1000170>.
- [13] E. Ystrom, K. Gustavson, R.E. Brandlistuen, G.P. Knudsen, P. Magnus, E. Susser, G. Davey Smith, C. Stoltenberg, P. Surén, S.E. Håberg, M. Hornig, W.I. Lipkin, H. Nordeng, T. Reichborn-Kjennerud, Prenatal exposure to acetaminophen and risk of ADHD, *Pediatrics*. 140 (2017) e20163840. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-3840>.
- [14] R. Masarwa, H. Levine, E. Gorelik, S. Reif, A. Perlman, I. Matok, Prenatal exposure to acetaminophen and risk for attention deficit hyperactivity disorder and autistic spectrum disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis of cohort studies, *Am. J. Epidemiol.* 187 (2018) 1817–1827. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy086>.
- [15] C.B. Avella-Garcia, J. Julvez, J. Fortuny, C. Rebordosa, R. García-Esteban, I. Riaño Galán, A. Tardón, C.L. Rodríguez-Bernal, C. Iñiguez, A. Andiarena, L. Santa-Marina,

- J. Sunyer, Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms, *Int. J. Epidemiol.* 45 (2016) 1987–1996.
<https://doi.org/10.1093/ije/dyw115>.
- [16] J.M.D. Thompson, K.E. Waldie, C.R. Wall, R. Murphy, E.A. Mitchell, ABC group, Associations between acetaminophen use during pregnancy and ADHD symptoms measured at ages 7 and 11 years, *PLoS One.* 9 (2014) e108210.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108210>.
- [17] Z. Liew, B. Ritz, C. Rebordosa, P.C. Lee, J. Olsen, Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders, *JAMA Pediatr.* 168 (2014) 313–320. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.4914>.
- [18] Z. Liew, C.C. Bach, R.F. Asarnow, B. Ritz, J. Olsen, Paracetamol use during pregnancy and attention and executive function in offspring at age 5 years, *Int. J. Epidemiol.* 45 (2016) 2009–2017. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw296>.
- [19] C.G. Bornehag, A. Reichenberg, M. Unenge Hallerback, S. Wikstrom, H.M. Koch, B.A. Jonsson, S.H. Swan, Prenatal exposure to acetaminophen and children’s language development at 30 months, *Eur. Psychiatry.* 51 (2018) 98–103.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2017.10.007>.
- [20] R. Vlenterie, M.E. Wood, R.E. Brandlistuen, N. Roeleveld, M.M.H.J. Van Gelder, H. Nordeng, Neurodevelopmental problems at 18 months among children exposed to paracetamol in utero: a propensity score matched cohort study, *Int. J. Epidemiol.* 45 (2016) 1998–2008. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw192>.
- [21] R.E. Brandlistuen, E. Ystrom, I. Nulman, G. Koren, H. Nordeng, Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: a sibling-controlled cohort study, *Int. J. Epidemiol.* 42 (2013) 1702–1713. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt183>.
- [22] R. Vlenterie, M.E. Wood, R.E. Brandlistuen, N. Roeleveld, M.M.H.J. van Gelder, H. Nordeng, Neurodevelopmental problems at 18 months among children exposed to paracetamol in utero: a propensity score matched cohort study, *Int. J. Epidemiol.* 45 (2016) 1998–2008. <https://doi.org/10.1093/ije/dyw192>.
- [23] K. Blecharz-Klin, A. Wawer, K. Jawna-Zboi, J. Pyrzanowska, A. Piechal, D. Mirowska-Guzel, E. Widy-Tyszkiewicz, Early paracetamol exposure decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in striatum and affects social behaviour and exploration in rats, *Pharmacol., Biochem. Behav.* 168 (2018) 25–32.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.03.004>.
- [24] K. Blecharz-Klin, A. Wawer, J. Pyrzanowska, A. Piechal, K. Jawna-Zboińska, E.

- Widy-Tyszkiewicz, Hypothalamus – response to early paracetamol exposure in male rats off spring, *Int. J. Dev. Neurosci.* 76 (2019) 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2019.05.004>.
- [25] K. Blecharz-Klin, I. Joniec-Maciejak, K. Jawna-Zboińska, J. Pyrzanowska, A. Piechal, A. Wawer, E. Widy-Tyszkiewicz, Cerebellar level of neurotransmitters in rats exposed to paracetamol during development, *Pharmacol. Reports.* 68 (2016) 1159–1164.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.06.005>.
- [26] K. Blecharz-Klin, I. Joniec-Maciejak, K. Jawna, J. Pyrzanowska, A. Piechal, A. Wawer, E. Widy-Tyszkiewicz, Developmental exposure to paracetamol causes biochemical alterations in medulla oblongata, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40 (2015) 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.001>.
- [27] K. Blecharz-Klin, I. Joniec-Maciejak, K. Jawna, J. Pyrzanowska, A. Piechal, A. Wawer, E. Widy-Tyszkiewicz, Effect of prenatal and early life paracetamol exposure on the level of neurotransmitters in rats- focus on the spinal cord, *Int. J. Dev. Neurosci.* 101 (2015) 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.09.002>.
- [28] G. Philippot, T. Gordh, A. Fredriksson, H. Viberg, Adult neurobehavioral alterations in male and female mice following developmental exposure to paracetamol (acetaminophen): characterization of a critical period, *J. Appl. Toxicol.* 37 (2017) 1174–1181. <https://doi.org/10.1002/jat.3473>.
- [29] H. Viberg, P. Eriksson, T. Gordh, A. Fredriksson, Paracetamol (acetaminophen) administration during neonatal brain development affects cognitive function and alters its analgesic and anxiolytic response in adult male mice, *Toxicol. Sci.* 138 (2014) 139–147. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft329>.
- [30] R.M. Klein, C. Rigobello, C.B. Vidigal, K.F. Moura, D.S. Barbosa, D.C.C. Gerardin, G.S. Ceravolo, E.G. Moreira, Gestational exposure to paracetamol in rats induces neurofunctional alterations in the progeny, *Neurotoxicol. Teratol.* 77 (2020) 106838. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2019.106838>.
- [31] K. Brune, B. Renner, G. Tiegs, Acetaminophen/paracetamol: a history of errors, failures and false decisions, *Eur. J. Pain.* 19 (2015) 953–965.
<https://doi.org/10.1002/ejp.621>.
- [32] C.I. Ghanem, M.J. Pérez, J.E. Manautou, A.D. Mottino, Acetaminophen from liver to brain: new insights into drug pharmacological action and toxicity, *Pharmacol. Res.* 109 (2016) 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.02.020>.
- [33] S.C. Upadhyaya, P.S. Tirumalai, M.R. Boyd, T. Mori, V. Ravindranath, Cytochrome

