



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEBERSON FERNANDO ALEIXO

**TRATAMENTO MATERNO COM PARACETAMOL:
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NA PROLE
FEMININA DE RATAS**

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

ALEIXO, JEBERSON FERNANDO.

TRATAMENTO MATERNO COM PARACETAMOL: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NA PROLE FEMININA DE RATAS / JEBERSON FERNANDO

ALEIXO. - Londrina, 2019.

56 f. : il.

Orientador: DANIELA CRISTINA CECCATTO GERARDIN.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.

Inclui bibliografia.

1. PARACETAMOL - Tese. 2. SISTEMA REPRODUTOR FEMININO - Tese. 3. FARMACOLOGIA E TOXICOLOGIA - Tese. I. GERARDIN, DANIELA CRISTINA CECCATTO . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

JEBERSON FERNANDO ALEIXO

**TRATAMENTO MATERNO COM PARACETAMOL:
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NA PROLE
FEMININA DE RATAS**

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

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

Londrina
2019

JEBERSON FERNANDO ALEIXO

**TRATAMENTO MATERNO COM PARACETAMOL:
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA NA PROLE FEMININA
DE RATAS**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Milene Leivas Vieira
Universidade Filadelfia – UNIFIL

Prof^a. Dr^a. Cristiane Mota Leite
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 19 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares e principalmente meus pais e meu irmão, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, obrigado pelo incentivo, amor e compreensão nos momentos em que mais precisei.

À Prof^a Daniela C. C. Gerardin, minha orientadora, pela confiança, paciência e principalmente por não medir esforços em auxiliar e sanar qualquer questionamento que tive ao longo do caminho. Também não poderia deixar de agradecer à Prof^a Milene Leivas Vieira, por me inspirar e me aproximar da área acadêmica. Sem sombra de dúvidas ambas são grandes exemplos e profissionais incríveis as quais tenho grande respeito e admiração.

Agradeço também às Professoras Estefânia Gastaldello Moreira, Graziela Sciantti Ceravolo e Ana Carolina Inhasz Kiss, pelas valiosas contribuições nas metodologias empregadas neste trabalho.

Agradeço aos colegas do laboratório da Farmacologia da Reprodução Bruno, Nathalia, Liara, Lorena, Maria Luiza, Simone, Mateus, Andreza, e também aos demais colegas do CIF: Camila Vidigal, Kawane Moura, Debora Gomes e Danielle Lacerda, não só pela colaboração de forma excepcional na execução do trabalho, mas também por me acolherem de braços abertos e principalmente pela amizade e momentos alegres que me proporcionaram ao longo desses 2 anos. Também gostaria de fazer um agradecimento especial à Marina Rangel e Rodrigo Klein, duas pessoas incríveis que foram muito importantes tanto para o meu crescimento acadêmico como também pessoal, muito obrigado pela amizade e parceria de vocês.

Agradeço à CAPES e CNPq (processo nº 306522/2017-9) pelo apoio financeiro.

Agradeço à todos amigos, familiares, professores e colaboradores que, mesmo não citados aqui, de alguma maneira foram importantes na conclusão deste trabalho.

E por fim, agradeço a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

**“O extraordinário está naquilo que fazemos,
não em quem somos.”**

Tomb Raider – 2013

ALEIXO, Jeberson Fernando. **Tratamento materno com paracetamol: avaliação da toxicidade reprodutiva na prole feminina de ratas**. 2019. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O paracetamol (PAR) é um fármaco de venda livre utilizado no mundo todo para o tratamento de dor e febre, sendo também um dos mais utilizados pelas gestantes por ser considerado seguro para a mãe e para o feto durante toda a gestação e lactação. No entanto, o PAR é transferido para o leite materno e atravessa livremente a membrana hemato-placentária, podendo estar presente durante fases importantes do desenvolvimento fetal. A literatura mostra que o tratamento materno com PAR pode causar diminuição da distância anogenital (DAG) e reserva de folículos na prole feminina de roedores. O presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento materno com PAR pode alterar comportamentos reprodutivos e parâmetros relacionados ao desenvolvimento sexual da prole feminina. Ratas Wistar prenhes foram tratadas diariamente por gavagem com PAR 350 mg/kg/dia (Grupos PARG: Paracetamol Gestacional e PARGL: Paracetamol Gestacional-Lactacional) ou água (Grupos CTRG: Controle Gestacional e CTRGL: Controle Gestacional-Lactacional) durante a gestação (grupos CTRG e PARG - do DG 6 até o parto) ou gestação e lactação (grupos CTRGL e PARGL: do DG 6 até o desmame). No presente estudo, o tratamento materno com PAR alterou parâmetros reprodutivos da prole feminina, uma vez que provocou diminuição da reserva folicular, aumento na concentração plasmática de estradiol e comprometimento do comportamento sexual, este último, possivelmente relacionado ao aumento do comportamento de limpeza dos filhotes apresentado pelas mães.

Palavras-chave: Acetaminofeno. Comportamento materno. Comportamento sexual. Ovários.

ALEIXO, Jeberson Fernando. **Maternal treatment with paracetamol: evaluation of reproductive toxicity in female rat offspring.** 2019. 56 p. Dissertation (Master's degree in Physiological Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Paracetamol (PAR) is an over-the-counter drug used worldwide for the treatment of pain and fever. It is also one of the drugs most used by pregnant women because it is considered safe for the mother and the fetus throughout pregnancy and lactation. However, it is transferred into breast milk and crosses freely the blood-placental barrier and may be present during important stages of fetal development. The literature shows that intrauterine exposure to PAR via maternal treatment may cause decreased anogenital distance (AGD) and reserve follicles in female rodent offspring. Therefore, the present study aimed to evaluate if maternal treatment with PAR can alter parameters related to reproductive behaviors and sexual development in the female rat offspring. Pregnant female Wistar rats were daily treated by gavage during gestational period with PAR 350 mg/kg/day (PARG: Paracetamol Gestational; PARGL: Paracetamol Gestational-Lactational groups) or water (CTRG: Control Gestational; CTRGL: Control Gestational-Lactational groups) during the gestational (CTRG and PARG groups - from gestational day 6 until delivery) or gestational and lactational periods (CTRGL and PARGL groups: from the gestational day 6 until weaning). Our results shows that maternal PAR treatment can impair the female reproductive development, since it alters the grooming behavior of the dams, and compromise the sexual behavior, follicle reserve and estradiol plasma concentration of the female offspring.

Keywords: Acetaminophen. Maternal behavior. Sexual behavior. Histology. Ovaries.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fórmula química estrutural do paracetamol	14
Figura 2 – Delineamento experimental.....	19
Figura 3 – Fases do ciclo estral observadas em microscopia de luz.....	22
Figura 4 – Representação dos diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do coeficiente de lordose e score de lordose	23
Figura 5 – Ganho de peso das mães tratadas com paracetamol dos diferentes grupos experimentais	27
Figura 6 – Parâmetros analisados no comportamento materno das mães tratadas durante o período gestacional (CTRG e PARG) do DL 1 ao 10	28
Figura 7 – Parâmetros analisados no comportamento materno das mães tratadas durante o período gestacional-lactacional (CTRGL e PARGL) do DL 1 ao 10.	29
Figura 8 – Acompanhamento de peso corporal médio da ninhada da prole feminina do DPN 1 ao 21 dos diferentes grupos experimentais	31
Figura 9 – Ganho de peso da prole feminina entre o DPN 21 e 90 dos diferentes grupos experimentais	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso corpóreo e dos órgãos reprodutivos das mães tratadas dos diferentes grupos experimentais	30
Tabela 2 – Peso corporal e DAG relativa nos DPNs 1 e 21 e peso dos órgãos reprodutivos no DPN 21 da prole feminina dos diferentes grupos experimentais	31
Tabela 3 – Instalação da puberdade da prole feminina dos diferentes grupos experimentais	32
Tabela 4 – Coeficientes das diferentes fases e duração do ciclo estral da prole feminina dos diferentes grupos experimentais (DPN 75-90)	34
Tabela 5 – DAG relativa, dosagem de estradiol, peso corporal e dos órgãos reprodutivos da prole feminina no DPN 90 dos diferentes grupos experimentais	35
Tabela 6 – Análise histomorfométrica do útero, contagem de corpos lúteos e folículos ovarianos da prole feminina no DPN 90 dos diferentes grupos experimentais	36
Tabela 7 – Score e magnitudes de lordose apresentadas pela prole feminina na avaliação do comportamento sexual após o DPN 90 dos diferentes grupos experimentais	37
Tabela 8 – Análise do comportamento materno com perturbação das ratas expostas ao paracetamol dos diferentes grupos experimentais	38
Tabela 9 – Parâmetros de fertilidade avaliados nas ratas dos diferentes grupos experimentais	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
COX	Cicloxigenase
CTRG	Controle Gestacional
CTRGL	Controle Gestacional-Lactacional
DAG	Distancia anogenital
DG	Dias Gestacional
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença
DPN	Dia Pós Natal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
LD	Dia Lactacional
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
OTC	<i>Over-The-Counter</i> (Medicamento de venda livre)
PAR	Paracetamol
PARG	Paracetamol Gestacional
PARGL	Paracetamol Gestacional-Lactacional
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	ANIMAIS E TRATAMENTO	18
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
3.3	PARÂMETROS ANALISADOS NAS MÃES TRATADAS.....	21
3.3.1	Avaliação do Comportamento Materno	20
3.4	PARÂMETROS AVALIADOS NA PROLE FEMININA.....	20
3.4.1	Peso Corporal, DAG e Análise dos Órgãos Reprodutivos	21
3.4.2	Instalação da Puberdade	21
3.4.3	Análise do Ciclo Estral (DPN 75 ao 90)	21
3.4.4	Dosagem de Estradiol Plasmático e Análise dos Órgãos Reprodutivos.....	22
3.4.5	Análise do Comportamento Sexual	23
3.4.6	Análise do Comportamento Materno com Perturbação	24
3.4.7	Fertilidade	25
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	25
4	RESULTADOS	26
4.1	PARÂMETROS ANALISADOS NAS MÃES TRATADAS.....	26
4.1.1	Peso Corporal e Observações Clínicas	26
4.1.2	Avaliação do Comportamento Materno	28
4.1.3	Avaliação do Peso dos Órgãos.....	29
4.2	PARÂMETROS ANALISADOS NA PROLE FEMININA.....	30
4.2.1	Peso Corporal, DAG e Órgãos Reprodutivos no DPN 21	30
4.2.2	Instalação da Puberdade e Ganho de Peso do DPN 21 ao 90.....	32
4.2.3	Análise do Ciclo Estral.....	33

4.2.4	DAG, Peso Corporal, Dosagem de Estradiol e Análise dos Órgãos Reprodutivos no DPN 90	34
4.2.5	Avaliação do Comportamento Sexual.....	36
4.2.6	Avaliação do Comportamento Materno com Perturbação e Análise da Fertilidade	37
5	DISCUSSÃO	40
5.1	TOXICIDADE MATERNA.....	40
5.2	PARÂMETROS AVALIADOS NA PROLE FEMININA.....	42
6	CONCLUSÕES	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXOS	55
	ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	56

1 INTRODUÇÃO

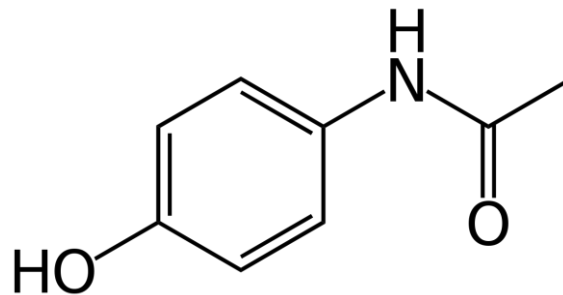
A utilização de medicamentos por gestantes é um assunto constantemente debatido pela comunidade científica. Devido à ausência de ensaios clínicos controlados randomizados para orientá-las sobre a segurança do uso desses medicamentos durante a gestação, a prescrição é geralmente realizada levando em consideração o fator risco-benefício, e frequentemente, tanto durante a lactação como na gestação, são administrados medicamentos visando aliviar sintomas que não necessariamente exigem terapia farmacológica (SERVEY; CHANG, 2014). Um estudo mostrou que a prescrição de medicamentos durante o primeiro trimestre da gestação, considerado um período de maior risco, aumentou em 60% nas últimas décadas (MITCHELL et al., 2011). Além disso, estima-se que 81-94% das mulheres utilizam algum medicamento durante a gestação (LUPATTELLI et al., 2014; MITCHELL et al., 2011).

