

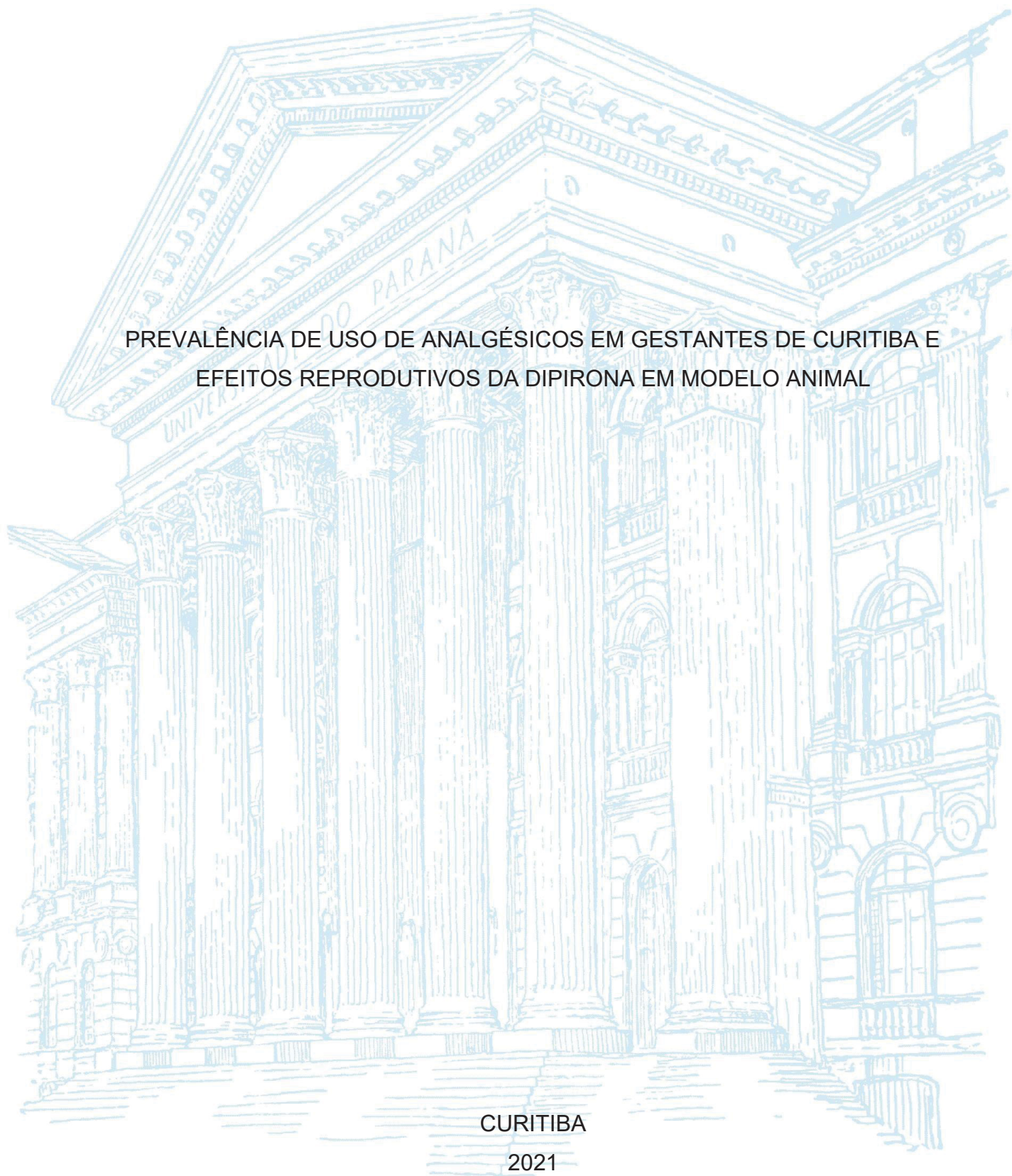
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA

PREVALÊNCIA DE USO DE ANALGÉSICOS EM GESTANTES DE CURITIBA E
EFEITOS REPRODUTIVOS DA DAPIRONA EM MODELO ANIMAL

CURITIBA

2021



MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA

PREVALÊNCIA DE USO DE ANALGÉSICOS EM GESTANTES DE CURITIBA E
EFEITOS REPRODUTIVOS DA DIPIRONA EM MODELO ANIMAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof^o. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

Coorientador: Prof^o. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA

2021

Universidade Federal do
Paraná Sistema de
Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Passoni, Marcella Tapias

Prevalência de uso de analgésicos em gestantes de Curitiba e efeitos reprodutivos da dipirona em modelo animal. / Marcella Tapias Passoni. – Curitiba, 2021.

159 p.: il.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade.