- P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization, *Arch. Biochem. Biophysics*. 373 (2000) 23–34.
- [34] L.A. Howard, S. Miksys, E. Hoffmann, D. Mash, R.F. Tyndale, Brain CYP2E1 is induced by nicotine and ethanol in rat and is higher in smokers and alcoholics, *Br. J. Pharmacol.* 138 (2003) 1376–1386. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705146>.
- [35] S. Kim, Acetaminophen associated neurotoxicity and its relevance to neurodevelopmental disorders, University of South Florida, 2017. <https://doi.org/https://scholarcommons.usf.edu/etd/6717/>.
- [36] A.Z. Bauer, D. Kriebel, M.R. Herbert, C. Bornehag, S.H. Swan, Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: a review, *Horm. Behav.* 101 (2018) 125–147. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.01.003>.
- [37] W. Parker, C.D. Hornik, S. Bilbo, Z.E. Holzknecht, L. Gentry, R. Rao, S.S. Lin, M.R. Herbert, C.D. Nevison, The role of oxidative stress, inflammation and acetaminophen exposure from birth to early childhood in the induction of autism, *J. Int. Med. Res.* 45 (2017) 407–438. <https://doi.org/10.1177/0300060517693423>.
- [38] A. Sharma, J. Couture, A Review of the pathophysiology, etiology, and treatment of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), *Ann. Pharmacother.* 48 (2014) 209–225. <https://doi.org/10.1177/1060028013510699>.
- [39] C.A. Pardo, C.G. Eberhart, The neurobiology of autism, *Brain Pathol.* 17 (2007) 434–447. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00102.x>.
- [40] A.P.A. Donovan, M.A. Basson, The neuroanatomy of autism – a developmental perspective, *J. Anat.* 230 (2017) 4–15. <https://doi.org/10.1111/joa.12542>.
- [41] OECD/OCDE, Test n° 426 - Developmental neurotoxicity study, (2007) 1–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264067394-en>.
- [42] EPA, Harmonization in interspecies extrapolation: use of BW 3/4 as default method in derivation of the oral RfD, 2006. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/harmonizationinterspecies.pdf>.
- [43] E. Nielsen, G. Ostergaard, J.C. Larsen, Toxicological risk assessment of chemicals: a practical guide, Informa Healthcare USA, 2008. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- [44] T. Schneider, R. Przewłocki, Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism, *Neuropsychopharmacology*. 30 (2005) 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518>.

- [45] E.H. Gregory, D.W. Pfaff, Development of olfactory-guided behavior in infant rats, *Physiol. Behav.* 6 (1971) 573–576.
- [46] P. Setler, H. Sarau, G. McKenzie, Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine, *Eur. J. Pharmacol.* 39 (1976) 117–126. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(76\)90119-9](https://doi.org/10.1016/0014-2999(76)90119-9)
- [47] V. Bambini-Junior, L. Rodrigues, G.A. Behr, J.C.F. Moreira, R. Riesgo, C. Gottfried, Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: behavioral changes and liver parameters, *Brain Res.* 1408 (2011) 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.015>.
- [48] J.J. Nadler, S.S. Moy, G. Dold, D. Trang, N. Simmons, A. Perez, N.B. Young, R.P. Barbaro, J. Piven, T.R. Magnuson, J.N. Crawley, Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice, *Genes, Brain Behav.* 3 (2004) 303–314. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00071.x>.
- [49] V. Bambini-Junior, G. Zanatta, G. Della Flora Nunes, G. Mueller de Melo, M. Michels, M. Fontes-Dutra, V. Nogueira Freire, R. Riesgo, C. Gottfried, Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid, *Neurosci. Lett.* 583 (2014) 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.09.039>.
- [50] C. Estanislau, S. Díaz-Morán, T. Cañete, G. Blázquez, A. Tobeña, A. Fernández-Teruel, Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats, *Neurosci. Res.* 77 (2013) 187–201. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2013.09.012>.
- [51] M. Hanasand, R. Omdal, K.B. Norheim, L.G. Gøransson, C. Brede, G. Jonsson, Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma, *Clin. Chim. Acta.* 413 (2012) 901–906. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.038>.
- [52] F. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502–522. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5).
- [53] M.E. Anderson, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples, *Methods Enzymol.* 113 (1985) 548–555. doi: 10.1016/s0076-6879(85)13073-9.
- [54] B. Gonzalez Flecha, S. Llesuy, A. Boveris, Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: An assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 10 (1991) 93–100. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90002-K](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90002-K).

- [55] S. Marklund, G. Marklund, Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.* 47 (1974) 469–474. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>.
- [56] O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A. Lewis Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [57] G.L. Miller, Protein determination for large numbers of samples, *Anal. Chem.* 31 (1959) 964–964. <https://doi.org/10.1021/ac60149a611>.
- [58] A. Myasaki, C. Rigobello, R.M. Klein, J. Crespigio, K. Flaiban, A.P. Bracarense, B. Mazzucatto, D.S. Barbosa, E.G. Moreira, Hepatic and renal evaluation in rat dams and in their offspring after exposure to paracetamol during gestation and lactation, *Reprod. Fertil. Dev.* accepted (2020).
- [59] A. Korchounov, M.F. Meyer, M. Krasnianski, Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation, *J. Neural Transm.* 117 (2010) 1359–1369. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0454-z>.
- [60] R. Bourdy, M.J. Sánchez-Catalán, J. Kaufling, J.J. Balcita-Pedicino, M.J. Freund-Mercier, P. Veinante, S.R. Sesack, F. Georges, M. Barrot, Control of the nigrostriatal dopamine neuron activity and motor function by the tail of the ventral tegmental area, *Neuropsychopharmacology.* 39 (2014) 2788–2798. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.129>.
- [61] A. Ledonne, N.B. Mercuri, Current concepts on the physiopathological relevance of dopaminergic receptors, *Front. Cell. Neurosci.* 11 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00027>.
- [62] K. Blecharz-Klin, A. Piechal, K. Jawna-Zboińska, J. Pyrzanowska, A. Wawer, I. Joniec-Maciejak, E. Widy-Tyszkiewicz, Paracetamol –effect of early exposure on neurotransmission, spatial memory and motor performance in rats, *Behav. Brain Res.* 323 (2017) 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.051>.
- [63] G. Tripp, J.R. Wickens, Neurobiology of ADHD, *Neuropharmacology.* 57 (2009) 579–589. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.07.026>.
- [64] M. de Krom, W.G. Staal, R.A. Ophoff, J. Hendriks, J. Buitelaar, B. Franke, M.V. de Jonge, P. Bolton, D. Collier, S. Curran, H. van Engeland, J.M. van Ree, A common variant in DRD3 receptor is associated with autism spectrum disorder, *Biol. Psychiatry.* 65 (2009) 625–630. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.09.035>.
- [65] W.G. Staal, Autism, DRD3 and repetitive and stereotyped behavior, an overview of the current knowledge, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25 (2015) 1421–1426.