Uma pesquisa realizada em países da Europa, Austrália e América mostrou que 67% dos medicamentos utilizados na gestação são de venda livre (*over the counter* - OTC), sendo que o paracetamol (PAR), também conhecido como acetaminofeno, um popular antipirético e analgésico, representa 48-70% dos OTC utilizados por gestantes, sendo considerado o fármaco mais utilizado por esse público (LUPATTELLI et al., 2014; MELO et al., 2009; WERLER; MITCHELL; HERNANDEZ-DIAZ, 2005). No Brasil, um estudo realizado na cidade de Bandeirantes, no estado do Paraná, mostrou que 43% das gestantes usuárias do Sistema Único de Saúde fizeram uso do PAR durante a gestação (MELO et al., 2009).

Desde 2010, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução n.º 60, de 17 de dezembro do mesmo ano, adotou a classificação de fator de risco desenvolvido pela *Food and Drug Administration* (FDA) no qual os fármacos são divididos em cinco categorias de acordo com o risco de causar danos ao feto durante a gestação, baseando-se em estudos em humanos ou animais (Brasil, 2010). O PAR encontra-se na categoria B de risco na gestação, que segundo a FDA, são aqueles medicamentos nos quais existem estudos realizados em animais que apresentaram ou não risco ao feto, porém, estes não foram confirmados em estudos controlados em mulheres grávidas (BLACK; HILL, 2003).

O PAR é um composto sintético (Figura 1) introduzido no mercado farmacêutico em 1955, pela *McNeil Laboratories* como fármaco analgésico e antipirético infantil. Atualmente está presente em várias formulações, tanto sozinho como em combinação com outras substâncias, sendo considerado fármaco de escolha para crianças, gestantes, lactantes e indivíduos que não podem ser tratados com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (JOZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014). O PAR possui baixa ligação às proteínas plasmáticas (<25%), sendo rapidamente distribuído pelo organismo, e o pico na concentração plasmática acontece entre 30 e 60min. Os efeitos analgésicos ocorrem em aproximadamente 30 minutos e a meia vida deste fármaco é de 1,5 a 2,5 horas (AMINOSHARIAE; KHAN, 2015). A dose terapêutica utilizada em humanos, incluindo gestantes, é de aproximadamente 1g por dia (NITSCHKE et al., 2015, 2017).

Figura 1. Formula química estrutural do paracetamol.



Fonte: Google Imagens

O mecanismo de ação do PAR ainda não é completamente compreendido, contudo, esse fármaco é conhecido principalmente por promover a diminuição da síntese de prostaglandinas (PGs) por meio da inibição das enzimas cicloxigenase (COX). Acredita-se que exerça efeito mais acentuado no sistema nervoso central devido maior afinidade a enzima COX-3, uma covariante da COX-1 presente no cérebro, medula espinhal e coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Embora apresente características semelhantes aos AINEs, o PAR possui baixa atividade anti-inflamatória, uma vez que inibe a síntese de PGs apenas em baixas concentrações de ácido araquidônico e, quando a taxa de síntese de PGs

é reduzida (GG, GRAHAM; KF, 2005). Sugere-se também que o PAR exerça seus efeitos por meio dos seguintes mecanismos: a) modulação da atividade das fibras serotoninérgicas descendentes; b) modulação da liberação de neurotransmissores endógenos; c) como pró-droga, agindo pelo seu metabólito N-araquidonoilfenolamina, AM404, que atua sobre o sistema canabinoide promovendo analgesia e queda da temperatura corporal (AMINOSHARIAE; KHAN, 2015; ANDERSON, 2008; BERTOLINI et al., 2006; JOZWIAK-BEBENISTA; NOWAK, 2014).

Atualmente, o PAR é o medicamento de primeira escolha para tratamento de dor e febre em gestantes, principalmente por apresentar uma baixa indução de reações adversas como urticária, anafilaxia e angioedema quando comparado a outros analgésicos como a aspirina (BEAULAC-BAILLARGEON; ROCHELEAU, 1994; LOPES; MATHEUS, 2012). Contudo, o PAR atravessa livremente a membrana placentária (BYER; SEMMER, 1982), e um estudo em humanos mostrou que cerca de 2% da dose administrada na mãe é transferida para o bebê pelo leite materno (NOTARIANNI; OLDHAM; BENNETT, 1987). Sendo assim, o feto pode ficar exposto ao PAR durante estágios importantes do desenvolvimento (gestação e lactação).

Estudos epidemiológicos têm correlacionado a exposição materna ao PAR com o desenvolvimento de malformação reprodutiva congênita em neonatos que podem, possivelmente, resultar em comprometimento da fertilidade na vida adulta. Os relatos apontam principalmente para complicações relacionadas ao sexo masculino, como por exemplo, a não descida dos testículos da região abdominal para o escroto (criptorquidismo) (JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011a; SNIJDER et al., 2012), uma malformação considerada o principal fator para subsequente baixa qualidade espermática e câncer testicular (VIRTANEN; TOPPARI, 2008). Também existem relatos de diminuição na distância anogential (DAG), tanto em bebês do sexo masculino (LIND et al., 2017) como na prole masculina de ratos (HOLM et al., 2015; KRISTENSEN et al., 2011b). A DAG, além de ser usada para determinação sexual em roedores, é também utilizada para avaliar toxicidade reprodutiva (GALLAVAN et al., 1999). Além disso, estudos em roedores tem demonstrado que o PAR é capaz de alterar o desenvolvimento dos testículos e diminuir a produção de testosterona (DRIESCHE, VAN DEN et al., 2015; KRISTENSEN et al., 2011b).

Em se tratando de fêmeas, sabe-se que as gônadas femininas expressam enzimas COX e receptores de PGs, e estas moléculas atuam sobre processos importantes como a implantação, ovulação e o desenvolvimento das células germinativas fetais, onde regulam, via sinalização parácrina, a expressão de genes responsáveis pela maturação e sobrevivência dos oócitos (BAYNE et al., 2009). Um estudo mostrou que a exposição *in utero* ao PAR promoveu diminuição na DAG em camundongos fêmeas (HOLM et al., 2016). Além disso, essa exposição promoveu uma diminuição no número de células ovarianas e consequente redução da reserva folicular na prole feminina de ratas (DEAN et al., 2016; JOHANSSON et al., 2016) e camundongos (HOLM et al., 2016).

Observa-se um constante aumento no número de estudos relacionados à teoria das “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença” (DOHaD), esta, visa esclarecimento da influência de eventos adversos ocorridos durante fases precoces do desenvolvimento sobre o padrão de saúde e doença ao longo da vida de um indivíduo (SILVEIRA et al., 2007). Comumente, os estudos que relacionam DOHaD aos parâmetros reprodutivos abordam a exposição intrauterina a agentes químicos considerados desreguladores hormonais, principalmente devido à relevância dos hormônios sexuais durante esse período.

Estudos têm demonstrado que analgésicos popularmente utilizados como dipirona (TAPIAS et al., 2018), aspirina, ibuprofeno e PAR podem atuar como desreguladores hormonais (KRISTENSEN et al., 2016). A Organização Mundial da Saúde define como desregulador hormonal, substâncias exógenas que podem interferir sobre uma ou mais funções do sistema endócrino (UNEP; WHO, 2013). O PAR por sua vez, além de comprometer as concentrações de testosterona como citado anteriormente, também promove alterações nas concentrações de estradiol tanto *in vitro* (FENT; ESCHER; CAMINADA, 2006) como também em camundongos fêmeas imaturas (PATEL; ROSENGREN, 2001) e mulheres que fizeram o uso desse fármaco juntamente com pílulas anticoncepcionais (ROGERS et al., 1987a), sugerindo que o mesmo seja um desregulador hormonal em potencial.

Em resumo, a literatura mostra que o PAR é capaz de promover alterações sobre o sistema reprodutor feminino, no entanto, nota-se uma escassez de estudos que considerem as consequências do tratamento materno com PAR durante a gestação e lactação sobre o desenvolvimento sexual da prole feminina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o tratamento materno com PAR durante o período gestacional e gestacional-lactacional pode comprometer o desenvolvimento reprodutivo da prole feminina de ratas Wistar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade materna: peso corporal, comportamento materno, peso dos órgãos reprodutivos e sinais clínicos;
- Avaliar desenvolvimento sexual da prole feminina: DAG, peso dos órgãos reprodutivos, abertura vaginal e primeiro estro;
- Avaliar o comportamento reprodutivo da prole feminina: comportamento sexual e comportamento materno;
- Avaliar a fertilidade da prole feminina: ciclicidade do estro, dosagem hormonal e desempenho reprodutivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E TRATAMENTO

Ratos e ratas Wistar adultos virgens (75 dias), provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foram alocados em caixas de polipropileno (29 × 18 × 13 cm) com serragem de madeira seca (maravalha) e mantidos no Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL sob condições padronizadas (temperatura de 21 ± 2 °C; ciclo claro/escuro de 12h – as luzes eram acesas as 6:00 A.M) e com água e ração padrão (Nuvilab™, Quimtia SA, Brasil) sempre disponíveis.

Ao final da tarde, duas ratas foram colocadas em uma gaiola com um rato durante a noite, e na manhã do dia seguinte a prenhez foi diagnosticada por esfregaço vaginal. A presença de espermatozoides indicou prenhez positiva. Nesse dia, denominado dia gestacional (DG) 0, as ratas foram separadas em caixas individuais e distribuídas em 4 grupos experimentais (n= 10 – 12 animais/grupo) da seguinte forma:

- Grupo Controle Gestacional (CTRG): Receberam água de torneira, via gavagem, diariamente do DG 6 ao DG 21 (nascimento da prole);
- Grupo Paracetamol Gestacional (PARG): Receberam paracetamol na dose de 350mg/kg/dia, via gavagem, diariamente do DG 6 ao DG 21;
- Grupo Controle Gestacional-Lactacional (CTRGL): Receberam água de torneira, via gavagem, diariamente do DG 6 ao Dia Lactacional (DL) 21 (desmame);
- Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional (PARGL): Receberam paracetamol, via gavagem, na dose de 350mg/kg/dia diariamente do DG 6 ao DL 21.

As ratas prenhes foram tratadas diariamente das 12:00 às 14:00h. A dose de 350 mg/kg/dia foi preparada a partir de um comprimido de Tylenol® 750 mg (Johnson & Johnson, Brasil) dissolvido em 2,5 ml de água de torneira. A dose foi escolhida com base em um estudo conduzido por Kristensen e colaboradores (2011)

que descreve repercussões tardias na prole de ratos expostos ao PAR (KRISTENSEN et al., 2011a). Além disso, o início do tratamento (DG 6) foi estabelecido considerando as recomendações do Guideline 426 do OECD - Developmental Neurotoxicity Study (OECD, 2007), que preconiza o início do tratamento no período pós-implantacional (em ratos representa o DG 6), uma vez que substâncias que interferem na produção de prostaglandinas, como o PAR, podem comprometer o estágio de implantação (GUPTA et al., 1981).

As fêmeas foram pesadas a cada três dias para ajuste do volume de administração e acompanhamento do peso durante a gestação, sendo o dia de nascimento dos filhotes denominado Dia Pós-Natal (DPN) 0. Os filhotes foram contados e o sexo foi identificado no DPN 1. No DPN 4, as ninhadas foram reduzidas para 10 animais (5 machos e 5 fêmeas, quando possível) visando que a exposição ao PAR fosse homogênea entre a ninhada.