Coorientador: Paulo Roberto Dalsenter

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Analgésicos. 2. Anti-inflamatórios. 3. Dipirona. 4. Acetaminofen. 5. Toxicidade. 6. Gravidez. 7. Disruptores endócrinos. I. Título. II. Andrade, Anderson Joel Martino, 1977-. III. Dalsenter, Paulo Roberto, 1963. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (22. ed.) 615.783

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DOUTORADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTORA EM FARMACOLOGIA

No dia dezesseis de dezembro de dois mil e vinte e um às 08:00 horas, na sala Plataforma Teams , Remoto - Plataforma Teams, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de tese da doutoranda **MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA**, intitulada: **Prevalência de uso de analgésicos em gestantes de Curitiba e efeitos reprodutivos da dipirona em modelo animal**, sob orientação do Prof. Dr. ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), MICHEL FLEITH OTUKI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES (55002867), IZONETE CRISTINA GUILOSKI (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de doutora está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

23/12/2021 17:41:39.0

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/01/2022 19:44:40.0

MICHEL FLEITH OTUKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/01/2022 11:33:55.0

GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES

Avaliador Externo (55002867)

Assinatura Eletrônica

23/12/2021 16:11:56.0

IZONETE CRISTINA GUILOSKI

Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO FARMACOLOGIA -
40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA** intitulada: **Prevalência de uso de analgésicos em gestantes de Curitiba e efeitos reprodutivos da dipirona em modelo animal**, sob orientação do Prof. Dr. ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica
23/12/2021 17:41:39.0
ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
05/01/2022 19:44:40.0
MICHEL FLEITH OTUKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
04/01/2022 11:33:55.0
GLAURA SCANTAMBURLO ALVES FERNANDES
Avaliador Externo (55002867)

Assinatura Eletrônica
23/12/2021 16:11:56.0
IZONETE CRISTINA GUILOSKI
Avaliador Externo (FACULDADES PEQUENO PRÍNCIPE)

Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531990 - Tel: (0xx41)3361-1693 - E-mail: pgfarmacologia@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 139648

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 139648

NOTA EXPLICATIVA

Esta tese é apresentada em formato alternativo – artigos submetidos para publicação – de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, constando de uma revisão de literatura, justificativa, objetivos do trabalho e dois artigos científicos abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, além das considerações finais. Os artigos foram formatados conforme as normas propostas pelos periódicos aos quais foram submetidos.

Dedico este trabalho aos meus avós e à
minha mãe, meus alicerces!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas infinitas bênçãos, força e coragem! Pelo amor, cuidado e proteção constantes, por direcionar o meu caminho e ser meu orientador da vida!

À minha família pelo apoio e amor incondicionais! Pelo exemplo de determinação, persistência, dedicação e resiliência!

Às minhas amigas da vida pelo companheirismo, amizade e motivação!

Ao meu orientador Professor Dr. Anderson Joel Martino Andrade pelo incentivo, confiança e atenção dedicada para a execução de todo o projeto. Agradeço pelos conhecimentos científicos adquiridos e pela contribuição na minha formação como docente e pesquisadora!

Às amigas e colegas de laboratório pela valiosa ajuda nos experimentos e momentos compartilhados!

Aos amigos, colegas, professores e funcionários do Departamento de Farmacologia por todas as contribuições ao longo da minha trajetória na pós-graduação!

Às professoras Dra. Renata Marino Romano, Dra. Katherinne Maria Spencoski e Dra. Ariany Carvalho dos Santos pela colaboração nas análises realizadas para este trabalho.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas pelo trabalho, dedicação e auxílio prestados.

Aos animais que têm sua vida sacrificada em favor da pesquisa científica e do conhecimento humano, minha gratidão e respeito!

Às gestantes que aceitaram participar do Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR) fornecendo dados de extrema relevância para a composição deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para a minha formação profissional e pessoal!

Minha profunda e eterna gratidão!

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais utilizados mundialmente pela população em geral. Embora contra-indicados durante gestação, estudos em diferentes países indicam alta prevalência de uso de analgésicos e AINEs por mulheres neste período. Diversas evidências epidemiológicas e experimentais indicam que estes medicamentos podem ter propriedades desreguladoras endócrinas capazes de alterar a função reprodutiva humana e animal em diferentes estágios de desenvolvimento. A dipirona é o principal analgésico utilizado no Brasil, sendo também amplamente utilizada por gestantes, e há dados limitados sobre seus possíveis efeitos desreguladores endócrinos. Devido à alta prevalência de uso de analgésicos durante a gestação, existe uma preocupação com os possíveis riscos associados à exposição pré-natal a estes medicamentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência e os preditores do uso de analgésicos e AINEs no início da gestação em participantes do Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR), e avaliar os efeitos reprodutivos de doses terapêuticas de dipirona (25, 75 and 225 mg/kg/dia) em modelo animal, com ênfase nos efeitos durante a gestação e no desenvolvimento da prole exposta *in utero*. Os dados obtidos do estudo epidemiológico revelaram alta prevalência de uso de analgésicos pelas participantes (N = 275), de modo que 61,5% das mulheres relataram o uso de qualquer analgésico pelo menos uma vez desde o início da gestação e, geralmente, para tratar dores de cabeça. O paracetamol foi o analgésico mais utilizado (55,3%), seguido da dipirona (13,5%) e do ibuprofeno (12%), e o uso de mais de um analgésico foi relatado por 18,5% das participantes. Mulheres que relataram o uso de paracetamol combinado a outros analgésicos consumiram quantidades maiores deste fármaco em relação às participantes que usaram apenas paracetamol. De forma similar, a quantidade de paracetamol consumida foi associada com o uso de outras classes de medicamentos. Resultados do experimento com ratos Wistar demonstraram que a dipirona na maior dose induziu um aumento significativo nas perdas pós-implantação / morte fetal e atraso no parto. Além disso, a prole exposta *in utero* à dose mais alta também exibiu mudanças significativas em alguns marcadores de desregulação endócrina no início da vida, em particular o aumento do índice anogenital (AGI) em fêmeas e o aumento da taxa de retenção de mamilos em machos, indicando efeitos proandrogênicos e antiandrogênicos, respectivamente. Estes efeitos opostos possivelmente refletem alterações na conversão de progestágenos em andrógenos e os distintos ambientes endócrinos em fetos fêmeas e machos. Os resultados obtidos do presente estudo são preocupantes uma vez que a exposição pré-natal a analgésicos e AINEs está associada a uma série de efeitos adversos na gestação e distúrbios reprodutivos nos descendentes. Considerando o uso de dipirona por mulheres grávidas e a possibilidade de coexposição com outros analgésicos e substâncias capazes de afetar o desenvolvimento reprodutivo, torna-se necessária a ampliação de medidas de conscientização sobre o uso de analgésicos e outros medicamentos assim como seus potenciais riscos, especialmente para populações mais sensíveis como as gestantes.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Anti-inflamatórios não esteroidais. Metamizol. Paracetamol. Gestação. Toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

Analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most used pharmaceuticals worldwide by the general population. Although contraindicated during pregnancy, studies in different countries indicate a high prevalence of analgesic and NSAIDs use by pregnant women. Several epidemiological and experimental evidences indicate that these drugs may have endocrine disrupting properties capable of altering human and animal reproductive functions at different development stages. Dipyrrone is the main analgesic used in Brazil and may also be widely used by pregnant women, but there is limited data on its possible endocrine disrupting effects. Due to the high prevalence of analgesic use during pregnancy, there is concern about the possible risks associated with prenatal exposure to these drugs. The aim of this study was to evaluate the prevalence and predictors of early pregnancy analgesic and NSAIDs use in participants of the Curitiba Reproductive and Environment Study (CARES), and to assess the reproductive effects of therapeutic doses of dipyrrone (25, 75, and 225 mg/kg/day) in animal model with emphasis on the effects during pregnancy and on the development of offspring exposed *in utero*. The data obtained in the epidemiological study revealed a high prevalence of analgesic use by the participants (N = 275), so that 61.5% of the women reported using any analgesic at least once since the beginning of pregnancy and, generally, to treat headaches. Paracetamol was the most used analgesic (55.3%), followed by dipyrrone (13.5%) and ibuprofen (12%), and the use of more than one analgesic was reported by 18.5% of study participants. Women reporting the use of paracetamol combined with other analgesics consumed larger amounts of this medication compared to participants who used paracetamol-only. Similarly, the amount of paracetamol consumed was associated with the use of pharmaceuticals other than analgesics. Results of the experimental study with Wistar rats showed that dipyrrone at the highest dose induced a significant increase in post-implantation losses/fetal death and delay in parturition. Offspring exposed *in utero* at the highest dose also exhibited significant changes in some early life markers of endocrine disruption, in particular increased anogenital index (AGI) in females and increased rate of retained nipples in males, indicating proandrogenic and antiandrogenic effects, respectively. These opposite effects possibly reflect changes in the conversion of progestins into androgens and the distinct endocrine environments in female and male fetuses. The results obtained in the present study are concerning since prenatal exposure to analgesics and NSAIDs is associated with a series of adverse effects on gestation and reproductive disorders in offspring. Considering the use of dipyrrone by pregnant women and the possibility of co-exposures with other analgesics and substances capable of affecting reproductive development, it is necessary to raise awareness about the use of analgesics and other pharmaceuticals and their potential risks, especially for sensitive populations such as pregnant women.

Keywords: Endocrine disruptors. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Metamizole. Paracetamol. Pregnancy. Reproductive toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DOS PAÍSES ONDE A DIPIRONA ENCONTRA-SE DISPONÍVEL NO MERCADO.....31
- FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA DIPIRONA...32

ARTIGO CIENTÍFICO 1:

- Figure 1** – Predictors of total amount of paracetamol consumed in early pregnancy.....57

ARTIGO CIENTÍFICO 2:

- Figure 1** – Data on post-implantation losses (A) and pregnancy length (B) of dams exposed to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....85
- Figure 2** – Female anogenital index (A) on PND4 and percentage of males with nipple retention (B) on PND13 following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....89
- Figure S1** – Body weight of rat offspring in the lactation period following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....113
- Figure S2** – Body weight of female offspring from postnatal day 28 to 77.....113
- Figure S3** – Body weight of male offspring from postnatal day 28 to 91.....114
- Figure S4** – Representative histological sections of uterus and ovaries from adult rats exposed *in utero* to vehicle control (A, B), dipyrone 25 mg/kg/day (C, D), dipyrone 75 mg/kg/day (E, F), dipyrone 225 mg/kg/day (G, H), and DEHP 750 mg/kg/day (I, J).....115
- Figure S5** – Representative histological sections of testis and epididymis from adult rats exposed *in utero* to vehicle control (A, B), dipyrone 25 mg/kg/day (C, D), dipyrone 75 mg/kg/day (E, F), dipyrone 225 mg/kg/day (G, H), and DEHP 750 mg/kg/day (I, J).....116