- <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.08.011>.
- [66] D.L. Christensen, K.V.N. Braun, J. Baio, D. Bilder, J. Charles, J.N. Constantino, J. Daniels, M.S. Durkin, R.T. Fitzgerald, M. Kurzius-Spencer, L.-C. Lee, S. Pettygrove, C. Robinson, E. Schulz, C. Wells, M.S. Wingate, W. Zahorodny, M. Yeargin-Allsopp, Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012, *MMWR. Surveill. Summ.* 65 (2018) 1–23.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.ss6513a1>.
- [67] A.J. Baxter, T.S. Brugha, H.E. Erskine, R.W. Scheurer, T. Vos, J.G. Scott, The epidemiology and global burden of autism spectrum disorders, *Psychol. Med.* 45 (2015) 601–613. <https://doi.org/10.1017/S003329171400172X>.
- [68] S.E. Holden, S. Jenkins-Jones, C.D. Poole, C.L. Morgan, D. Coghill, C.J. Currie, The prevalence and incidence, resource use and financial costs of treating people with attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in the united kingdom (1998 to 2010), *Child Adolesc. Psychiatry Ment. Health.* 7 (2013) 1–13. <https://doi.org/10.1186/1753-2000-7-34>.
- [69] S. Bohler, X. Liu, J. Krauskopf, F. Caiment, J. Aubrecht, G.A.F. Nicolaes, J.C.S. Kleinjans, J.J. Briedé, Acetaminophen overdose as a potential risk factor for Parkinson’s disease, *Clin. Transl. Sci.* 12 (2019) 609–616.
<https://doi.org/10.1111/cts.12663>.
- [70] J.L. Scholl, A. Afzal, L.C. Fox, M.J. Watt, G.L. Forster, Sex differences in anxiety-like behaviors in rats, *Physiol. Behav.* 211 (2019) 112670.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112670>.
- [71] J. Alstott, W. Timberlake, Effects of rat sex differences and lighting on locomotor exploration of a circular open field with free-standing central corners and without peripheral walls, *Behav. Brain Res.* 196 (2009) 214–219.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.001>.
- [72] M.F. Souza, N.S. Couto-Pereira, L. Freese, P.A. Costa, G. Caletti, K.M. Bisognin, M.S. Nin, R. Gomez, H.M.T. Barros, Behavioral effects of endogenous or exogenous estradiol and progesterone on cocaine sensitization in female rats, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47 (2014) 505–514. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143627>.
- [73] M. Yang, J.L. Silverman, J.N. Crawley, Automated three-chambered social approach task for mice, *Curr. Protoc. Neurosci.* 56 (2011).
<https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0826s56>.

- [74] S. Netser, S. Haskal, H. Magalnik, S. Wagner, A novel system for tracking social preference dynamics in mice reveals sex- and strain-specific characteristics, *Mol. Autism*. 8 (2017) 53. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0169-1>.
- [75] K. Blecharz-Klin, A. Wawer, K. Jawna-Zbońska, J. Pyrzanowska, A. Piechal, D. Mirowska-Guzel, E. Widy-Tyszkiewicz, Early paracetamol exposure decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in striatum and affects social behaviour and exploration in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 168 (2018) 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.03.004>.
- [76] L.J. Robays, G.F. Joos, K.Y. Vermaelen, Between a cough and a wheeze: dendritic cells at the nexus of tobacco smoke-induced allergic airway sensitization, *Mucosal Immunol.* 2 (2009) 206-219. <https://doi.org/10.1038/mi.2009.7>.
- [77] J. Cohen, *Statistical power analysis for the behavioral sciences*, Academic Press USA (1988). <https://doi.org/10.4324/9780203771587>.

Supplementary Table 1. Statistical values from the behavioral evaluation of rats exposed or not to PAR during gestation and lactation.

Behavioral test	Parameter	Factors	F/H	df	P	partial η^2
Nest seeking test	Latency to nest bedding (s)	--	1.959	5/78	0.855	0.030
	Locomotion (s)	Exposure	0.678	2/69	0.511	0.019
		Sex	1.898	1/69	0.173	0.027
Interaction		0.679	2/69	0.511	0.019	
Open Field	Peripheral ambulation (n)	Exposure	1.013	2/65	0.369	0.030
		Sex	16.403	1/65	0.000	0.202
		Interaction	4.703	2/65	0.012	0.126
	Total ambulation (n)	Exposure	0.087	2/66	0.917	0.003
		Sex	9.598	1/66	0.003	0.127
		Interaction	1.313	2/66	0.276	0.038
	Rearing (n)	Exposure	2.025	2/64	0.140	0.060
		Sex	5.012	1/64	0.029	0.073
		Interaction	0.390	2/64	0.679	0.012
	Central area time (s)	Exposure	0.126	2/62	0.882	0.004
		Sex	0.022	1/62	0.883	0.000
		Interaction	1.491	2/62	0.233	0.046
	Rostral grooming (s)	--	4.899	5/72	0.428	0.070
	Body grooming (s)	--	7.378	5/72	0.194	0.100
	Three-chamber test	Sniffing time (s)	Exposure	1.497	2/50	0.234
Sex			3.562	1/50	0.065	0.066
Interaction			0.437	2/50	0.648	0.017
Central entries (n)		Exposure	3.242	2/50	0.047	0.115
		Sex	0.063	1/50	0.802	0.001
		Interaction	0.501	2/50	0.609	0.020
Transitions across chambers (n)		Exposure	3.339	2/50	0.044	0.118
		Sex	0.058	1/50	0.811	0.001
		Interaction	0.480	2/50	0.622	0.019
Social area (s)		Exposure	0.307	2/50	0.737	0.012
		Sex	0.008	1/50	0.931	0.000
		Interaction	0.022	2/50	0.978	0.001

	Novel object area (s)	Exposure	2.470	2/49	0.095	0.092
		Sex	1.657	1/49	0.204	0.033
		Interaction	2.753	2/49	0.074	0.101
	Central area (s)	Exposure	0.055	2/49	0.946	0.002
		Sex	0.939	1/49	0.337	0.019
		Interaction	0.990	2/49	0.379	0.039
	Sociability index	Exposure	2.890	2/48	0.065	0.107
		Sex	1.996	1/48	0.164	0.040
		Interaction	2.319	2/48	0.109	0.088
Apomorphine-induced stereotypy	Stereotypy intensity (score)	Time	542.15	3/216	0.000	0.883
		Time*sex	0.267	3/216	0.849	0.004
		Time*exposure	1.092	6/216	0.368	0.029
		Time*sex*exposure	2.456	6/216	0.026	0.064

Supplementary Table 2. Statistical values from the oxidative stress markers evaluation of rats exposed or not to PAR during gestation and lactation.

Encephalic region	Parameter	Factors	F	df	p	partial η^2	
PFC	AOPP	Exposure	0.595	2/62	0.555	0.019	
		Sex	1.154	1/62	0.287	0.018	
		Interaction	0.187	2/62	0.830	0.006	
	GSH	Exposure	2.515	2/63	0.089	0.074	
		Sex	1.961	1/63	0.166	0.030	
		Interaction	0.073	2/63	0.930	0.002	
	LOOH	Exposure	0.057	2/65	0.945	0.002	
		Sex	0.824	1/65	0.367	0.013	
		Interaction	0.355	2/65	0.703	0.011	
	SOD	Exposure	1.998	2/61	0.144	0.061	
		Sex	1.232	1/61	0.271	0.020	
		Interaction	0.336	2/61	0.716	0.011	
	HPC	AOPP	Exposure	0.013	2/63	0.987	0.000
			Sex	0.024	1/63	0.878	0.000
			Interaction	0.099	2/63	0.906	0.003
GSH		Exposure	1.323	2/63	0.274	0.040	
		Sex	0.245	1/63	0.622	0.004	
		Interaction	3.841	2/63	0.027	0.109	
LOOH		Exposure	0.443	2/66	0.644	0.013	
		Sex	0.014	1/66	0.905	0.000	
		Interaction	1.460	2/66	0.240	0.042	
SOD		Exposure	1.274	2/60	0.287	0.041	
		Sex	0.367	1/60	0.547	0.006	
		Interaction	1.270	2/60	0.288	0.041	
ST		AOPP	Exposure	1.099	2/64	0.340	0.033
			Sex	2.240	1/64	0.139	0.034
			Interaction	1.172	2/64	0.316	0.035