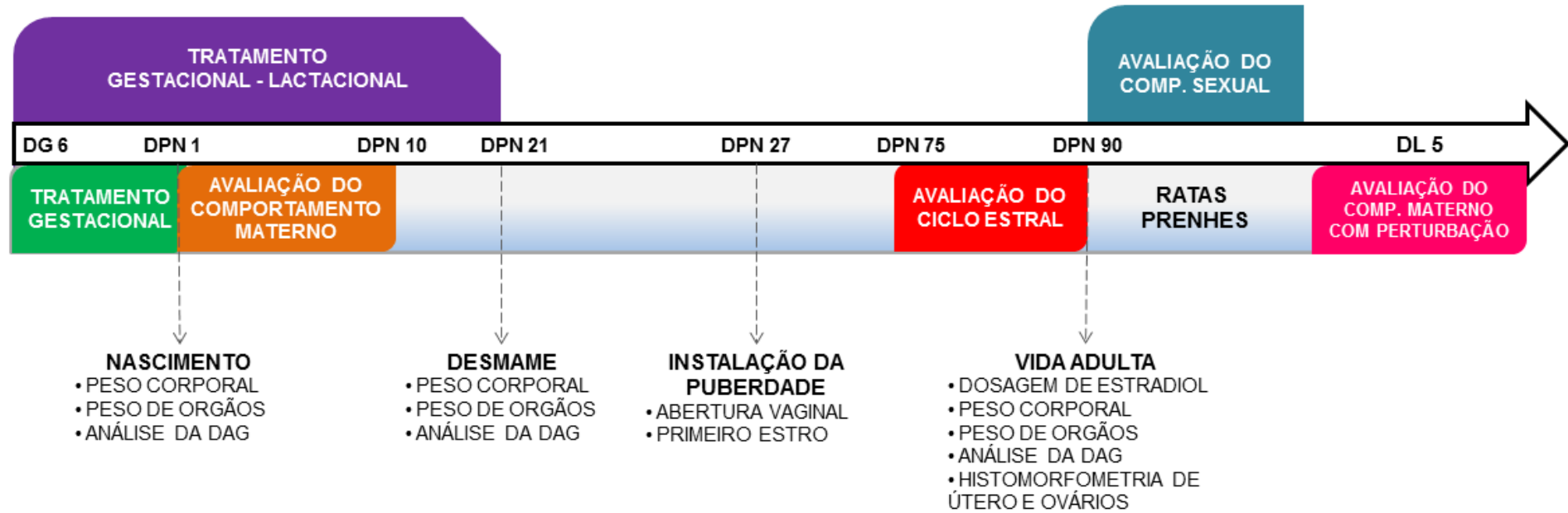
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os procedimentos em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UEL (CEUA/UEL: nº80/2017, Anexo A) e elaborados e desenvolvidos com base no princípio dos três R's (Refinar, Reduzir e Redesenhar). O protocolo experimental está esquematizado na figura 2.

Para cada avaliação relacionada prevista (item 3.4) foi utilizada apenas um filhote fêmea de cada ninhada, evitando assim o “efeito ninhada” (homogeneidade genética ou variabilidade materna), portanto, a ninhada foi a unidade experimental.

Os filhotes remanescentes foram utilizados em outros estudos do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL.

Figura 2. Delineamento experimental.



DG: Dia Gestacional; DPN: Dia pós Natal; DL: Dia Lactacional; DAG: Distância anogenital.

3.3 PARÂMETROS ANALISADOS NAS MÃES TRATADAS

O peso corporal materno foi mensurado a cada três dias durante o DG 6 até o desmame em todos os grupos experimentais para avaliação do ganho de peso e ajuste da dose a ser administrada. Além disso, o estado de saúde do animal e sinais clínicos como lacrimação, piloereção, padrão respiratório e tremores foram verificados diariamente visando monitorar a toxicidade do tratamento. No desmame, essas ratas foram eutanasiadas por decapitação e os órgãos reprodutivos (útero e ovários) foram coletados e pesados.

3.3.1 Avaliação do Comportamento Materno

A análise do comportamento materno ocorreu após o nascimento dos filhotes, entre o DL 1 ao 10, seguindo a metodologia adaptada de Reis et al. (2014). Quatro sessões de observação de 72 minutos foram realizadas. As sessões ocorreram em horários regulares, com três períodos durante a fase clara (10:00, 13:00 e 16:00h) e um período durante a fase escura (19:00h, uma hora após as luzes se apagarem). Dentro de cada sessão, o comportamento da mãe no momento específico foi anotado a cada 3 minutos, resultando em 25 observações por sessão, em quatro períodos por dia, resultando em 100 observações por dia. Apenas um comportamento foi registrado em cada observação. Os dados foram expressos como porcentagem do número de observações de cada comportamento materno alvo avaliado durante os 10 dias de observação (o número total de eventos foi de 1000). Os comportamentos analisados foram os seguintes: (a) limpeza de qualquer filhote (lamber a superfície do corpo e/ou região anogenital), (b) construção do ninho, (c) fora do ninho e (d) amamentar os filhotes (em posição arqueada, ou postura passiva, em que a mãe está deitada de costas ou de lado enquanto os filhotes fazem a sucção do leite). Uma descrição detalhada dos comportamentos é fornecida em Champagne et al. (2003).

3.4 PARÂMETROS ANALISADOS NA PROLE FEMININA

No dia do desmame (DPN 21), três filhotes fêmeas de cada ninhada foram selecionadas para avaliações em idades diferentes. A primeira foi eutanasiada no DPN 21 para análise do peso dos órgãos reprodutivos. A segunda fêmea foi

alocada para avaliação de parâmetros reprodutivos não comportamentais (instalação da puberdade, ciclo estral, coleta de órgãos e quantificação de estradiol no DPN 90), a terceira foi submetida aos parâmetros comportamentais (comportamento sexual, materno e análise da fertilidade).

3.4.1 Peso Corporal, DAG e Análise dos Órgãos Reprodutivos

Imediatamente após o nascimento e a cada três dias o peso corporal dos animais foi determinado e a DAG foram mensurados no DPN 1 e 21. A DAG relativa foi calculada através da divisão da DAG pela raiz cúbica do peso do animal (GALLAVAN et al., 1999). Além disso, no DPN 21, uma fêmea por ninhada foi eutanasiada por decapitação e os órgãos reprodutivos (útero e ovários) foram coletados e pesados.

3.4.2 Instalação da Puberdade

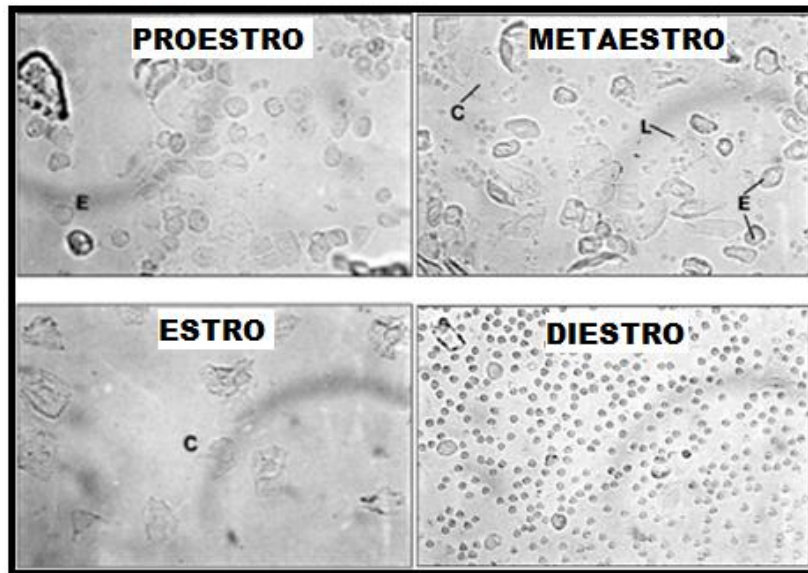
Para avaliar a instalação da puberdade, as ratas foram avaliadas diariamente a partir do DPN 27. O dia em que ocorreu a abertura vaginal foi anotado. A partir desse dia, foi realizada, sempre no período da manhã, a coleta de material vaginal para verificar o dia do primeiro estro da rata conforme metodologia descrita no item 3.4.3.

3.4.3 Análise do Ciclo Estral (DPN 75 Ao 90)

A partir do DPN 75, os esfregaços vaginais foram realizados diariamente entre às 8:00 e 10:00h, durante um período de 15 dias. Foram coletadas células da mucosa vaginal com auxílio de hastes flexíveis com ponta de algodão, previamente embebidas em solução fisiológica. O material foi espalhado numa lâmina, umedecido com uma gota de salina e observado ao microscópio de luz para identificação da fase do ciclo estral, estas, classificadas como proestro, estro, metaestro e diestro (Figura 3) (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002). Os coeficientes de proestro (C_p), estro (C_e) e metaestro/diestro (C_{md}) foram determinados pela fórmula $C = a/b \times 100\%$, onde C = coeficiente do ciclo correspondente, a = duração em dias do ciclo correspondente dentro do período de observação, e b = duração média do ciclo estral (em dias) (CHISTYAKOV et al.,

2012). A duração do ciclo estral foi calculada como o número de dias entre uma fase de proestro e a seguinte.

Figura 3. Fases do ciclo estral observadas em microscopia de luz



Fonte: Adaptada de MARCONDES; BIANCHI & TANNO, 2002.

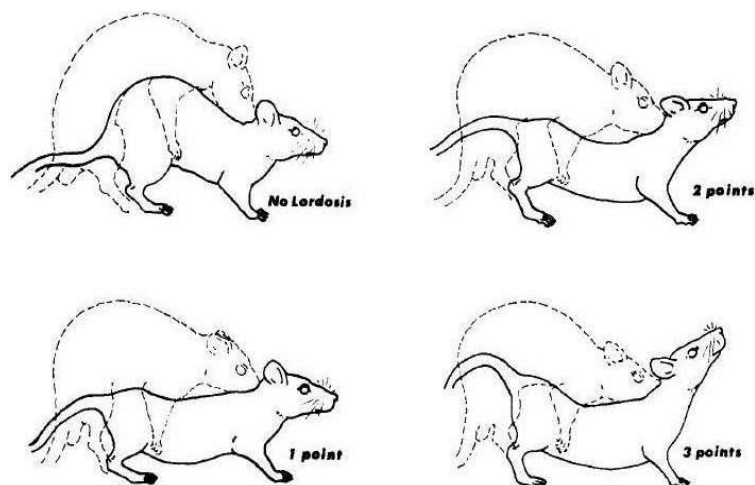
3.4.4 Dosagem de Estradiol Plasmático e Análise dos Órgãos Reprodutivos

Após a análise do ciclo estral, na tarde do proestro, as fêmeas foram pesadas e a DAG foi mensurada. Essas ratas foram então eutanasiadas por decapitação e a laparotomia foi realizada. Amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo heparina. Imediatamente após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (3000 rpm por 20 min a 2°C) e o plasma foi congelado. A concentração plasmática de estradiol foi mensurada por radioensaio com partículas quimioluminescentes, utilizando o kit 7K72-Architect-estradiol™ (Abbott Laboratories) de acordo com as instruções do fabricante. As sensibilidades analítica e funcional foram de ≤ 10 pg/ml e ≤ 25 pg/ml, respectivamente, considerando um coeficiente de variação menor ou igual a 20%. Na laparotomia, ovários e útero (com líquido) foram coletados, pesados e fixados em solução de Bouin, após a fixação, foram desidratados em etanol e posteriormente incluídos em parafina (Paraplast®). Três secções de 7 μ m separadas por 70 μ m foram obtidas por animal, montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica.