- Figure S6** – Gene expression analyses for *star* (A), *Cyp11a1* (B), *Cyp19a1* (C), *Lhcgr* (D), *Fshr* (E), *Esr2* (F), *Pgr* (G), *Inhbb* (H), *Gdf9* (I) were evaluated in the ovaries of adult females exposed *in utero* to vehicle control (Veh), dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....118
- Figure S7** – Gene expression analyses for *Lhcgr* (A) and *Star* (B) were evaluated in the testes and *Ar* (C) was evaluated in the seminal vesicle of adult males exposed *in utero* to vehicle control (Veh), dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....119

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO 1:

Table 1	– Sociodemographic characteristics of study participants.....	49
Table 2	– Use of mild analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy.....	51
Table 3	– Dose and reasons of paracetamol, dipyron, and ibuprofen use in early pregnancy.....	52
Table 4	– Univariate and multivariate analysis of sociodemographic and lifestyle factors associated with early pregnancy use of any analgesic.....	54
Table 5	– Univariate and multivariate analysis of sociodemographic and lifestyle factors associated with early pregnancy use of paracetamol.....	55
Table S1	– Recruiting study sites – health care units.....	68
Table S2	– Smoking and drinking habits in study participants.....	68
Table S3	– Early pregnancy use of pharmaceuticals.....	69
Table S4	– Univariate and multivariate analysis of predictors of paracetamol amount used in early pregnancy.....	70

ARTIGO CIENTÍFICO 2:

Table 1	– Pregnancy outcomes following maternal exposure to dipyron (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	84
Table 2	– Birth and weaning outcomes of offspring exposed <i>in utero</i> to dipyron (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	86
Table 3	– Developmental landmarks outcomes of female and male offspring exposed <i>in utero</i> to dipyron (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	88

Table 4	– Absolute weight (g) of reproductive and non-reproductive organs of adult female and male rats following <i>in utero</i> exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	92
Table S1	– Primer sequences used for RT-qPCR analyses and GenBank access number of target genes.....	107
Table S2	– Data on parturition day following maternal exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	108
Table S3	– Absolute organs weights (g) of dams exposed to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	109
Table S4	– Relative weight (g) of reproductive organs of adult female and male rats following <i>in utero</i> exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	110
Table S5	– Absolute weight (g) of non-reproductive organs of adult female and male rats following <i>in utero</i> exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21.....	111

LISTA DE SIGLAS

AA	– 4-Aminoantipirina
AAA	– Acetilaminoantipirina
AAS	– Ácido acetilsalicílico / Acetylsalicylic acid
AGD	– Distância anogenital / Anogenital distance
AGI	– Índice anogenital / Anogenital index
AINEs	– Anti-inflamatórios não esteroidais
AM	– Ante Meridiem
ANOVA	– Analysis of Variance
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	– Androgen receptor
BMI	– Body mass index
Ca ²⁺	– Calcium
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CARES	– Curitiba reproductive and environment study
CAS	– Chemical Abstracts Service
CEUA	– Comissão de Ética no Uso de Animais
CI	– Confidence interval
CMED	– Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	– Ciclooxigenase / Cyclooxygenase
CUIDAR	– Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução
<i>Cyp11a1</i>	– Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1
<i>Cyp17a1</i>	– Cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1
<i>Cyp19a1</i>	– Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (aromatase)
DEHP	– Di(2-etilhexil)ftalato
DEs	– Desreguladores endócrinos
DES	– Dietilestilbestrol / Diethylstilbestrol
<i>Esr2</i>	– Estrogen receptor 2
EUA	– Estados Unidos da América
FAA	– Formilaminoantipirina
FDA	– <i>Food and Drug Administration</i>
FE	– First estrus

<i>Fshr</i>	– Follicle-stimulating hormone receptor
GD	– Gestation day
<i>Gdf9</i>	– Growth differentiation factor 9
GMPc	– Monofosfato cíclico de guanosina
HE	– Hematoxylin and eosin
IAAAS	– <i>International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study</i>
<i>Inhbb</i>	– Inhibin beta B subunit
INSL-3	– Fator semelhante à insulina-3
IP	– Inositol phosphate
LABC	– Levator ani muscle/Bulbocavernosus muscle
<i>Lhcgr</i>	– Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
MAA	– 4-Metilaminoantipirina
NaCl	– Sodium chloride
NSAIDs	– Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OR	– Odds ratio
PGE2	– Prostaglandin E2
<i>Pgr</i>	– Progesterone receptor
PGs	– Prostaglandinas
PLLR	– Pregnancy and lactation labeling rule
PM	– Post Meridiem
PND	– Postnatal day
PPS	– Preputial separation
PR	– Paraná
RT-qPCR	– Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SD	– Standard deviation
SEM	– Standard error of mean
SNC	– Sistema Nervoso Central
StAR	– Steroidogenic acute regulatory protein
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPR	– Universidade Federal do Paraná / Federal University of Paraná
USA	– United States of America
VO	– Vaginal opening