	GSH	Exposure	0.362	2/62	0.698	0.012
		Sex	0.216	1/62	0.644	0.003
		Interaction	0.196	2/62	0.822	0.006
	LOOH	Exposure	1.884	2/62	0.161	0.057
		Sex	0.948	1/62	0.334	0.015
		Interaction	1.978	2/62	0.147	0.060
	SOD	Exposure	3.258	2/61	0.045	0.097
		Sex	2.769	1/61	0.101	0.043
		Interaction	3.454	2/61	0.038	0.102
CB	AOPP	Exposure	0.238	2/65	0.789	0.007
		Sex	0.088	1/65	0.768	0.001
		Interaction	0.279	2/65	0.758	0.008
	GSH	Exposure	0.350	2/64	0.706	0.011
		Sex	0.531	1/64	0.469	0.008
		Interaction	0.573	2/64	0.567	0.018
	LOOH	Exposure	2.176	2/65	0.122	0.063
		Sex	1.103	1/65	0.298	0.017
		Interaction	0.698	2/65	0.501	0.021
	SOD	Exposure	0.089	2/65	0.915	0.003
		Sex	0.155	1/65	0.695	0.002
		Interaction	0.677	2/65	0.512	0.020

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do PAR durante a gestação e amamentação é considerado seguro, no entanto há relatos do aumento do risco de transtornos do neurodesenvolvimento advindos da exposição perinatal. Com a finalidade de investigar potenciais alterações nas mães e na prole decorrentes da exposição ao PAR, nossos achados sugerem que a exposição de ratos a 35 e 350 mg/kg de PAR durante a gestação e amamentação:

- a) não alterou o ganho de peso materno e dos filhotes;
- b) acarretou lesões extrahepáticas nas mães como sugerido pelo aumento da atividade sérica da AST na ausência de alteração da ALT;
- c) interferiu no desenvolvimento e/ou funcionalidade do sistema dopaminérgico dos filhotes machos, que apresentaram maior atividade locomotora e intensificação do comportamento estereotipado;
- d) diminui a atividade antioxidante no hipocampo e estriado de filhotes machos, que pareceram ser áreas mais susceptíveis aos efeitos do PAR;
- e) não promoveu alterações sensoriais na prole, sobretudo na discriminação olfatória.

Assim, os dados sugeriram que doses clinicamente relevantes de PAR induziu neurotoxicidade do desenvolvimento e que os efeitos dependeram da dose e do sexo, sendo os filhotes machos mais vulneráveis.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R.G. Overdoses of acetaminophen disrupt the thyroid-liver axis in neonatal rats. **Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 19, n. 5, p. 705–714, 2019.
- ALANAZI, A.M.; MOSTAFA, G.A.E.; AL-BADR, A.A. Glutathione. In: BRITAIN, H.G. (Org.). **Profiles of drug substances, excipients and related methodology**. 1. ed. Burlington: Academic Press, 2015. p. 43- 158.
- AL-BELOOSHI, T. et al. Acetaminophen-induced mitochondrial oxidative stress in murine j774.2 monocyte macrophages. **American Journal of Biomedical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 142–154, 2009.
- ANDERSEN, S.L. et al. Neurodevelopmental disorders in children born to mothers with thyroid dysfunction : evidence of fetal programming ? **Mechanisms in endocrinology**, v. 177, p. 27–36, 2017.
- ANDERSON, B.J. Paracetamol (acetaminophen): mechanisms of action. **Pediatric Anesthesia**, v. 8, n. 10, p. 915- 921, 2008.
- ANDERSON, M.E. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymology**, v. 113, p. 548–555, 1985.
- ARENDROP, F.S. et al. Is exposure during pregnancy to acetaminophen/ paracetamol disrupting female reproductive development? **Endocrine Connections**, v. 7, n. 1, p. 149–158, 2017.
- AVELLA-GARCIA, C.B. et al. Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 1987–1996, 2016.
- 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, p. 172609, 2019.
- BAMBINI-JUNIOR, V. et al. Resveratrol prevents social deficits in animal model of autism induced by valproic acid. **Neuroscience Letters**, v. 583, p. 176–181, 2014.
- BAUER, A.Z.; KRIEBEL, D. Prenatal and perinatal analgesic exposure and autism: an ecological link. **Environmental Health**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2013.
- BLECHARZ-KLIN, K. et al. Cerebellar level of neurotransmitters in rats exposed to paracetamol during development. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 1159–1164, 2016.
- BLECHARZ-KLIN, K. et al. Developmental exposure to paracetamol causes biochemical alterations in medulla oblongata. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 369–374, 2015.

BLECHARZ-KLIN, K. et al. Early paracetamol exposure decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in striatum and affects social behaviour and exploration in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 168, p. 25–32, 2018.

BLECHARZ-KLIN, K. et al. Hypothalamus – Response to early paracetamol exposure in male rats off spring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 76, p. 1–5, 2019.

BONNEFONT, J. et al. Antinociceptive mechanism of action of paracetamol. **Drugs**, v. 63, n. 2, p. 1–4, 2003.

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 sciences**, v. 208, p. 221-231, 2018.

BORNEHAG, C.G. et al. Prenatal exposure to acetaminophen and children's language development at 30 months. **European Psychiatry**, v. 51, p. 98–103, 2018.

BRANDLISTUEN, R.E. et al. Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: a sibling-controlled cohort study. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 6, p. 1702–1713, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 11, de 29 de setembro de 2016. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, nº 189, Brasília, D.F., 30 set. 2016.

BREMER, L. et al. Paracetamol medication during pregnancy : insights on intake frequencies, dosages and effects on hematopoietic stem cell populations in cord blood from a longitudinal prospective pregnancy cohort. **EBioMedicine**, v. 26, p. 146–151, 2017.

CONINGS, S. et al. Transplacental transport of paracetamol and its phase II metabolites using the ex vivo placenta perfusion model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 370, p. 14–23, 2019.

DIETZEN, D.J. Amino Acids, Peptides, and Proteins. In: RIFAI, N.; HORVATH, A.R.; WTTWER, C.T. (Org.). **Principles and applications of molecular diagnostics**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2018. p. 345–380.

DU, K.; RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. Oxidative stress during acetaminophen hepatotoxicity: sources, pathophysiological role and therapeutic potential. **Redox Biology**, v. 10, p. 148–156, 2016.

EK, C. J. et al. Barriers in the developing brain and Neurotoxicology. **NeuroToxicology**, v. 33, p. 586–604, 2012.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Harmonization in interspecies extrapolation: use of body weight 3/4 as default method in derivation of the oral reference dose**. 2006. Disponível em: <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2013-09/documents/recommended-use->

of-bw34.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2020.

EPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for developmental toxicity risk assessment**. 1991. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/dev_tox.pdf>. Acesso em: 29 jul. 2020.