3.4.5 Análise do Comportamento Sexual

Quinze dias antes da análise comportamental, os animais foram transferidos para o biotério com ciclo claro/escuro de 12x12 horas invertido, com controle de luminosidade, ruído e temperatura, para a perfeita adaptação das funções fisiológicas. A partir do DPN 90, foram coletadas células da mucosa vaginal 3 a 4 horas antes do início dos testes. Foram utilizadas as fêmeas na fase de proestro e machos sexualmente experientes. O comportamento sexual feminino foi registrado sob luz vermelha por uma câmera de vídeo, ligada a um monitor em uma sala adjacente. Inicialmente, um rato macho foi colocado na gaiola de observação (caixa de acrílico), onde permaneceu por 10 min para adaptação. Em seguida, foi introduzida na mesma caixa a fêmea a ser analisada e o teste durou até que 10 montas tenham sido observadas (RAMIREZ; CARRER; NASELLO, 1979). Foram avaliados o escore de lordose (número total de pontos da lordose/número total de respostas da lordose) (BEACH, 1976) e a frequência de cada magnitude de lordose, pontuada numa escala de 0 a 3 (em que 0 é classificado como ausência de lordose e 3 como lordose máxima) (HARDY; DEBOLD, 1971), conforme mostrado na figura 4.

Figura 4. Representação dos diferentes graus de lordose e pontuação empregada para avaliação do escore de lordose.



Fonte: Hardy; Debold, 1971

Finalizada a avaliação do comportamento sexual, as fêmeas permaneceram com o rato *overnight* para o acasalamento. Na manhã seguinte esse rato foi removido e a prenhez foi confirmada pela amostra vaginal contendo espermatozoides. Uma vez prenhes, as fêmeas foram mantidas em caixas individuais e utilizadas para análise do comportamento materno com perturbação.

3.4.6 Análise do Comportamento Materno com Perturbação

Para investigar os efeitos da exposição ao PAR sobre a motivação materna e interação mãe-filhote, o comportamento materno com perturbação foi realizado no DL 5, com base em Kiss et al. (2012). O DL 5 foi escolhido devido ao pico de cuidado materno que ocorre nesse dia. Todas as análises comportamentais foram realizadas entre as 9:00 e 12:00h.

No dia do teste, a mãe foi removida de sua caixa e o ninho foi destruído (filhotes alocados de forma aleatória na caixa). Após 30 min, a mãe foi colocada novamente à caixa e a interação mãe-filhote é filmada e avaliada por 30 min. Foram avaliados:

- A latência da mãe para recuperar o primeiro filhote;
- Número de vezes em que a mãe recuperou um filhote;
- Tempo gasto pela mãe construindo o ninho;
- Tempo gasto pela mãe limpando/lambendo qualquer filhote;
- Tempo gasto pela mãe amamentando;
- Tempo gasto pela mãe lambendo o próprio corpo (autolimpeza).

O tempo que a mãe não apresentou nenhum dos comportamentos acima foi considerado como tempo "fora do ninho". Os dados estão apresentados em porcentagem de tempo. Os vídeos foram analisados usando o aplicativo *Countee* na plataforma *Android*.

3.4.7 Fertilidade

As ratas que passaram pela análise de comportamento materno tiveram o número de filhotes contados no dia do nascimento. Além disso, no DL 10 elas foram eutanasiadas e a laparotomia foi realizada. Útero e ovários foram retirados e então contados o números de pontos de implantação e de corpos lúteos. O desempenho reprodutivo foi definido pelos seguintes parâmetros:

- Taxa de implantação = $(n^\circ \text{ de implantações} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100$;
- Taxa de perda pré-implantação = $([n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de implantações}] / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100$;
- Taxa de perda pós-implantação = $([n^\circ \text{ de implantações} - n^\circ \text{ de fetos vivos}] / n^\circ \text{ de implantações}) \times 100$;
- Taxa de Viabilidade Fetal = $(n^\circ \text{ de filhotes vivos} / n^\circ \text{ de pontos de implantação}) \times 100$.
- Número de filhotes por ninhada.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória para avaliar a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade de variância (teste de Levene) dos dados. Os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância ($p > 0.05$) foram analisados pelo teste-*t* de Student e apresentadas como média \pm erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, os dados foram transformados para atingir os critérios de análise paramétrica. Caso essas variáveis ainda não fossem normais e homogêneas, esses dados foram então analisados a partir do teste de Mann-Whitney e apresentados como medianas e 1º e 3º quartis.

Para ganho de peso corporal e avaliação do comportamento materno, foi realizada uma ANOVA de medidas repetidas (RMANOVA), sendo o dia e o tratamento utilizados como fatores dentro- e entre-sujeitos, respectivamente. A análise de covariância (ANCOVA) foi utilizada para detectar o efeito de cada tratamento no peso dos órgãos reprodutivos, utilizando o peso corporal final como

covariável. As diferentes magnitudes de lordose foram comparadas pelo teste de Fisher.

A fim de detectar possíveis alterações dependentes do período de tratamento, o grupo CTRG foi comparado apenas com o grupo PARG, enquanto CTRGL foi comparado apenas com o grupo PARGL. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

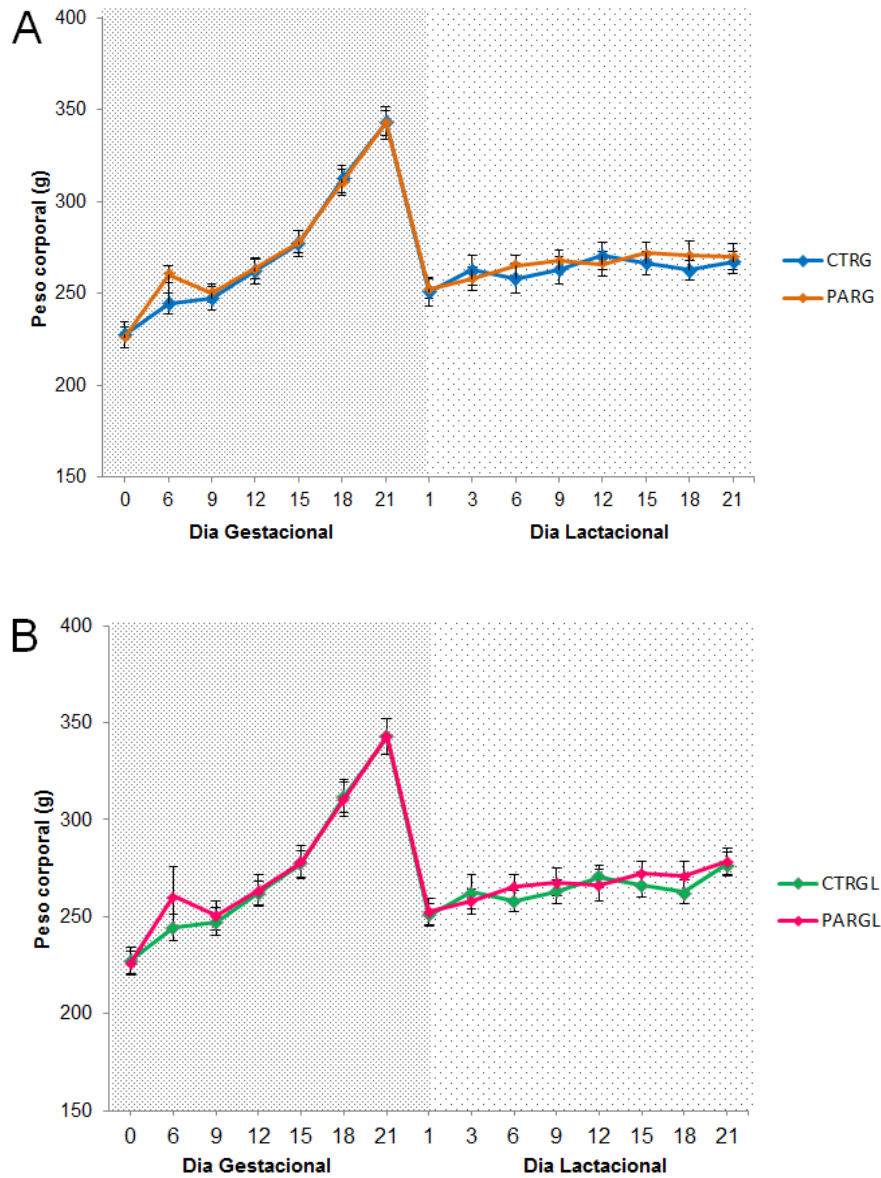
4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS ANALISADOS NAS MÃES TRATADAS

4.1.1 Peso Corporal e Observações Clínicas

O tratamento com PAR durante os períodos gestacional e gestacional-lactacional não influenciaram sobre o ganho de peso corporal das ratas. RMANOVA mostrou que o grupo PARG e PARGL não apresentaram diferenças significativas quando comparados com os grupos CTRG e CTRGL respectivamente (Figura 5). Assim como, nenhum dos grupos experimentais apresentou os sinais visíveis de toxicidade analisados (lacrimação, pilo-ereção, padrão respiratório incomum e tremores).

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

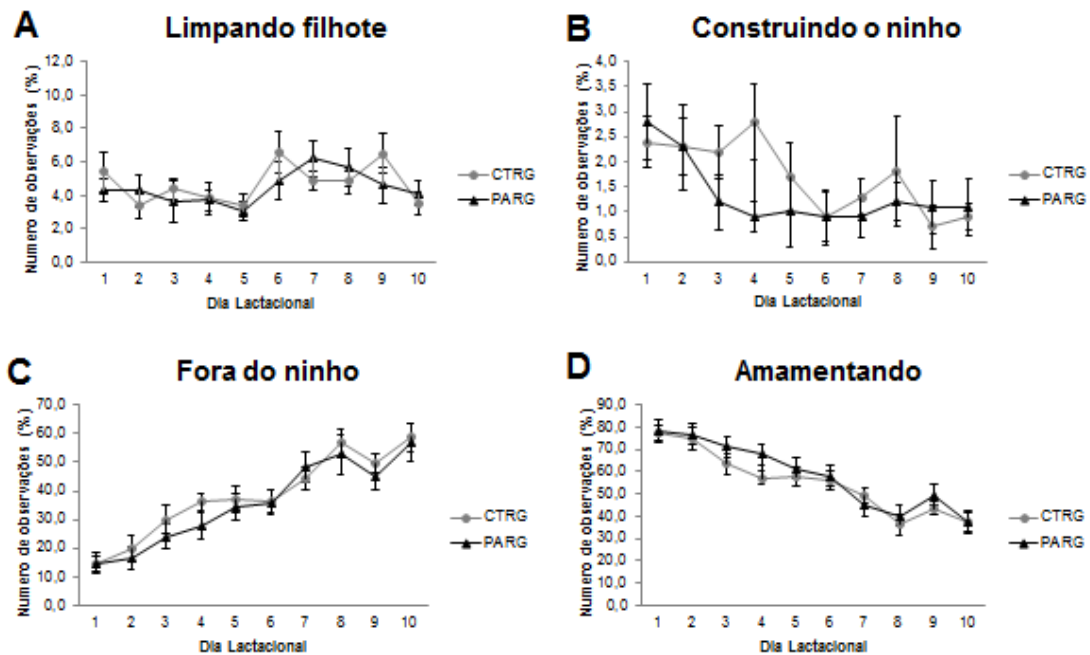


Ratas tratadas durante os períodos gestacional (A) e gestacional-lactacional (B) (n=10/grupo). Os dados estão apresentados como média \pm EPM, $p > 0,05$ (RMANOVA). CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional):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