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	–	microgramas
µL	–	microlitros
D	–	dipirona / dipyrono
e.g.	–	por exemplo
g	–	gramas
h	–	horas
i.e.	–	isto é
kg	–	quilogramas
m ²	–	metros quadrados
mg	–	miligramas
mL	–	mililitros
ng	–	nanogramas
nm	–	nanômetros
Ref.	–	referência
Veh	–	vehicle

LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	percentual
®	–	marca registrada
<	–	menor
=	–	igual
>	–	maior
±	–	mais ou menos
≤	–	menor ou igual
≥	–	maior ou igual
N / n	–	tamanho da amostra
°C	–	graus Celcius
p	–	nível de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	ANALGÉSICOS E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA	21
2.2	EXPOSIÇÃO A ANALGÉSICOS NO PERÍODO GESTACIONAL	25
2.3	DIPIRONA	29
2.4	AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DESREGULADORAS ENDÓCRINAS EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E MODELOS ANIMAIS.....	37
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVOS	40
4.1	OBJETIVO GERAL.....	40
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.2.1	Estudo epidemiológico.....	40
4.2.2	Estudo toxicológico em modelo animal.....	41
5	ARTIGO CIENTÍFICO 1 – “PREVALENCE AND PREDICTORS OF EARLY GESTATION USE OF ANALGESICS IN A BRAZILIAN POPULATION” ...	42
6	ARTIGO CIENTÍFICO 2 – “THE ANALGESIC DIPYRONE AFFECTS PREGNANCY OUTCOMES AND ENDOCRINE-SENSITIVE ENDPOINTS IN FEMALE AND MALE OFFSPRING RATS”	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
8	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	122
9	REFERÊNCIAS.....	124
	APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO DO ESTUDO CURITIBANO DE INVESTIGAÇÃO DO AMBIENTE E REPRODUÇÃO (CUIDAR).....	141
	APÊNDICE 2 – FOLDER DO PROGRAMA EDUCACIONAL	149
	ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	150
	ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA	155
	ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	157

ANEXO 4 – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (CEUA/BIO – UFPR)	159
--	------------

1 INTRODUÇÃO

A exposição a medicamentos e agentes químicos ambientais capazes de desregular o sistema endócrino é motivo de especial preocupação para a saúde humana e animal. Estes agentes, conhecidos como desreguladores endócrinos (DEs), podem mimetizar ou alterar a disponibilidade de hormônios endógenos e, como consequência, comprometer a sinalização endócrina responsável por aspectos homeostáticos e reprodutivos (COLBORN et al., 1993; SKAKKEBAEK et al., 2016). As exposições durante janelas críticas do desenvolvimento como o período fetal, a infância e a puberdade, são particularmente preocupantes em razão do papel crítico dos hormônios na promoção da diferenciação e crescimento de diversos órgãos e sistemas, com destaque para a diferenciação sexual *in utero* e a ativação hormônio dependente da função reprodutiva na puberdade e na vida adulta (BAROUKI et al., 2012; GREENSPAN & LEE, 2018).

Nas últimas décadas, diversos contaminantes ambientais como agrotóxicos, aditivos de cosméticos e produtos de higiene pessoal, plastificantes e resíduos químicos industriais foram identificados como desreguladores endócrinos. Contudo, o caso do estrogênio sintético dietilestilbestrol (DES) representa o exemplo mais bem documentado de efeitos adversos relacionados à desregulação endócrina em humanos. Este medicamento foi utilizado para prevenção de abortos espontâneos e partos prematuros por mais de 5 milhões de gestantes em diversos países entre o final da década de 40 e início da década de 70. Posteriormente, o uso desta substância foi associada com graves problemas reprodutivos nos descendentes expostos *in utero*, particularmente quando utilizada durante o primeiro trimestre, incluindo infertilidade, mal formações uterinas e adenocarcinoma vaginal (TOPPARI et al., 1996; DASTON et al., 1997; MARTINO-ANDRADE E SWAN, 2017). No entanto, embora a evidência mais forte de perturbação endócrina humana esteja ligada a um produto farmacêutico, o DES, a atividade desreguladora endócrina de medicamentos é uma preocupação mais recente (KRISTENSEN et al., 2016; SABIR et al., 2019).

A exposição humana a medicamentos é particularmente preocupante porque além de ocorrer de maneira não intencional por meio da exposição a resíduos presentes na água, nos alimentos ou em outros meios, ocorre principalmente pela exposição a doses farmacológicas em virtude do uso terapêutico desses fármacos

BUSER et al., 1999; STUMPF et al., 1999; SANTOS et al., 2013; KIM et al., 2014; EBELE et al., 2017). Assim, diferentemente de outros DEs, a possibilidade de exposição a altas doses de medicamentos é grande, conferindo riscos potenciais a indivíduos expostos, incluindo populações vulneráveis como gestantes e crianças. Neste contexto, o período pré-natal é considerado um dos mais susceptíveis à ação de medicamentos e outros agentes químicos desreguladores endócrinos em razão dos complexos mecanismos de sinalização endócrina que caracterizam este estágio de desenvolvimento.