EPA, United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for neurotoxicity**. 1998. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-11/documents/neuro_tox.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2020.

ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the Roman high- and low-avoidance rats. **Neuroscience Research**, v. 77, p. 187–201, 2013.

FATTORI, V. et al. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF- κ B activation in mice. **Pharmacological research**, v. 120, p. 10-22, 2017.

FESTING, M.F.W. Design and statistical methods in studies using animal models of development. **ILAR Journal**, v. 47, n. 1, p. 5–14, 2006.

GHASSABIAN, A.; TRASANDE, L. Disruption in thyroid signaling pathway: a mechanism for the effect of endocrine-disrupting chemicals on child neurodevelopment. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 204, 2018.

GONZALEZ FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GRAHAM, G.G.; SCOTT, K.F. Mechanism of action of paracetamol. **American Journal of Therapeutics**, v. 12, p. 46–55, 2005.

GRAHAM, G.G. et al. The modern pharmacology of paracetamol : therapeutic actions, mechanism of action , metabolism , toxicity and recent pharmacological findings. **Inflammopharmacology**, v. 21, p. 201–232, 2013.

GREGORY, E.H.; PFAFF, D.W. Development of olfactory-guided behavior in infant rats. **Physiology and Behavior**, v. 6, p. 573–6, 1971.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.

HASSAN, E. Recall bias can be a threat to retrospective and prospective research designs. **The internet journal of Epidemiology**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2005.

HAY-SCHMIDT, A. et al. Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. **Reproduction**, v. 154, n. 2, p. 145–152, 2017.

HEYRANA, K.; BYERS, H.M.; STRATTON, P. Increasing the participation of pregnant women in clinical trials. **The Journal of the American Medical Association**, v. 320, n. 20, p. 2077–2078, 2018.

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.

ISHITSUKA, Y.; KONDO, Y.; KADOWAKI, D. Toxicological property of acetaminophen : the dark side of a safe antipyretic/analgesic drug ? **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 2, p. 195–206, 2020.

JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. Oxidant stress and lipid peroxidation in acetaminophen hepatotoxicity. **Reactive oxygen species**, v. 5, n. 15, p. 145–158, 2018.

JI, Y. et al. Association of cord plasma biomarkers of in utero acetaminophen exposure with risk of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder in childhood. **JAMA Psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 180–189, 2020.

JOHANSSON, P.A. et al. The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. **BioEssays**, v. 30, n. 3, p. 237–248, 2008.

JUGAN, M.L.; LEVI, Y.; BLONDEAU, J.P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 939–947, 2010.

KAYE, D.K. The moral imperative to approve pregnant women's participation in randomized clinical trials for pregnancy and newborn complications. **Philosophy, Ethics, and Humanities in Medicine**, v. 14, n. 11, p. 1–11, 2019.

KIM, S.H. **Acetaminophen associated neurotoxicity and its relevance to neurodevelopmental disorders**. 2017. 126 f. Thesis (Doctor of Physiology) - Department of Molecular Pharmacology and Physiology, University of South Florida, Tampa, 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.

KLEVEN, G.A.; BELLINGER, S.A. Prenatal animal models of behavioural development. In: JONES, N.A. et al. (Org.). **Conducting research in developmental psychology: a topical guide for research methods utilized across the lifespan**. 1. ed. New York: Routledge, 2019. p. 50–69.

KLINGER-GRATZ, P.P. et al. Acetaminophen relieves inflammatory pain through CB 1 cannabinoid receptors in the rostral ventromedial medulla. **The 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.

LACTMED. Drugs and Lactation Database. **Acetaminophen**. 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK501588/pdf/Bookshelf_NBK501588.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2020.

LIEW, Z. et al. Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 4, p. 313–320, 2014.

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, 2016a.

LIEW, Z. et al. Paracetamol use during pregnancy and attention and executive function in offspring at age 5 years. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 2009–2017, 2016b.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

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. 989, 2020.

MALLET, C. et al. TRPV1 in brain is involved in acetaminophen-induced antinociception. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12748, 2010.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MASARWA, R. et al. Prenatal exposure to acetaminophen and risk for attention deficit hyperactivity disorder and autistic spectrum disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis of cohort studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 187, n. 8, p. 1817–1827, 2018.

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.

MILLER, G.L. Protein determination for large numbers of samples. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 5, p. 964–964, 1959.

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. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 10, p. 5751–5759,

2018.

MOREIRA DE BARROS, G.A. et al. The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 69, n. 6, p. 529–536, 2019.

MOY, S.S. et al. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 3, p. 287–302, 2004.

NESAN, D.; KURRASCH, D.M. Gestational exposure to common endocrine disrupting chemicals and their impact on neurodevelopment and behavior. **Annual Review of Physiology**, v. 82, n. 1, p. 177–202, 2020.

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

NRC. National Research Council. (US) Committee on the use of third party toxicity research with human research participants. **Intentional human dosing studies for EPA regulatory purposes: scientific and ethical issues**. Washington (DC): The National Academies Press, 2004.

OECD/OCDE. Organisation for economic co-operation and development. **Test n° 414 - prenatal developmental toxicity study**. Paris: OECD Publishing, 2018

OECD/OCDE. Organisation for economic co-operation and development. **Test n° 426 - developmental Neurotoxicity Study**. Paris: OECD Publishing, 2007.

PARKER, W. et al. The role of oxidative stress, inflammation and acetaminophen exposure from birth to early childhood in the induction of autism. **Journal of International Medical Research**, v. 45, n. 2, p. 407–438, 2017.

PEREIRA, M.R. et al. Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring ? **Reproductive Toxicology**, v. 93, p. 68–74, 2020.

PHILIPPOT, G. et al. A cannabinoid receptor type 1 (CB1R) agonist enhances the developmental neurotoxicity of acetaminophen (paracetamol). **Toxicological Sciences**, v. 166, n. 1, p. 203–212, 2018.

PHILIPPOT, G. et al. A single Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC) dose during brain development affects markers of neurotrophin, oxidative stress, and apoptosis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1156, 2019.

PHILIPPOT, G. et al. Adult neurobehavioral alterations in male and female mice following developmental exposure to paracetamol (acetaminophen): characterization of a critical period. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 10, p. 1174–1181, 2017.

PIWOWAR, A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. **Polski Merkuriusz Lekarski Polish Medical**

Journal: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego, v. 28, n. 164, p. 166–169, 2010.

RADA, P. et al. SIRT1 Controls acetaminophen hepatotoxicity by modulating inflammation and oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 28, n. 13, p. 1187–1209, 2018.

REID, A.B. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, n. 2, p. 509–516, 2005.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

RIFAS-SHIMAN, S.L. et al. Associations of prenatal or infant exposure to acetaminophen or ibuprofen with mid-childhood executive function and behaviour. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 287–298, 2020.

ROUSSEAU, C.G.; GAD, S.C. Statistical assessment of toxicologic pathology studies. In: HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G.; WALLIG, M.A. (Org.). **Haschek and Rousseau's handbook of toxicologic pathology (volume II)**. 3. ed. Burlington: Academic Press, 2013. p. 894–988.

SAAD, A. et al. Is There a causal relation between maternal acetaminophen administration and ADHD? **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157380, 2016.