4.1.2 Avaliação do Comportamento Materno

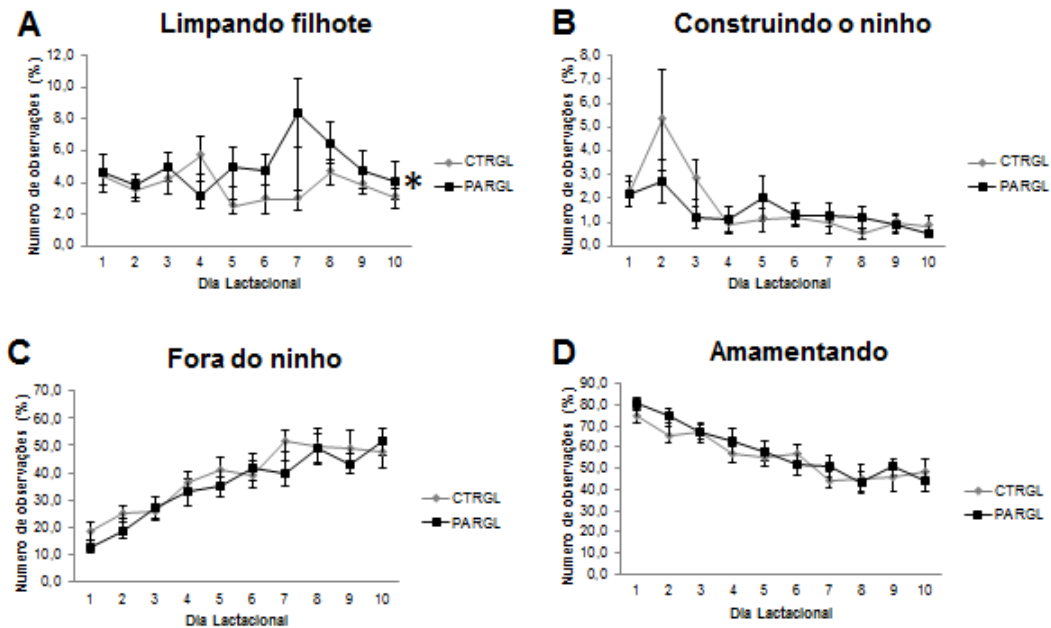
Os resultados do comportamento materno das ratas estão apresentados nas Figuras 6 (tratamento durante o período gestacional) e 7 (tratamento durante o período gestacional-lactacional). Tanto PARG como PARGL não apresentaram alterações no comportamento de amamentar os filhotes, construir o ninho e tempo fora do ninho quando comparados com seus respectivos grupos controle. Com relação ao comportamento de limpeza dos filhotes, as ratas do grupo PARGL apresentaram uma maior frequência do comportamento de lamber/limpar os filhotes em comparação as do grupo CTRLG [$F_{(7,40)} = 3,15, p=0,002$].

Figura 6. Parâmetros analisados no comportamento materno das mães tratadas durante o período gestacional (CTRLG e PARG) do DL 1 ao 10



Comportamento de limpar/lamber os filhotes (A), construção do ninho (B), fora do ninho (C) e amamentando (D), (n=10/grupo). Dados são médias \pm EPM. RMANOVA, $p>0,05$. CTRLG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia.

Figura 7. Parâmetros analisados no comportamento materno das mães tratadas durante o período gestacional-lactacional (CTRGL e PARGL) do DL 1 ao 10



Comportamento de limpar/lamber os filhotes (A), construção do ninho (B), fora do ninho (C) e amamentando (D). (n=10/grupo). Dados são médias \pm EPM. RMANOVA, * $p < 0,05$. CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.1.3 Avaliação do Peso dos Órgãos

Não foram observadas alterações no peso dos órgãos reprodutivos (útero e ovários) das mães dos grupos PARG e PARGL em comparação as ratas dos grupos CTRG e CTRGL respectivamente no DL 21 (Tabela 1):

Tabela 1 – Peso corpóreo e dos órgãos reprodutivos das mães dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Peso final (g)	288,52 ± 7,33	280,58 ± 6,76	273,00 ± 6,17	274,48 ± 5,02
Útero (mg)	318,46 ± 50,63	377,87 ± 37,79	298,09 ± 47,14	291,44 ± 21,32
Ovários (mg)	89,55 ± 8,12	91,76 ± 6,33	75,66 ± 6,90	90,68 ± 9,26

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Peso dos órgãos reprodutivos (ANCOVA) com peso corporal final (g) como covariante. Dados estão apresentados como média ± EPM. $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água, PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2 PARÂMETROS ANALISADOS NA PROLE FEMININA

4.2.1 Peso Corporal, DAG e Órgãos Reprodutivos no DPN 21

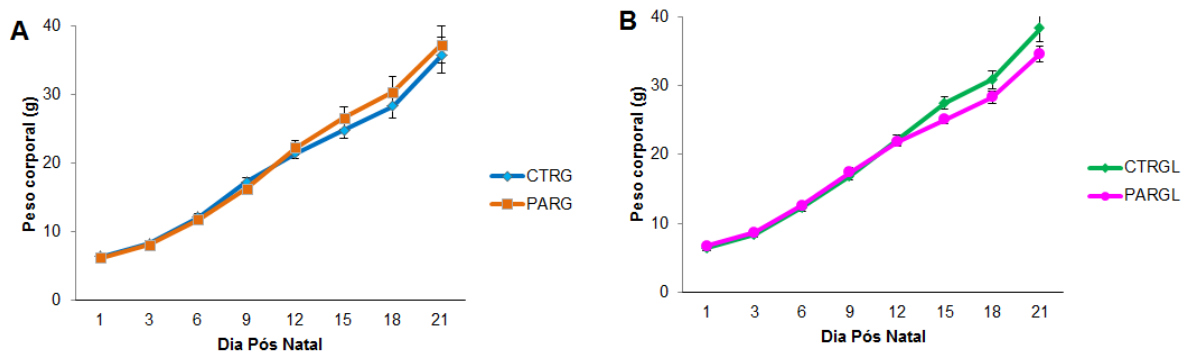
Nos DPN 1 e 21, não houve diferenças significativas no peso corporal e na DAG relativa nos grupos PARG e PARGL quando comparados aos seus respectivos grupos controle (Tabela 2). Além disso, a exposição ao PAR não alterou o ganho de peso corporal da prole feminina entre o DPN 1 e 21 (Figura 8).

Tabela 2 – Peso corporal e DAG relativa nos DPNs 1 e 21 e peso dos órgãos reprodutivos no DPN 21 da prole feminina dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
<i>Dia pós-natal 1</i>				
Peso corporal (g)	6,37 ± 0,22	6,21 ± 0,25	6,44 ± 0,31	6,76 ± 0,21
DAG Relativa (mm/g ^{1/3})	0,87 ± 0,04	0,92 ± 0,03	0,92 ± 0,04	0,94 ± 0,04
<i>Dia pós-natal 21</i>				
Peso corporal (g)	35,66 ± 2,62	37,19 ± 2,70	38,27 ± 1,95	34,60 ± 1,20
DAG Relativa (mm/g ^{1/3})	2,26 ± 0,10	2,22 ± 0,04	2,12 ± 0,07	2,26 ± 0,08
Útero (mg)	21,8 ± 1,39	20,4 ± 1,12	19,9 ± 0,70	19,0 ± 1,47
Ovários (mg)	15,8 ± 0,98	14,1 ± 1,35	15,7 ± 2,00	14,6 ± 1,93

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Peso corporal e DAG relativa (teste-*t* de Student); Os dados relativos ao peso dos órgãos reprodutores (ANCOVA) com peso corporal final (g) como covariante estão apresentados como médias ± EPM. $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

Figura 8 – Acompanhamento de peso corporal médio da ninhada da prole feminina do DPN 1 ao 21 dos diferentes grupos experimentais



Prole feminina exposta ao PAR durante o período intrauterino (DG 6 até o nascimento) (A) e períodos intrauterino e lactacional (DG 6 até o desmame) (B). (n=10/grupo) Os dados são apresentados como média ± EPM, RMANOVA, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2.2 Instalação da Puberdade e Ganho de Peso do DPN 21 ao 90

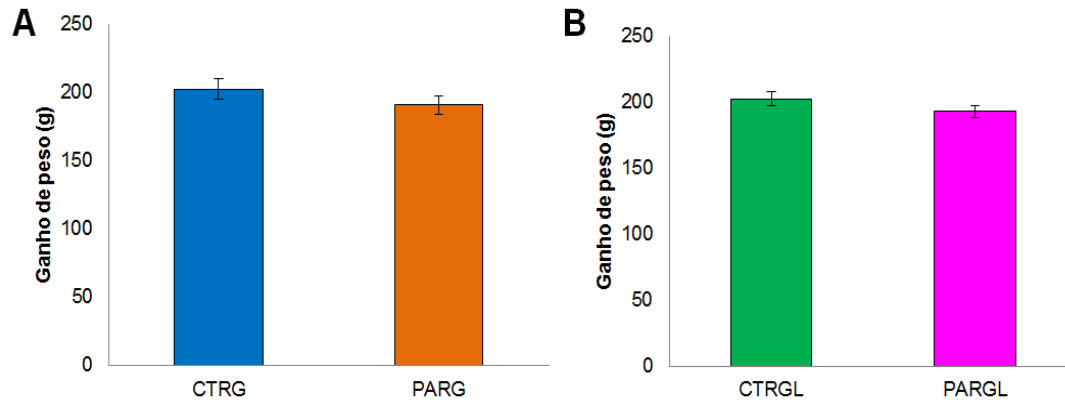
A exposição ao PAR durante o período gestacional e gestacional-lactacional não alterou a idade (dia) da abertura vaginal e primeiro estro, bem como a DAG relativa da prole (Tabela 3) no dia do primeiro estro. Além disso, não houve diferença significativa no ganho de peso corporal do DPN 21 ao 90 (Figura 9) entre os grupos CTRG/PARG ou CTRGL/PARGL.

Tabela 3 – Instalação da puberdade da prole feminina dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Abertura vaginal (dia)	32,40 ± 0,50	33,40 ± 0,54	33,10 ± 0,72	33,80 ± 0,59
Primeiro estro (dia)	32,40 ± 0,50	33,90 ± 0,54	33,20 ± 0,71	33,90 ± 0,57
DAG Relativa no primeiro estro (mm/g ^{1/3})	2,45 ± 0,04	2,44 ± 0,06	2,55 ± 0,05	2,42 ± 0,05

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Dados são médias ± EPM. Teste-*t* de Student, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

Figura 9 – Ganho de peso da prole feminina entre o DPN 21 e 90 dos diferentes grupos experimentais



Fêmeas expostas ao PAR durante o período intrauterino (A) e períodos intrauterino e lactacional (B). (n=10/grupo). Os dados são apresentados como média \pm EPM, teste-*t* de Student, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2.3 Análise do Ciclo Estral

Os resultados da avaliação do ciclo estral estão apresentados na Tabela 4, o teste de Mann-Whitney não mostrou diferenças significativas para nenhum dos parâmetros avaliados nos grupos PARG e PARGL.