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais *in vitro* e *in vivo* indicam que muitos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, indometacina e diclofenaco, podem ter propriedades desreguladoras endócrinas capazes de alterar a função reprodutiva humana e animal desde a vida fetal até a idade adulta em ambos os sexos (KRISTENSEN et al., 2011, 2012; SNIJDER et al., 2012; ALBERT et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; DEAN et al., 2013, 2016; HOLM et al., 2015, 2016; BEN MAAMAR et al., 2017; LIND et al., 2017; ROSSITTO et al., 2019a, 2019b; KREBS RIBEIRO et al., 2020). O acúmulo destas evidências, somado à ampla utilização destes medicamentos pela população em geral, inclusive por gestantes, reforça a necessidade e a importância do rastreamento da atividade desreguladora endócrina de produtos farmacêuticos, especialmente durante períodos críticos do desenvolvimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANALGÉSICOS E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

Dentre as substâncias com potencial de desregular o sistema endócrino e causar distúrbios reprodutivos têm se destacado os analgésicos e AINEs. Estes medicamentos têm causado especial preocupação, pois estão entre os fármacos mais utilizados mundialmente, tanto pela população em geral quanto por crianças e também por mulheres em idade fértil e durante o período gestacional e lactacional (MCKENNA E MCINTYRE, 2006; BECKHAUSER et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011; PHILIPPAT et al., 2011; THORPE et al., 2013; SARGANAS et al., 2015;

ARRAIS et al., 2016; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2019). Os analgésicos e AINEs são utilizados para o tratamento da dor aguda e crônica, e frequentemente para controlar a febre e condições inflamatórias, sintomas comumente apresentados por gestantes (OSTENSEN & SKOMSVOLL, 2004; BLACK et al., 2019). Em diversos países, mas principalmente no Brasil, estes medicamentos são de fácil aquisição devido ao preço acessível e por serem, em sua maioria, isentos de prescrição médica, o que favorece a prática da automedicação pela população e, conseqüentemente, o aumento dos riscos associados ao uso de medicamentos (BECKHAUSER et al., 2010; ARRAIS et al., 2016; MOREIRA DE BARROS et al., 2019). Como resultado do uso indiscriminado, os analgésicos e AINEs estão também entre os medicamentos mais liberados ambientalmente e estudos de monitoramento indicam possibilidade de exposição humana não intencional, o que também é motivo de grande preocupação (ASHTON et al., 2004; CAHILL et al., 2004; BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014; KRISTENSEN et al., 2016).

Os analgésicos e AINEs exercem seus efeitos terapêuticos principalmente por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostanoídes – como, por exemplo, as prostaglandinas (PGs) – mediadores envolvidos no processo da inflamação e da dor (OSTENSEN & SKOMSVOLL, 2004). O perfil das respostas terapêuticas e tóxicas exercidas pelos analgésicos é dependente das características farmacocinéticas e da seletividade do fármaco pelas duas principais isoformas da COX, COX-1 (constitutiva ou fisiológica) e COX-2 (induzida ou inflamatória). A COX-1 é expressa na maioria das células para gerar prostanoídes que modulam diversos processos fisiológicos, tais como a proteção gástrica, homeostase vascular, função renal e função plaquetária, enquanto que as respostas inflamatórias são principalmente mediadas por prostanoídes dependentes da expressão da COX-2 (VANE & BOTTING, 1998a, 1998b; BACCHI et al., 2012). Mais recentemente foi identificada uma terceira isoforma, a COX-3, expressa no cérebro, medula espinhal e coração. Estudos têm demonstrado que os efeitos analgésicos e antipiréticos do paracetamol e da dipirona se dão principalmente via inibição da biossíntese de PGs por meio do bloqueio da COX-3 no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo mais potentes em inibir COX-3 do que as demais isoformas (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; JASIECKA et al., 2014).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro*, em diferentes modelos e sistemas, indicam que os analgésicos e AINEs como o paracetamol, o ácido acetilsalicílico, a indometacina e o ibuprofeno apresentam potencial para atuarem como desreguladores endócrinos antiandrogênicos, ou seja, inibindo a produção dos hormônios sexuais masculinos, como a testosterona (KRISTENSEN et al., 2011, 2012; ALBERT et al., 2013; DEAN et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; HOLM et al., 2015; VAN DEN DRIESCHE et al., 2015; BEN MAAMAR et al., 2017; ROSSITTO et al., 2019a). Estudos ecotoxicológicos também indicam que estes fármacos podem desregular sistemas hormonais em organismos aquáticos (GUILOSKI et al., 2017; GODOI et al., 2020). Os efeitos observados são preocupantes, uma vez que a exposição intrauterina a substâncias antiandrogênicas tem sido reportada como um dos fatores envolvidos no possível aumento de distúrbios do trato reprodutivo masculino. Dados epidemiológicos e experimentais indicam que a deficiência androgênica decorrente da exposição analgésica durante o período crítico de diferenciação sexual, o que corresponde a janela entre a 8ª e a 14ª semanas de gestação em seres humanos, pode levar ao desenvolvimento de criptorquidismo (não descida dos testículos ao escroto), hipospádias (abertura da uretra na face ventral do pênis), redução da distância anogenital (AGD – biomarcador de exposição androgênica pré-natal), comprometimento da fertilidade e alterações comportamentais (JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011, 2012; SNIJDER et al., 2012; HOLM et al., 2015; FISHER et al., 2016; HAY-SCHMIDT et al., 2017; LIND et al., 2017; ROSSITTO et al., 2019a; PEREIRA et al., 2020).