SAUNDERS, N.R. et al. Recent developments in understanding barrier mechanisms in the developing brain: drugs and drug transporters in pregnancy, susceptibility or protection in the fetal brain? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 487–505, 2019.

SAUNDERS, N.R.; LIDDELOW, S.A.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barrier mechanisms in the developing brain. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 1–18, 2012.

SCHENKEL, L. et al. Drugs in pregnancy and lactation – medications used in Swiss obstetrics. **Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie**, v. 222, n. 04, p. 152–165, 2018.

SCHNEIDER, T.; PRZEWŁOCKI, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 80–89, 2005.

SCHULTZ, S. et al. Effects of the analgesic acetaminophen (paracetamol) and its para-aminophenol metabolite on viability of mouse-cultured cortical neurons. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 2, p. 141–144, 2011.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **European Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 117–126, 1976.

SETZER, R.W. Statistical problems (and some solutions) associated with testing for effects in developmental toxicology. In: NEUBERT, D. et al. (Org.). **Risk assessment of prenatally-induced adverse health effects**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1992. p. 197–210.

SPIGSET, O.; HÄGG, S. Analgesics and breast-feeding. **Paediatric Drugs**, v. 2, n. 3, p. 223–238, 2000.

STAAL, W.G. Autism, DRD3 and repetitive and stereotyped behavior, an overview of the current knowledge. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 9, p. 1421–1426, 2015.

ŠTEFĀNIK, P.; OLEXOVÁ, L.; KRŠKOVÁ, L. Increased sociability and gene expression of oxytocin and its receptor in the brains of rats affected prenatally by valproic acid. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 131, p. 42–50, 2015.

STERGIAKOULI, E.; THAPAR, A.; SMITH, G.D. Association of acetaminophen use during pregnancy with behavioral problems in childhood: evidence against confounding. **JAMA Pediatrics**, v. 170, n. 10, p. 964–970, 2016.

STRÖMMER, S. et al. Improving recruitment to clinical trials during pregnancy: a mixed methods investigation. **Social science & medicine**, v. 200, p. 73–82, 2018.

TEJADA, J.; CHAIM, K.T.; MORATO, S. X-PlorRat: a software for scoring animal behavior in enclosed spaces. **Psicologia: teoria e pesquisa**, v. 33, p. 1–4, 2017.

THOMPSON, J.M.D. et al. Associations between acetaminophen use during pregnancy and ADHD symptoms measured at ages 7 and 11 years. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108210, 2014.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502–522, 1969.

TODA, K. Is acetaminophen safe in pregnancy? **Scandinavian Journal of Pain**, v. 17, n. 1, p. 445–446, 2017.

TOVO-RODRIGUES, L. et al. Is intrauterine exposure to acetaminophen associated with emotional and hyperactivity problems during childhood? Findings from the 2004 Pelotas birth cohort. **BMC Psychiatry**, v. 18, n. 1, p. 368, 2018.

TOVO-RODRIGUES, L. et al. Low neurodevelopmental performance and behavioural/ emotional problems at 24 and 48 months in Brazilian children exposed to acetaminophen during foetal development. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 278–286, 2020.

TRØNNES, J.N. et al. Prenatal paracetamol exposure and neurodevelopmental outcomes in preschool-aged children. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 34, n. 3, p. 247–256, 2020.

TURNER, M.A.; KENNY, L.; ALFIREVIC, Z. Challenges in designing clinical trials to test new drugs in the pregnant woman and fetus. **Clinics in Perinatology**, v. 46, n. 2, p. 399-416, 2019.

van der GRAAF, R. et al. Fair inclusion of pregnant women in clinical trials : an integrated scientific and ethical approach. **Trials**, v. 19, n. 78, p. 1–9, 2018.

VIBERG, H. et al. Paracetamol (acetaminophen) administration during neonatal brain development affects cognitive function and alters its analgesic and anxiolytic response in adult male mice. **Toxicological Sciences**, v. 138, n. 1, p. 139–147, 2014.

VLENERIE, R. et al. Neurodevelopmental problems at 18 months among children exposed to paracetamol in utero : a propensity score matched cohort study. **International Journal of Epidemiology**, v. 45, n. 6, p. 1998–2008, 2016.

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.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, p. 1304–1313, 1996.

WITKO-SARSAT, V.; GAUSSON, V.; DESCAMPS- LATSCHA, B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? **Kidney International**, v. 63, n. Supp. 84, p. S11–S14, 2003.

YAMAN, H. et al. Pentraxin 3 as a potential biomarker of acetaminophen-induced liver injury. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 1-2, p. 147-151, 2013.

YAN, M. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions. **Redox Biology**, v. 17, p. 274–283, 2018.

YANAI, J.; VIGODA, M.J; ORNOY, A. Reversal of neurobehavioral teratogenicity in animal models and human: three decades of progress. **Brain Research Bulletin**, v. 150, p. 328–342, 2019.

YSTROM, E. et al. Prenatal exposure to acetaminophen and risk of ADHD. **Pediatrics**, v. 140, n. 5, p. 1–9, 2017.

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

ZUCKER, I. Risk mitigation for children exposed to drugs during gestation: a critical role for animal preclinical behavioral testing. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 77, p. 107–121, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Determinação de proteínas no tecido encefálico

1. Preparo da Solução A

Pesar 50 g de carbonato de sódio, 10 g de hidróxido de sódio e diluir em 500 mL de água ultrapura.

2. Preparo da Solução B

Pesar 5 g de tartarato de sódio e diluir em 250 mL de água ultrapura.

3. Preparo da Solução C

Pesar 2,5 g de sulfato de cobre e diluir em 250 mL de água ultrapura.

4. Preparo do Reativo Cúprico – Preparar no dia de uso

Realizar a mistura de 10 mL de solução A, 500 µL de Solução B e 500 µL de Solução C e homogeneizar.

5. Preparo de Solução de Folin– Preparar no dia de uso

Adicionar 1 mL de Reativo de Folin-Ciocalteu em 10 mL de água ultrapura.

6. Preparo de Solução estoque de albumina

Pesar 15 mg de albumina bovina sérica e diluir em 25 mL de água ultrapura.

7. Preparo da amostra

Macerar o tecido encefálico em homogeneizador de tecido diluído em 6 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 15 minutos à 4°C em 3000 rpm. Retirar o sobrenadante e centrifugar novamente por 15 minutos à 4°C em 9000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

8. Diluição da amostra para análise

Em tubo de ensaio adicionar 20µL de amostra e 980µL de água ultrapura. Homogeneizar bem e seguir a reação descrita no tópico 7.2.

9. Procedimento

9.1 Preparo da curva padrão de albumina

Realizar a diluição dos pontos da curva de acordo com a tabela abaixo.

Tubo de ensaio	Concentração (mg/L)	Água ultrapura	Solução estoque de albumina
1	300 mg/L	600 µL	600 µL
2	250 mg/L	700 µL	500µL
3	200 mg/L	800 µL	400µL
4	150 mg/L	900 µL	300µL
5	100 mg/L	1.000 µL	200µL
6	50 mg/L	1.100 µL	100µL
7	25 mg/L	1.150µL	50µL

9.2 Preparo da reação em microplaca:

Realizar conforme a tabela abaixo.