Tabela 4 – Coeficientes das diferentes fases e duração do ciclo estral da prole feminina dos diferentes grupos experimentais (DPN 75-90)

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Coeficiente de estro (Ce)	26,67 (20,00–26,67)	26,67 (20,00–26,67)	26,67 (26,67-26,67)	26,67 (20,00-26,67)
Coeficiente de meta/diestro Cmd)	53,33 (46,67-53,33)	53,33 (46,67-60,00)	46,67 (46,67-53,33)	50,00 (46,67-55,00)
Coeficiente de proestro (Cp)	23,34 (20,00-26,67)	20,00 (20,00-26,67)	26,67 (20,00-26,67)	23,34 (20,00-26,67)
Duração do ciclo estral (dias)	4,36 (3,75-5,00)	5,00 (3,75-5,00)	3,75 (3,75-5,00)	4,38 (3,75-5,00)

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Os dados são medianas (1º e 3º quartis), teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2.4 DAG, Peso Corporal, Dosagem de Estradiol e Análise dos Órgãos Reprodutivos no DPN 90

No DPN 90, a DAG relativa, peso corporal, e peso dos órgãos reprodutivos não foram influenciados pela exposição gestacional e gestacional-lactacional ao PAR. Contudo, o teste-*t* de Student mostrou um aumento significativo na concentração plasmática de estradiol no grupo PARG em comparação ao CTRG [$t(18) = 2,58$, $p = 0,019$]. Os dados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – DAG relativa, dosagem de estradiol, peso corporal e dos órgãos reprodutivos da prole feminina no DPN 90 dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [10]	PARG [10]	CTRGL [10]	PARGL [10]
Peso corporal final (g)	241,16 ± 6,60	236,25 ± 4,95	242,71 ± 6,46	231,58 ± 2,95
DAG relativa (mm/g ^{1/3})	2,63 ± 0,04	2,57 ± 0,03	2,64 ± 0,03	2,57 ± 0,04
Útero (mg)	528,80 ± 60,48	693,32 ± 66,55	566,74 ± 51,21	593,97 ± 69,07
Ovários (mg)	72,9 ± 3,84	77,6 ± 3,73	75,99 ± 3,15	69,01 ± 2,47
Estradiol (pg/ml)	67,50 ± 4,01	82,30 ± 4,09*	75,80 ± 8,03	76,20 ± 5,11

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Valores expressos em média ± EPM (test-*t* de Student). CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

A análise histológica do útero não revelou alterações relacionadas à exposição ao PAR. No entanto, houve uma diminuição significativa no número de folículos primordiais em ambos os grupos PARG [t(14)= 2,38, p=0,032] e PARGL [t(14)= 2,73, p=0,016] quando comparados com CTRG e CTRGL, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise histomorfométrica do útero, contagem de corpos lúteos e folículos ovarianos da prole feminina no DPN 90 dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [8]	PARG [8]	CTRGL [8]	PARGL [8]
<i>Medidas analisadas no útero (μm)</i>				
Perimétrio	9,36 \pm 0,49	10,44 \pm 0,79	8,47 (8,15-8,81)	8,22 (7,85-9,14)
Estroma endometrial	478,06 \pm 38,28	426,25 \pm 74,01	496,15 \pm 25,62	417,36 \pm 27,69
Miométrio	240,08 \pm 10,67	268,48 \pm 25,72	297,60 \pm 18,36	254,60 \pm 16,85
Epitélio Luminal	18,84 \pm 0,82	15,86 \pm 1,29	17,66 \pm 0,73	16,17 \pm 1,20
<i>Contagem de células nos ovários</i>				
Corpos lúteos	4,83 \pm 0,63	6,34 \pm 0,34	5,50 \pm 0,64	5,55 \pm 0,68
Folículos antrais	3,35 \pm 0,42	4,41 \pm 0,90	3,09 \pm 0,48	4,09 \pm 0,53
Folículos em crescimento	7,75 \pm 0,57	7,84 \pm 0,79	6,28 \pm 0,42	7,34 \pm 1,30
Folículos primários	13,25 \pm 0,67	11,25 \pm 0,51*	13,79 \pm 0,52	11,34 \pm 0,73*

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Valores expressos em média \pm EPM (test-*t* de Student), * $p < 0,05$. Os dados de perímetro dos grupos CTRGL e PARGL são medianas (1º e 3º quartis), teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2.5 Avaliação do Comportamento Sexual

Em relação ao comportamento sexual, os grupos PARG e PARGL não apresentaram diferenças significativas no escore de lordose quando comparados com os respectivos grupos controle. Além disso, não houve diferenças nas diferentes magnitudes da lordose expressas entre os grupos CTRG e PARG. No entanto, as ratas do grupo PARGL apresentaram com maior frequência lordoses de magnitude 1 e 2, o que correspondeu a uma menor expressão da lordose de magnitude 3 em comparação as ratas do grupo CTRGL (Tabela 7).

Tabela 7 – Score e magnitudes de lordose apresentadas pela prole feminina na avaliação do comportamento sexual após o DPN 90 dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [12]	PARG [12]	CTRGL [9]	PARGL [9]
Escore de Lordose	2,70 (2,23-2,98)	2,65 (2,03-2,90)	2,59 ± 0,18	2,09 ± 0,18
<i>Lordoses</i>				
Magnitude 0	0%(0/120)	1,67%(2/120)	1,11%(1/90)	0% (0/90)
Magnitude 1	11,67%(14/120)	10%(12/120)	12,22%(11/90)	25,56%(23/90)*
Magnitude 2	27,70%(33/120)	30,0%(36/120)	13,3%(12/90)	40% (36/90)*
Magnitude 3	60,8% (73/120)	58,3%(70/120)	73,3%(66/90)	34,4%(31/90)*

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Os dados do escore de lordose CTRGL e PARGL são médias ± EPM. Teste-*t* de Student, $p > 0,05$; Valores de magnitudes de lordoses estão expressos em porcentagem, números entre parênteses mostram o número de observações em cada magnitude de lordose/total de observações, teste de Fisher, $*p < 0,05$; CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

4.2.6 Avaliação do Comportamento Materno com Perturbação e Análise da Fertilidade

Exposição ao PAR durante os períodos intrauterino e intrauterino-lactacional não alterou significativamente os parâmetros avaliados no teste de comportamento materno com perturbação das ratas quando adultas (Tabela 8). Além disso, o teste de Mann-Whitney não mostrou alterações na análise de fertilidade das mesmas.

Tabela 8 – Análise do comportamento materno com perturbação das ratas expostas ao paracetamol dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [09]	PARG [09]	CTRGL [08]	PARGL [09]
Latência para recuperar o 1º filhote (s)	195,78 ± 64,04	132,78 ± 58,93	285,00 (29,50-474,80)	33,00 (23,00-142,50)
Recuperar filhote	10,78 ± 1,52	13,67 ± 2,09	11,38 ± 1,67	15,22 ± 2,48
Amamentando (%)	19,40 ± 5,51	26,24 ± 6,08	13,41 ± 5,31	19,64 ± 7,18
Limpando filhote (%)	13,22 ± 1,98	10,52 ± 2,08	11,75 ± 2,49	10,96 ± 2,05
Construindo ninho (%)	4,36 ± 1,33	5,02 ± 1,57	5,93 ± 2,10	4,39 ± 1,48
Autolimpeza (%)	4,66 ± 0,70	4,47 ± 0,69	3,55 ± 0,39	4,99 ± 1,08
Fora do ninho (%)	58,37 ± 4,12	53,74 ± 5,95	65,36 ± 4,76	60,02 ± 7,08

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Dados são médias ± EPM. Teste-*t* de Student, $p > 0,05$; O tempo para recuperar o primeiro filhote (CTRGL/PARGL) são medianas (1º e 3º quartis), teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

Tabela 9 – Parâmetros de fertilidade avaliados nas ratas dos diferentes grupos experimentais

	CTRG [11]	PARG [10]	CTRGL [9]	PARGL [9]
Taxa de Implantação (%)	100,00 (92,86-100,00)	100,000 (93,08-100,00)	100,00 (94,23-100,00)	100,00 (92,45-100,00)
Perda pré-implantacional (%)	0,00 (0,00-7,14)	0,00 (0,00-6,93)	0,00 (0,00-5,77)	0,00 (0,00-7,55)
Perda pós-implantacional (%)	0,00 (0,00-7,69)	0,00 (0,00-8,33)	3,85 (0,00-12,80)	3,57 (0,00-8,90)
Viabilidade Fetal (%)	100,00 (92,31-100,00)	100,00 (91,67-100,00)	96,16 (87,20-100,00)	96,43 (91,10-100,00)
Número de Filhotes	12.27 ± 0.45	11.80 ± 0.49	12.00 (11.25-12.00)	12.00 (11.00-13.00)

Números entre colchetes representam o número de animais/grupo. Os dados são medianas (1º e 3º quartis), teste de Mann-Whitney. $p > 0,05$; Número de filhotes dos grupos CTRG e PARG estão apresentados como médias \pm EPM. Teste t de Student. $p > 0,05$. CTRG (Grupo Controle Gestacional): Água; PARG (Grupo Paracetamol Gestacional): 350mg/kg/dia; CTRGL (Grupo Controle Gestacional-Lactacional): Água; PARGL (Grupo Paracetamol Gestacional-Lactacional): 350mg/kg/dia.

5 DISCUSSÃO

5.1 TOXICIDADE MATERNA

Sabe-se que o padrão de crescimento de um animal ao longo do tratamento é usado como um indicador na investigação de efeitos tóxicos para o organismo (JOHNSON, 1981). No presente estudo, tanto as ratas tratadas como prole feminina não apresentaram alterações no ganho de peso e peso de órgãos. Esses dados corroboram com um estudo onde o tratamento materno com PAR na mesma dose não comprometeu o peso corporal da mães e da prole em camundongos (DRIESCHE, VAN DEN et al., 2015). Além disso, os animais avaliados no presente estudo não apresentaram os sinais clínicos de toxicidade observados (lacrimação, pilo-ereção, padrão respiratório incomum e tremores), sugerindo que a dose administrada seja subtóxica em relação a esses parâmetros.

Em mamíferos, o relacionamento estabelecido entre a mãe e os filhotes é importante para o desenvolvimento físico e psicológico da prole (WALKER et al., 2004). No presente estudo, as ratas tratadas com PAR durante a gestação e lactação (PARGL) apresentaram um aumento do comportamento de limpar/lamber os filhotes.

Sabe-se que os aspectos apetitivos dos comportamentos sexual e materno são controlados na área pré-óptica medial do hipotálamo por ação do estradiol em conjunto com o sistema dopaminérgico (STOLZENBERG; NUMAN, 2011). Os eventos hormonais que ocorrem durante a gestação e o parto promovem uma modulação do sistema de liberação de ocitocina dependente de dopamina no núcleo accumbens (AFONSO et al., 2008), sendo essa via diretamente associada ao controle do comportamento de limpeza dos filhotes (CHAMPAGNE, 2004; SHAHROKH et al., 2010). Champagne e colaboradores propõem que projeções ocitocinérgicas da área pré-óptica medial promovem um aumento na liberação de dopamina na área tegmental ventral, que por sua vez ativa neurônios que se projetam para o núcleo accumbens. Um estudo realizado em ratos mostrou que a exposição ao PAR (dose de 15 mg/kg/dia em água) intrauterina até o DPN 60 comprometeu a liberação e a absorção de aminas biogênicas no SNC promovendo alterações nas vias serotoninérgica, noradrenérgica, dopaminérgica, e redução na concentração de dopamina na região de bulbo (BLECHARZ-KLIN et al., 2015).

Como citado anteriormente, o PAR pode promover seu efeito analgésico via modulação das fibras serotoninérgicas. Embora esse mecanismo ainda não esteja completamente elucidado, um estudo mostrou que o PAR causa um aumento da liberação de 5-HT no SNC, promovendo uma redução da expressão dos receptores 5-HT_{2a} pós sinápticos. Esses receptores estão relacionados com a algesia e desenvolvimento de cefaleia crônica (SRIKIATKHACHORN; TARASUB; GOVITRAPONG, 1999). Além disso, um estudo mostrou que a injeção de TCB-2 (um agonista do receptor 5-HT_{2a}) no córtex pré-frontal medial promove supressão do comportamento de recuperar os filhotes em ratas (GAO et al., 2018), sugerindo que a atividade dos receptores 5-HT_{2a} é necessária para a expressão do comportamento materno normal (GAN; SUN; CHEN, 2018), sendo assim, acreditamos que o tratamento com PAR durante a gestação e lactação pode ter modulado a expressão dos receptores 5-HT_{2a} no cérebro das ratas, interferindo sobre o comportamento de limpeza dos filhotes.

Estudos mostram que o PAR interfere também sobre a interação ocitocina/PGF₂-A, outra via importante na expressão do comportamento materno. A PGF₂-A é um subtipo de PG encontrada principalmente no útero, que se encontra aumentada próximo ao parto, onde além de colaborar para a expulsão do feto, inativa o comportamento de infanticídio em ratas (DALTON, 1986). Ademais, a administração intracerebroventricular de PGF₂-A promove um aumento da taxa de disparo de neurônios ocitocinérgicos no SNC. (PEDERSEN et al., 1982). A ocitocina por sua vez, é um hormônio com importante papel sobre a regulação do comportamento materno (PEDERSEN; PRANGE, 1985), podendo até mesmo induzir a expressão desse comportamento em ratas Sprague-Dawley virgens (PEDERSEN et al., 1982). Um estudo mostrou que o PAR (100-400mg/kg via oral) diminui as concentrações de ocitocina no córtex pré-frontal e amígdala de ratos Sprague-Dawley adultos (KANDIS et al., 2018), além disso, esse fármaco também pode reduzir as concentrações plasmáticas de PGF₂-A (TRAPPE et al., 2015).