Além dos distúrbios reprodutivos masculinos, têm aumentado o número de evidências experimentais sugerindo que os analgésicos podem ter propriedades desreguladoras endócrinas capazes de alterar a função reprodutiva feminina humana e animal. A exposição analgésica intrauterina têm sido associada com a redução do número de células germinativas e atraso na entrada meiótica no período fetal, além da redução do tamanho dos ovários e do número de folículos na puberdade e na idade adulta, podendo levar ao comprometimento da fertilidade (DEAN et al., 2016; HOLM et al., 2016; ARENDRUP et al., 2018; LEVERRIER-PENNA et al., 2018; ROSSITTO et al., 2019b; ALEIXO et al., 2020).

Assim como outros desreguladores endócrinos, os efeitos decorrentes da exposição analgésica no período pré-natal são considerados fatores de risco para graves consequências que podem ser observadas apenas na idade adulta do

indivíduo exposto. Muitos efeitos tardios têm sido observados, principalmente o aumento da taxa de infertilidade, além de outras alterações funcionais e estruturais, como diminuição da contagem espermática, baixa qualidade do sêmen, redução das reservas ovarianas, menopausa prematura e aumento da incidência de câncer testicular, mamário e endometrial (SKAKKEBAEK et al., 2001; GORE et al., 2015; ARENDRUP et al., 2018). Alguns estudos mais recentes têm avaliado os efeitos da exposição analgésica *in utero* no desenvolvimento pós-natal da prole e na saúde reprodutiva do animal adulto, enquanto outros têm avaliado mais a longo prazo as consequências intergeracionais (DEAN et al., 2016; ROSSITTO et al., 2019a, 2019b; ALEIXO et al., 2020; KREBS RIBEIRO et al., 2020; PEREIRA et al., 2020). Estes dados têm sugerido que o uso de analgésicos durante períodos críticos da diferenciação sexual podem afetar o desenvolvimento da linhagem germinativa tanto de machos quanto de fêmeas, ocasionando efeitos adversos que podem ser transmitidos aos descendentes, afetando a fertilidade da primeira geração (exposta *in utero*), mas também de gerações subsequentes (DEAN et al., 2016; ROSSITTO et al., 2019a, 2019b).

Diante deste contexto, a crescente exposição a desreguladores endócrinos nas últimas décadas tem sido apontada como um dos fatores envolvidos no possível declínio da função reprodutiva humana. Como os efeitos tardios são observados somente um longo período após a exposição, e os dados epidemiológicos sobre seus riscos ainda são escassos e restritos, os estudos experimentais têm sido de grande utilidade e importância para a identificação das substâncias com potencial para interagir com o sistema endócrino e consequente avaliação dos riscos para a saúde reprodutiva humana e animal.

Embora a maioria dos analgésicos e AINEs atuem por mecanismos farmacológicos semelhantes, estes medicamentos não apresentam o mesmo perfil de toxicidade endócrina e reprodutiva. Muitos estudos têm demonstrado que há uma variabilidade significativa de respostas em diferentes modelos experimentais devido às diferentes “assinaturas biológicas” induzidas por analgésicos (KRISTENSEN et al., 2011, 2012; DEAN et al., 2013; AXELSTAD et al., 2014; BEN MAAMAR et al., 2017). Estas observações sugerem que cada fármaco pode induzir distúrbios reprodutivos por meio de um ou mais mecanismos de desregulação endócrina. No entanto, os mecanismos associados à insuficiência androgênica e outras

perturbações induzidas pelo paracetamol e outros analgésicos ainda permanecem indefinidos.

Um dos principais mecanismos propostos é que estes fármacos podem desregular a função ovariana e testicular por meio da inibição das prostaglandinas, alvo farmacológico dos AINEs, durante períodos críticos para a diferenciação sexual e gonadal (KRISTENSEN et al., 2011; DEAN et al., 2016). Sabe-se que as prostaglandinas possuem papel fundamental na regulação de diversas funções no sistema reprodutor, incluindo a ovulação, a fertilização, o parto e a espermatogênese (SALES E JABBOUR, 2003; GAYTAN et al., 2006; BAYNE et al., 2009; SUGIMOTO et al., 2015; UZUN et al., 2015). Contudo, a relação entre a inibição das prostaglandinas, a supressão da produção de testosterona e outros distúrbios hormonais ainda não é clara. Portanto, é possível que os analgésicos possam alterar a esteroidogênese por meio de mecanismos que são independentes da supressão de prostaglandinas. Por exemplo, os efeitos dos analgésicos nos ovários e nos testículos também podem ser resultado da ativação do sistema endocanabinoide, conhecido por estar envolvido na regulação de algumas funções reprodutivas e na biossíntese de hormônios esteroides (GYE et al., 2005; MECCARIELLO et al., 2014; KAMALI et al., 2016; CASTEL et al., 2020).