Reagentes	Branco	Padrão	Amostra
H ₂ O	60 µL	-	-
BSA	-	60µL	-
Amostra	-	-	60 µL
Reativo Cúprico	60µL	60µL	60µL

Após homogeneização deixar em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionar 180µL em todos os poços da microplaca e encubar por 10 minutos a 50°C. Realizar a leitura espectrofotométrica a 660 nm.

9.3 Cálculo da concentração de proteínas totais

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Média das D.O em triplicata}}$$

Calcular para todos os pontos da curva e ao final, obter a média dos fatores. Em seguida, realizar a seguinte equação:

$$\text{Concentração proteica} = \text{Fator final} * \text{média das D.O. amostra} * 300$$

Os dados são expressos em mg/L.

APÊNDICE B- Determinação de produtos avançados de oxidação proteica em tecido encefálico e hepático de ratos (adultos e filhotes)

1. Preparo da solução estoque do padrão de Cloramina T

Pesar 28,17 mg de Cloramina T e diluir em 100 mL de água ultrapura.

2. Preparo do tampão fosfato-salina

Dissolver o sachê comercial em 1 litro de água ultrapura.

3. Preparo da solução de ácido cítrico monoidratado – Preparar no dia de uso

Pesar 2,10 g de ácido cítrico e dissolver em 50 mL de água ultrapura.

4. Preparo da solução de iodeto de potássio- Preparar no dia de uso

Dissolver 0,962 g de iodeto de potássio em 5 mL de tampão fosfato-salina.

5. Preparo da solução de trabalho do padrão de Cloramina T- Preparar no dia de uso

Transferir 200 µL padrão de Cloramina T em 1800 µL de ácido cítrico.

6. Preparo da amostra

6.1 Tecido encefálico

Macerar o tecido encefálico em homogeneizador de tecido diluído em 6 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 15 minutos à 4°C em 3000 rpm. Retirar o sobrenadante e centrifugar novamente por 15 minutos à 4°C em 9000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

6.2 Tecido hepático

Macerar 100 mg de tecido hepático com o auxílio de homogeneizador de tecido diluído em 15 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 20 minutos à 4°C em 10.000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

7 Procedimento

7.1 Preparo da curva padrão

Pipetar na microplaca branco e os pontos da curva (triplicada) conforme a tabela abaixo:

Reagentes	Branco	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Ácido cítrico (µL)	190	-	38	76	114	152	171	180,5
Solução de trabalho do padrão (µL)	-	190	152	114	76	38	19	9,5
KI (µL)	10	10	10	10	10	10	10	10

Após 2 minutos, realizar a leitura espectrofotométrica em 340 nm.

7.2 Preparo da reação:

Pipetar em eppendorf as amostras em triplicata de acordo com a tabela abaixo:

	Branco (µL)	Amostra (µL)
Amostra (µL)	-	60
KI (µL)	10	15
Ácido cítrico (µL)	200	240

Centrifugar por 2 minutos para ocorrer a reação à 4°C em 10.000 rpm. Transferir 210 µL de cada eppendorf para a microplaca e realizar a leitura em 340 nm.

7.3 Cálculo da concentração da amostra

Calcular o fator de cada ponto da curva padrão e realizar a média, a partir da equação abaixo:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Média das D.O em triplicata}}$$

Em seguida, realizar o cálculo para as amostras conforme equação abaixo.

$$\text{Concentração} = \text{Fator da curva} * \text{Média das leituras amostrais} * \text{Fator de diluição}$$

Fator de diluição:

- Para tecido encefálico = 31,5

- Para tecido hepático = 78,75

Os dados serão expressos em nmol/ mg de proteína de equivalente de Cloramina T no tecido encefálico, enquanto que os resultados do tecido hepático serão expressos em nmol/mL de equivalente de Cloramina T.

APÊNDICE C- Determinação de glutathiona reduzida em tecido encefálico e hepático de ratos (adultos e filhotes)

1. Preparo da Solução A

Pesar 1,74 g de fosfato de potássio dibásico e diluir em 100 mL de água ultrapura.

2. Preparo da Solução B

Pesar 1,36 g de fosfato de potássio monobásico e diluir em 100 mL de água ultrapura.

3. Preparo de Tampão de ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico (EDTA)

Pesar 0,0372 g de EDTA e dissolver em 75 mL de solução A e 15 mL de solução B. Ajustar o pH até 7,4 com as próprias soluções (A ou B) e depois completar com água ultrapura em um balão de 100 mL.

4. Preparo de solução de bicarbonato de sódio (0,5%)

Pesar 0,5 g de bicarbonato de sódio e diluir em 100 mL de água ultrapura.

5. Preparo de solução 5,5'-ditiobios (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB)

Pesar 15 mg de DTNB e dissolver em 10 mL de solução de bicarbonato de sódio a 0,5%. Manter alíquotas congeladas em -80 °C e sob o abrigo de luz. Descongelar somente no momento de uso.

6. Preparo do padrão de glutathiona

Pesar 15,365 mg de padrão e dissolver em 10 mL de água ultrapura.

7. Preparo da Solução MIX

Pipetar 17,64 mL de solução tampão EDTA e 360 µL de solução estoque de DTNB.

8. Preparo da amostra

8.1 Tecido encefálico

Macerar o tecido encefálico em homogeneizador de tecido diluído em 6 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 15 minutos à 4°C em 3000 rpm. Retirar o sobrenadante e centrifugar novamente por 15 minutos à 4°C em 9000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

8.2 Tecido hepático

Macerar 100 mg de tecido hepático com o auxílio de homogeneizador de tecido diluído em 15 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 20 minutos à 4°C em 10.000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

9. Procedimento

9.1 Preparo da curva padrão

Em tubo de ensaio diluir os seguintes pontos:

Componentes	Concentração dos pontos da curva (µM)									
	50	100	150	200	250	300	400	500	600	1000
Solução padrão de glutathiona (µL)	5	10	15	20	25	30	40	50	60	100
Água ultrapura (µL)	995	990	985	980	975	970	960	950	940	900

Em seguida, seguir a tabela abaixo para pipetagem dos pontos da curva na microplaca:

Componentes	Concentração dos pontos da curva (µM)									
	50	100	150	200	250	300	400	500	600	1000
Soluções de padrão diluída (µL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Solução MIX (µL)	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180

Realizar a leitura das amostras em espectrofotômetro em 412 nm, após encubação da microplaca por 15 minutos em temperatura ambiente.

9.2 Diluição do homogenato de tecido encefálico (1:4)

Adicionar 20 µL de amostra em 60 µL de água ultrapura no poço e homogeneizar bem para realizar a reação a partir desta. Esta diluição deve ser realizada em outra microplaca devido o pequeno volume. Em seguida, utilizar as amostras diluídas para análise, de acordo com o tópico 9.4.

9.3 Diluição do homogenato de tecido hepático (1:1)

Adicionar 40 µL de amostra em 40 µL de água ultrapura no poço e homogeneizar bem para realizar a reação a partir desta. Esta diluição deve ser realizada em outra microplaca devido o pequeno volume. Em seguida, utilizar as amostras diluídas para análise, de acordo com o tópico 9.4.