Em resumo, os estudos apresentados mostram que o PAR pode promover alterações sobre substâncias importantes na regulação e expressão do comportamento materno (serotonina, dopamina, ocitocina e PG₂F-A) o que provavelmente interferiu sobre a expressão do comportamento de limpeza dos filhotes das ratas que receberam o PAR durante a gestação e lactação (PARGL).

5.2 PARÂMETROS AVALIADOS NA PROLE FEMININA

Com relação à prole feminina, a DAG, além de ser útil para determinação do sexo em roedores, é um importante parâmetro utilizado para avaliar compostos desreguladores hormonais e toxicidade reprodutiva (GALLAVAN et al., 1999; LIU; XU; HUO, 2014). Existem relatos que correlacionam a exposição ao PAR com alterações na DAG em roedores e humanos, principalmente no sexo masculino (HOLM et al., 2015; KRISTENSEN et al., 2011b; LIND et al., 2017). Ademais, o tratamento materno com PAR, na dose de 150mg/kg/dia, reduziu a DAG nas idades de 4, 6, 8 e 10 semanas da prole feminina de camundongos (HOLM et al., 2016). Contudo, no presente estudo não foram encontradas alterações de DAG em nenhuma das idades mensuradas (DPN 1, 21, instalação da puberdade e DPN 90). Nossos dados corroboram com o estudo conduzido por Johansson e colaboradores (2016), com o mesmo modelo animal e dose de tratamento, onde não foram observadas alterações na DAG da prole feminina no DPN 22 (JOHANSSON et al., 2016). Acreditamos que a diferença entre os resultados obtidos esteja relacionada ao modelo experimental utilizado nos estudos, uma vez Holm e colaboradores (2016) verificaram essa alteração em camundongos C57BL/6BJ, enquanto que no presente estudo e no de Johansson et al., (2016) a análise foi realizada em ratos Wistar. Além disso, é importante ressaltar que a DAG é uma medida subjetiva, e o tamanho reduzido de camundongos pode promover uma grande variabilidade na mensuração desse parâmetro (HOLM et al., 2016).

No que concerne ao desenvolvimento sexual e instalação da puberdade, a exposição ao PAR durante o período intrauterino e intrauterino-lactacional não comprometeu o dia da abertura vaginal, primeiro estro, análise do ciclo estral e o peso dos órgãos reprodutivos (DPN 21 e 90) da prole feminina. Esses resultados corroboram com um estudo onde utilizaram a mesma dose e período de tratamento e não foram encontradas alterações na abertura vaginal, peso dos ovários e ciclo estral das ratas em idade adulta (JOHANSSON et al., 2016).

As ratas expostas ao PAR durante o período intrauterino (PARG) apresentaram um aumento na concentração plasmática de estradiol quando avaliadas na vida adulta (DPN 90). Existem na literatura, estudos mostrando que o PAR pode promover alterações nas concentrações de estradiol: Embora esse fármaco tenha demonstrado uma leve atividade antiestrogênica (diminuição da

expressão dos receptores nucleares de progesterona e atividade da peroxidase uterina) em camundongos fêmeas tratadas na dose de 200mg/kg/dia de PAR via gavagem do DPN 21 ao 24 (PATEL; ROSENGREN, 2001), este fármaco apresentou atividade estrogênica em amostras de levedura recombinante que expressavam o receptor de estrógeno hER α (FENT; ESCHER; CAMINADA, 2006). Além disso, um estudo realizado em mulheres mostrou que a administração de 1g de PAR durante o tratamento com anticoncepcionais promoveu um aumento nas concentrações plasmáticas de etinilestradiol, um derivado do 17 β -estradiol (ROGERS et al., 1987b). Em resumo, embora os dados na literatura sejam controversos, eles mostram que o PAR pode promover alterações nas concentrações de estradiol. Contudo, em nosso estudo, as ratas grupo PARGL não apresentaram alterações nos níveis desse hormônio na vida adulta como as ratas do grupo PARG. Possivelmente, o maior período de exposição ao PAR (intrauterino e lactacional) tenha ativado mecanismos de adaptação capazes de normalizar a liberação de estradiol na vida adulta. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreensão da possível atividade estrogênica ou antiestrogênica do PAR.

No presente estudo, as fêmeas do grupo PARGL apresentaram uma diminuição na receptividade ao macho na idade adulta. Esta alteração provavelmente está relacionada ao aumento do comportamento de limpeza dos filhotes apresentado pelas mães tratadas do grupo PARGL, uma vez que, variações no cuidado materno influenciam fortemente a expressão do comportamento sexual da prole feminina na vida adulta (CAMERON, 2011). Além disso, acredita-se que o cuidado parental, especialmente na primeira semana pós-parto, pode alterar o desenvolvimento de sistemas neuroendócrinos que regulam o comportamento sexual da prole feminina (função hipotálamo-pituitária-ovariana) (CAMERON et al., 2008). Esta parece uma hipótese válida, uma vez que as fêmeas criadas por mães com menor incidência de comportamento de limpeza/lamber os filhotes apresentam maior receptividade sexual aos machos quando adultas (CAMERON et al., 2005), o oposto também é verdadeiro: o aumento desse comportamento diminui a classificação de lordose da prole feminina quando adultas (CAMERON; FISH; MEANEY, 2008; MONTAGNINI et al., 2018) como visto no presente estudo.

O tratamento materno com PAR não alterou os parâmetros histológicos do útero da prole feminina, no entanto, ocasionou uma diminuição da reserva de folículos primordiais nos ovários na idade adulta. Esse achado corrobora

com relatos presentes na literatura. Um estudo em ratas mostrou que a exposição ao PAR do DG 7 ao 13 (50 e 150 mg/kg/dia) levou a uma redução da expressão do gene Mhv, um marcador característico expresso por células germinativas fetais de ratas prematuras, além de uma redução dos folículos primordiais destes animais com 7 semanas de idade (HOLM et al., 2016). Outros estudos apresentaram resultados semelhantes: Dean e colaboradores (2016) trataram as mães do DG 13,5 ao 17,5 e também relataram uma diminuição no número de folículos. Além disso, o PAR pode promover alterações a longo prazo nas células ovarianas, uma vez que um estudo mostrou uma diminuição no número de corpos lúteos em ratas de 13 meses de idade também expostas ao PAR via tratamento materno (JOHANSSON et al., 2016). O estudo de Hurtado-Gonzalez et al., (2018) com cultura de células humanas e de ratos mostrou que o PAR causa mudanças relevantes nas células germinativas fetais: a cultura de tecido ovariano de fetos humanos durante o primeiro trimestre foi exposta ao PAR *in vitro* por 7 dias e esse fármaco promoveu uma redução de 43% no número de gonócitos. Acredita-se que os efeitos do PAR sobre essas células estejam relacionados à capacidade desse fármaco em inibir a produção de prostaglandinas, comprometendo assim a via da PGE2 nos ovários, esta que já se mostrou importante na modulação da proliferação e diferenciação de células pluripotentes (HURTADO-GONZALEZ et al., 2018). Embora o PAR seja conhecido por apresentar pouco efeito periférico devido às altas concentrações de peróxidos (CHANDRASEKHARAN et al., 2002), um estudo realizado em humanos mostrou que a ingestão de PAR (4g via oral) após o exercício físico diminuiu as concentrações de PGE2 e PGF2-A da musculatura esquelética (TRAPPE et al., 2015), apontando que esse fármaco tem capacidade de inibir enzimas COX e reduzir as concentrações de PGs mesmo na periferia. Desta forma, sugerimos que esse mecanismo esteja relacionado com o comprometimento da reserva de folículos ovarianos encontrado nas ratas expostas ao PAR, uma vez que, os ovários expressam tanto a enzima COX-2 como também receptores de PGE2 (BAYNE et al., 2009). Além disso, um estudo realizado em ratas mostrou que o tratamento materno com PAR no DG 17,5 (350mg/kg) reduziu a expressão de COX-2 e receptores de PGE2 nas células germinativas dos ovários fetais da prole feminina (DEAN et al., 2016). O mecanismo pelo qual o PAR compromete as células germinativas nos ovários via PGE2 ainda não é completamente elucidado. Contudo, acredita-se que o PAR possa promover um atraso na entrada do processo de meiose e

desenvolvimento celular das células germinativas fetais, uma vez que esse fármaco diminuiu a expressão gênica de marcadores de pluripotência (Lin28) e entrada de meiose (Dmrt1 e Stra8) em ovários de ratas no DG 18,5 (DEAN et al., 2016). A exposição fetal ao PAR promoveu alterações em ovários de ratas não apenas na primeira, mas também na segunda geração (redução no peso e número de folículos), independente da linhagem F1 (paterna ou materna) exposta ao fármaco, sugerindo uma interação intergeracional devido a alterações epigenéticas nas células germinativas causadas pelo PAR (DEAN et al., 2016).

Uma segunda hipótese sobre o comprometido o número de células ovarianas ocasionado pelo PAR, seria a interferência sobre o sistema opioide. Um estudo mostrou que opióides endógenos (betaendorfina e metencefalina) foram encontrados no fluido folicular de ovários humanos em concentrações até 40 vezes maiores que no plasma (PETRAGLIA et al., 1985). Além disso, existem relatos da expressão de receptores opióides em oócitos (AGIRREGOITIA et al., 2012) e células da granulosa (LUNGER et al., 2016) humanas, sendo que essa expressão varia entre os estágios de desenvolvimento dessas células, sugerindo que os opióides atuem sobre a maturação celular no ovário. A administração de naloxonazina e MR2266 (antagonistas dos receptores opióides μ e κ respectivamente) bloqueia a ação antinociceptiva do PAR em ratos (RUGGIERI et al., 2008), sugerindo que parte do mecanismo desse fármaco esteja relacionado à ativação de receptores opióides, o que provavelmente poderia causar alterações sobre o número de células ovarianas, uma vez que estudos têm sugerido que o sistema opioide atue via efeitos parácrinos e/ou autócrinos na regulação do microambiente das células nos ovários (BÖTTCHER et al., 2017).

Os efeitos do PAR sobre as células ovarianas é preocupante, uma vez que a proliferação dessas células só ocorre até a entrada no processo de parada meiótica, que em ratos corresponde ao DG 14 (em humanos, esse processo ocorre por volta do terceiro mês de gestação) (HOLM et al., 2016). Assim, uma diminuição no número de células germinativas nesse período pode ter consequências a longo prazo, relacionadas à reserva de oócitos (NELSON; TELFER; ANDERSON, 2013). No entanto, no presente estudo, a exposição ao PAR não alterou a fertilidade da prole feminina, sugerindo que, embora cause alterações na reserva folicular, o PAR não compromete gravemente a quantidade dessas células a ponto de promover a infertilidade feminina.