9.4 Determinação de GSH

Em microplaca, realizar a pipetagem das amostras diluídas e branco conforme tabela abaixo:

Reagentes	Branco (triplicata)	Amostra (triplicata)
Água ultrapura	20 µL	---
Amostra diluída	---	20 µL
Solução MIX	180 µL	180 µL

Obter as leituras em espectrofotômetro em 412 nm, após encubação da microplaca por 15 minutos em temperatura ambiente.

10. Cálculo de GSH

Calcular o fator de cada ponto da curva padrão e realizar a média, a partir da equação abaixo:

$$\text{Fator} = \frac{\text{Concentração do padrão}}{\text{Média das D.O em triplicata}}$$

10.1 Para tecido encefálico

$$\text{GSH} = \left(\frac{\text{Média das leituras das amostras} * \text{Fator da curva} * 24}{\text{Concentração de proteínas totais}} \right) * 1000$$

Os resultados serão expressos em nmol/mg de proteína.

10.2 Para tecido hepático

$$\text{GSH} = \left(\frac{\text{Média das leituras das amostras} * \text{Fator da curva} * 30}{\text{Peso do tecido (gramas)}} \right) * 1000$$

Os resultados serão expressos em nmol/g de tecido.

APÊNDICE D- Determinação de hidroperóxido lipídico em tecido encefálico ratos (adultos e filhotes) por quimioluminescência

1. Preparo da solução de hidróxido de sódio

Pesar 80 g de hidróxido de sódio e diluir em 200 mL de água ultrapura.

2. Preparo de tampão fosfato de potássio monobásico

Pesar 1,3609 g de fosfato de potássio monobásico e 4,5 g de cloreto de sódio e diluí-los em 500 mL de água ultrapura. Ajustar o pH da solução para 7,4 com hidróxido de hidrogênio.

3. Preparo da solução de Terc-Butil

Transferir 193 μL e diluí-lo em 9614 μL de água ultrapura. Manter a solução em geladeira e ao abrigo da luz.

4. Preparo da amostra

Macerar o tecido encefálico em homogeneizador de tecido diluído em 6 vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 15 minutos à 4°C em 3000 rpm. Retirar o sobrenadante e centrifugar novamente por 15 minutos à 4°C em 9000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

5. Procedimento

Realizar as análises sob abrigo da luz e manter o ambiente na temperatura de 30 °C – 32 °C.

5.1 Programação do luminômetro Glomax 20/20

Na tela do equipamento:

- ✓ Selecionar Protocols
- ✓ Verificar Run User Protocols
- ✓ QL 60
- ✓ Show Parameters
- ✓ Clicar OK.

5.2 Corrida do tampão e da amostra

Antes da análise dos homogenatos, realizar a corrida do tampão. Em eppendorf, transferir 392 μL de tampão fosfato de potássio monobásico e 8 μL de Terc-Butil. Após rápida homogeneização, introduzir no luminômetro para análise pelo período de 60 minutos (3600 leituras).

Para a corrida de amostras, tanto em tecido encefálico, transferir 342 μL de tampão fosfato de potássio monobásico, 50 μL de homogenato e 8 μL de Terc-Butil. Após rápida homogeneização, introduzir no luminômetro para análise pelo período de 60 minutos (3600 leituras).

6. Cálculo

Adicionar os 3600 pontos de leitura no software Origin® 9. Selecionar a coluna de dados e realizar os seguintes comandos:

- ✓ Analysis
- ✓ Signal Processing
- ✓ Smoothing
- ✓ Open Dialog
 - Method
 - Adjacent
 - Averaging
 - Points of Window → adicionar 300
 - Clique ok

Selecionar os dados Smoothed e realizar o método de interporlação/extrapolação a partir dos seguintes comandos:

- ✓ Analysis
- ✓ Mathematics
- ✓ Interpolate/Extrapolate
- ✓ Na caixa de diálogo clicar em:
 - Mathematics: interpet 1xy
 - Numbers of points (tirar seleção AUTO de todos as caixas)

- Adicionar mínimo= 1; máximo= 60; total= 60
- Clique em OK.

Selecionar a coluna de dados interpolados/extrapolados e calcular a área sob a curva:

- ✓ Analysis
- ✓ Mathematics
- ✓ Integrate
- ✓ Open dialog
- ✓ Clique ok.

Copiar a área e corrigir pela quantidade de mg de proteínas.

APÊNDICE E- Determinação da atividade de superóxido dismutase em tecido encefálico de ratos (adultos e filhotes)

1. Preparo do tampão Tris (hidroximetil) aminometano

Pesar 12,12 g de Tris e 0,186g de ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico e após dissolver em aproximadamente 70 mL de água ultrapura, ajustar o pH para 8,0 com HCL 37% (puro). Completar o volume de 100 mL com água ultrapura.

2. Preparo de ácido clorídrico 0,001 M

Transferir 4,16 μ L de HCL 37% (puro) em aproximadamente 45 mL de água ultrapura e completar o volume até 50 mL.

3. Preparo da solução de pirogalol- Preparar no dia do uso

Pesar 2,52 mg de pirogalol e diluir em 2 mL de HCL 0,001M.

4. Preparo da amostra

Macerar o tecido encefálico em homogeneizador de tecido diluído em 6vezes peso/volume de solução de tampão fosfato-salina. Centrifugar por 15 minutos à 4°C em 3000 rpm. Retirar o sobrenadante e centrifugar novamente por 15 minutos à 4°C em 9000 rpm. O sobrenadante final será utilizado para análise.

5. Procedimento

5.1 Diluição do homogenato de tecido encefálico (1:50)

Adicionar 2 μ L de amostra em 198 μ L de água ultrapura no poço e homogeneizar bem para realizar a reação a partir desta. Esta diluição deve ser realizada em outra microplaca devido ao pequeno volume. Em seguida, utilizar as amostras diluídas para análise, de acordo com o tópico 5.2.

5.2 Reação em microplaca

Para análise, realizar a reação em microplaca conforme tabela abaixo:

Reagentes	Pirogalol (triplicata)	Amostra (triplicata)
Água deionizada	174 μ l	170 μ L
Tampão tris	20 μ l	20 μ L
Amostra (1:50)	-	4 μ L
Pirogalol	6 μ l	6 μ L

Realizar a leitura em espectrofotômetro à 37°C no comprimento de onda de 420 nm, durante 6 minutos com verificação da densidade óptica a cada minuto.

6. Cálculo da atividade enzimática

Adicionar a diferença das absorbâncias entre os pontos de leitura no software Origin® 9. Calcular a área correspondente ao pirogalol presente tanto no branco quanto amostras, calcular a integral dos 6 dados obtidos através dos comandos:

- ✓ Analysis
- ✓ Mathematics
- ✓ Integrate
- ✓ Open dialog
- ✓ Clique ok.

Sabendo que 1 unidade de SOD inibe 50% do pirogalol, calcular a quantidade de SOD presente nos 4 μ L de amostra utilizado para análise. Ainda, considerar o fator de diluição prévia de 750 para o tecido hepático e de 300 para o tecido encefálico. Dividir o valor obtido pelos minutos de análise para obtenção da atividade. Os dados podem ser corrigidos pela quantidade de mg de proteínas.