6 CONCLUSÕES

Em resumo, o presente estudo mostra que o tratamento materno com PAR pode interferir sobre o comportamento de limpeza dos filhotes expresso pelas mães, além de alterar a concentração plasmática de estradiol, comprometer o comportamento sexual e reduzir a reserva de folículos ovarianos da prole feminina na vida adulta. Sugerimos que estes achados estejam relacionados a interferência desse fármaco sobre os sistemas opioidérgico, serotoninérgico e ocitocinérgico, assim como alterações nas concentrações plasmáticas de estradiol e PGs, tanto a nível central, como periférico. Contudo, é importante ressaltar que os mecanismos citados ainda não estão bem esclarecidos na literatura. Em 2015, o FDA emitiu uma declaração dizendo estar ciente de relatos de complicações devido ao uso de analgésicos, incluindo o PAR, durante a gravidez e que continua a monitorar e avaliar o uso desses medicamentos (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION., 2015). Sendo assim, mais estudos são necessários sobre o tema tanto para auxiliar na orientação de gestantes e lactantes sobre o uso do PAR como também para melhor entendimento dos mecanismos pelo qual esse fármaco promove alterações sobre o sistema reprodutor feminino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, V. M. et al. Previous maternal experience affects accumbal dopaminergic responses to pup-stimuli. **Brain Research**, v. 1198, p. 115–123, 2008.
- AGIRREGOITIA, E. et al. Expression and localization of opioid receptors during the maturation of human oocytes. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 24, n. 5, p. 550–557, maio 2012.
- AMINOSHARIAE, A.; KHAN, A. Acetaminophen: Old Drug, New Issues. **Journal of Endodontics**, 2015.
- ANDERSON, B. J. Paracetamol (Acetaminophen): Mechanisms of action. **Paediatric Anaesthesia**, v. 18, n. 10, p. 915–921, 2008.
- BAYNE, R. A. L. et al. Prostaglandin E₂ as a Regulator of Germ Cells during Ovarian Development. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 10, p. 4053–4060, 2009.
- BEACH, F. A. Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats. **Physiology and Behavior**, v. 16, n. 6, p. 807–808, 1976.
- BEAULAC-BAILLARGEON, L.; ROCHELEAU, S. Paracetamol pharmacokinetics during the first trimester of human pregnancy. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 46, n. 5, p. 451–454, 1994.
- BERTOLINI, A. et al. Paracetamol: New vistas of an old drug. **CNS Drug Reviews**, v. 12, n. 3–4, p. 250–275, 2006.
- BLECHARZ-KLIN, K. et al. Developmental exposure to paracetamol causes biochemical alterations in medulla oblongata. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, n. 2, p. 369–374, 2015.
- BÖTTCHER, B. et al. Impact of the opioid system on the reproductive axis. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 2, p. 207–213, ago. 2017.

BYER, A. J.; SEMMER, J. R. Acetaminophen overdose in the third trimester of pregnancy. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 247, p. 3114–3115, 1982.

CAMERON, N. et al. Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic-pituitary-gonadal function in the female rat. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

CAMERON, N. M. et al. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, n. 4–5, p. 843–865, 2005.

CAMERON, N. M. Maternal programming of reproductive function and behavior in the female rat. **Frontiers in Evolutionary Neuroscience**, v. 3, n. DEC, p. 1–10, 2011.

CAMERON, N. M.; FISH, E. W.; MEANEY, M. J. Maternal influences on the sexual behavior and reproductive success of the female rat. **Hormones and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 178–184, 2008.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–371, ago. 2003.

CHAMPAGNE, F. A. Variations in Nucleus Accumbens Dopamine Associated with Individual Differences in Maternal Behavior in the Rat. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 17, p. 4113–4123, 2004.

CHANDRASEKHARAN, N. V et al. COX-3 , a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic / antipyretic drugs : Cloning , structure , and expression. 2002.

CHISTYAKOV, V. A et al. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on estrous cycle and 17 β -estradiol level in rats. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 77, n. 12, p. 1382–6, dez. 2012.

DALTON, J. M. Infanticide and Parental Behavior in Wild Female House Mice : Effects of Ovariectomy , Adrenalectomy and Administration of Oxytocin and Prostaglandin F2a. v. 36, n. 2, p. 17–23, 1986.

DEAN, A. et al. Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. **Scientific Reports**, 2016.

DRIESCHE, VAN DEN, S. et al. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model Europe PMC Funders Group. **Sci Transl Med May**, v. 20, n. 7288, p. 288–80, 2015.

FENT, K.; ESCHER, C.; CAMINADA, D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. **Reproductive Toxicology**, v. 22, n. 2, p. 175–185, 2006.

FITZROY HARDY, D.; DEBOLD, J. F. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. **Physiology and Behavior**, v. 7, n. 4, p. 643–645, 1971.

GALLAVAN, R. H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: Potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383–390, 1999.

GAN, L.; SUN, M.; CHEN, W. Pharmacology , Biochemistry and Behavior 5 - Hydroxytryptamine 2A receptor inverse agonist pimavanserin impairs maternal behavior in postpartum female rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 175, n. June, p. 152–159, 2018.

GAO, J. et al. Activation of 5-HT 2A receptor disrupts rat maternal behavior. **Neuropharmacology**, v. 128, p. 96–105, jan. 2018.

GG, GRAHAM; KF, S. Mechanism of action of paracetamol. **American journal of therapeutics**, v. 12, n. 1, p. 46–55, 2005.

GUPTA, U. et al. Effect of intrauterine administration of antiprostaglandin drugs on implantation in the rat. **Contraception**, v. 24, n. 3, p. 283–288, 1981.

HOLM, J. B. et al. Aniline is rapidly converted into paracetamol impairing male reproductive development. **Toxicological Sciences**, v. 148, n. 1, p. 288–298, 2015.

HOLM, J. B. et al. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility.

Toxicological Sciences, v. 150, n. 1, p. 178–189, 2016.

HURTADO-GONZALEZ, P. et al. Effects of exposure to Acetaminophen and Ibuprofen on fetal germ cell development in both sexes in rodent and human using multiple experimental systems. **Environmental Health Perspectives**, 2018.

JENSEN, M. S. et al. Maternal Use of Acetaminophen, Ibuprofen, and Acetylsalicylic Acid During Pregnancy and Risk of Cryptorchidism. **Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 779–785, 2010.

JOHANSSON, H. K. L. et al. Perinatal exposure to mixtures of endocrine disrupting chemicals reduces female rat follicle reserves and accelerates reproductive aging.

Reproductive Toxicology, v. 61, p. 186–194, 2016.

JOHNSON, A. M. Analysis of animal weight gains in chronic toxicity studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 7, n. 2, p. 307–316, 15 fev. 1981.

JOZWIAK-BEBENISTA, M.; NOWAK, J. Z. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, 2014.

KANDIS, S. et al. Acetaminophen (paracetamol) affects empathy-like behavior in rats: Dose-response relationship. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 175, p. 146–151, dez. 2018.

KISS, A. C. I. et al. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 3, p. 292–300, 2012.

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

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

KRISTENSEN, D. M. et al. Analgesic use — prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 7, p. 381–393, 2016.

LIND, D. V. et al. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: A cohort study of 1027 mother-child pairs. **Human Reproduction**, 2017.

LIU, C.; XU, X.; HUO, X. Anogenital distance and its application in environmental health research. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 8, p. 5457–5464, 2014.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (Acetaminofem) Risk of hepatotoxicity with Acetaminophen. **Rev. Bras. Farm**, v. 93, n. 4, p. 411–414, 2012.

LUNGER, F. et al. Opiate receptor blockade on human granulosa cells inhibits VEGF release. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 32, n. 3, p. 316–322, 2016.

LUPATTELLI, A. et al. Medication use in pregnancy: A cross-sectional, multinational web-based study. **BMJ Open**, 2014.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4a, p. 609–614, 2002.

MELO, S. C. C. S. DE et al. Uso de medicamentos por gestantes usuárias do Sistema Único de Saúde. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 66–70, fev. 2009.

MITCHELL, A. A. et al. Medication Use During Pregnancy, With Particular Focus On Prescription Drugs: 1976-2008. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 205, n. 1, p. 51.1-51.8, 2011.

MONTAGNINI, B. G. et al. Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: Uterotrophic assay and two-generation study.

Toxicology, v. 410, p. 152–165, dez. 2018.

NELSON, S. M.; TELFER, E. E.; ANDERSON, R. A. The ageing ovary and uterus:

New biological insights. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 1, p. 67–83, 2013.

NITSCHKE, J. et al. Effect of Acetaminophen on Fetal Activity. **Am J Perinatol**, v. 32,

n. 13, p. 1277–1280, 2015.

NITSCHKE, J. F. et al. Transplacental Passage of Acetaminophen in Term Pregnancy.

American Journal of Perinatology, v. 34, n. 6, p. 541–543, 2017.

NOTARIANNI, L.; OLDHAM, H.; BENNETT, P. Passage of paracetamol into breast milk and its subsequent metabolism by the neonate. **British Journal of Clinical**

Pharmacology, 1987.

OECD. **Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study**. [s.l.] OECD, 2007.

PATEL, R.; ROSENGREN, R. . Acetaminophen elicits anti-estrogenic but not

estrogenic responses in the immature mouse. **Toxicology Letters**, v. 122, n. 1, p.

89–96, 31 maio 2001.

PEDERSEN, C. et al. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats.

Science, v. 216, n. 4546, p. 648–650, 7 maio 1982.

PEDERSEN, C. A.; PRANGE, A. J. OXYTOCIN AND MOTHERING B E H A V I O R

I N T H E R A T. v. 28, p. 287–302, 1985.

PETRAGLIA, F. et al. Beta-endorphin and met-enkephalin in peritoneal and ovarian

follicular fluids of fertile and postmenopausal women. **Fertility and sterility**, v. 44, n.

5, p. 615–21, nov. 1985.

RAMIREZ, O. A; CARRER, H. F.; NASELLO, A G. Prenatal amphetamine exposure: ovulation, sexual behavior and hypothalamic monoamine content in rats.

Pharmacology, biochemistry, and behavior, v. 11, n. 6, p. 605–609, 1979.

REIS, A. R. et al. Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. **Behavioural Brain Research**, v. 265, p. 216–228, 2014.

ROGERS, S. et al. Paracetamol interaction with oral contraceptive steroids: increased plasma concentrations of ethinyloestradiol. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 23, n. 6, p. 721–725, 1987a.

ROGERS, S. M. et al. Paracetamol interaction with oral contraceptive steroids : increased plasma concentrations of ethinyloestradiol. p. 721–725, 1987b.

RUGGIERI, V. et al. Differential involvement of opioidergic and serotonergic systems in the antinociceptive activity of N-arachidonoyl- phenolamine (AM404) in the rat : comparison with paracetamol. p. 219–229, 2008.

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

SHAHROKH, D. K. et al. Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat. **Endocrinology**, v. 151, n. 5, p. 2276–2286, 2010.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 6, p. 494–504, 30 nov. 2007.

SNIJDER, C. A. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: The Generation R Study. **Human Reproduction**, v. 27, n. 4, p. 1191–1201, 2012.

SRIKIATKHACHORN, A.; TARASUB, N.; GOVITRAPONG, P. Acetaminophen-induced antinociception via central 5-HT 2A receptors. v. 34, p. 491–498, 1999.

STOLZENBERG, D. S.; NUMAN, M. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 826–847, 2011.

TAPIAS, M. et al. Assessment of the analgesic dipyrrone as a possible (anti) androgenic endocrine disruptor. **Toxicology Letters**, v. 285, n. September 2017, p. 139–147, 2018.

TRAPPE, T. A. et al. Skeletal Muscle PGF 2_α and PGE 2 in Response to Eccentric Resistance Exercise : Influence of Ibuprofen and Acetaminophen. v. 86, n. January, p. 5067–5070, 2015.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: **FDA has reviewed possible risks of pain medicine use during pregnancy**. Disponível em <<https://www.fda.gov/drugs/drugsafety/ucm429117.htm>>. Acesso em 23 jun. 2018

UNEP; WHO. **State-of-the-science of endocrine disrupting chemicals - 2012**. Geneva: UNEP/WHO, 2013.

VIRTANEN, H. E.; TOPPARI, J. Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism. v. 14, n. 1, p. 49–58, 2008.

WALKER, C.-D. et al. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. **Journal of psychiatry & neuroscience : JPN**, v. 29, n. 5, p. 364–82, set. 2004.

WERLER, M. M.; MITCHELL, A. A.; HERNANDEZ-DIAZ, S. Use of over-the-counter medications during pregnancy. p. 771–777, 2005.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 80/2017

Londrina, 14 de Junho de 2017.

Prezado (a) professor (a)


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

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

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

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

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

Profa. Dra  Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UDEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

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

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central do CCB

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

C/C para a Direção de Centro do CCB