Alguns destes fármacos podem atuar diretamente sobre as células de Leydig fetais e induzir múltiplos distúrbios hormonais, incluindo a supressão do fator semelhante à insulina-3 (INSL-3), comprometendo a descida do testículo ao escroto, e a supressão da produção de testosterona (KRISTENSEN et al., 2011; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; VAN DEN DRIESCHE et al., 2015). Outros dados indicam que os efeitos dos analgésicos nos ovários e testículos podem ser provenientes de desequilíbrios na relação androgênio-estrogênio alterando a expressão ou a atividade de enzimas esteroidogênicas essenciais, como CYP17A1, que é crucial na síntese de androgênios, e CYP19 (enzima aromatase), que converte testosterona em estradiol (HAN et al., 2010; TINWELL et al., 2013; HOLM et al., 2015). Possivelmente outros mecanismos ainda desconhecidos estejam associados e, vale ressaltar que a variabilidade das respostas também pode ser influenciada pela dose, duração do tratamento e tempo de exposição, o que irá determinar o espectro dos efeitos observados.

2.2 EXPOSIÇÃO A ANALGÉSICOS NO PERÍODO GESTACIONAL

A dor no período gestacional é bastante comum e pode se manifestar como resultado de alterações anatômicas e fisiológicas associadas à gravidez, devido a causas não obstétricas ou pode estar relacionada a condições crônicas pré-existentes que requerem o uso contínuo de analgesia (ARAGÃO & TOBIAS, 2019; BLACK et al., 2019). Neste contexto, o uso de analgésicos durante a gestação geralmente é muito alto, pois eles são frequentemente utilizados para tratar sintomas comuns e, em sua maioria, podem ser adquiridos e usados sem a necessidade de uma consulta/receita médica ou orientação farmacêutica (DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2019).

Praticamente todas as mulheres experimentam algum desconforto durante a gestação e estima-se que cerca de 25% delas apresentem ao menos sintomas temporários. A enxaqueca, por exemplo, é um sintoma que afeta aproximadamente entre 25% a 40% das mulheres em idade reprodutiva, tornando-se necessária a utilização de um analgésico para o alívio da dor (AMUNDSEN et al., 2015; CALHOUN, 2017; HARRIS et al., 2017). As dores musculoesqueléticas representam um dos problemas mais comuns relacionados à gestação, sendo a dor lombar e pélvica as principais queixas de desconforto, e são problemas que tendem a aumentar a medida que a gravidez avança (CASAGRANDE et al., 2015; LIDDLE & PENNICK, 2015; DUARTE et al., 2018; ARAGÃO, 2019; MEUCCI et al., 2020). As dores podem ser incapacitantes se não forem tratadas adequadamente, além de comprometer as atividades diárias das gestantes e, conseqüentemente, afetar sua qualidade de vida. Desta maneira, é indispensável a adoção de medidas farmacológicas ou não farmacológicas para o alívio dos sintomas apresentados (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2011).

Assim como outros medicamentos, os analgésicos devem ser utilizados com cautela durante a gestação, avaliando-se criticamente a relação entre os benefícios terapêuticos e os riscos à saúde materna e fetal. O manejo da dor na gestação é difícil, pois ao mesmo tempo que os analgésicos podem aumentar o risco de efeitos adversos, a dor mal controlada é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de estados de dor crônica, podendo desencadear outras condições como estresse materno, privação de sono, depressão e/ou hipertensão, com possíveis conseqüências negativas para a mãe e o bebê (BLACK et al., 2019). Desta forma, o tratamento deve ser adaptado para a menor dose terapêutica e a

duração mais curta possível com acompanhamento dos sintomas e das respostas terapêuticas. Além disso, as alterações fisiológicas associadas à gestação afetam a farmacocinética e a farmacodinâmica dos medicamentos, de modo que analgésicos que são considerados seguros e eficazes em mulheres não grávidas, podem ter um perfil consideravelmente diferente durante a gravidez podendo alterar a resposta farmacológica esperada (WUNSCH et al., 2003; BLACK et al., 2019).

Apesar de serem contra-indicados e de algumas mulheres evitarem a analgesia durante a gestação devido à preocupações com a segurança do bebê, estudos em diferentes países indicam alta prevalência de uso de analgésicos e AINEs por mulheres neste período. Uma pesquisa que investigou a prevalência do uso de medicamentos na gestação nos Estados Unidos da América (EUA), indicou que o uso do paracetamol no primeiro trimestre foi reportado por 56% das mulheres entrevistadas, enquanto o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico foram usados por 24% e 5% gestantes, respectivamente (THORPE et al., 2013). Outro estudo, realizado na Dinamarca, indicou o uso do paracetamol por 54% das gestantes entrevistadas (REBORDOSA et al., 2008). Neste mesmo país, uma outra publicação indicou que os analgésicos foram utilizados durante a gestação por 55,5% das mulheres entrevistadas, sendo que o paracetamol foi utilizado por 46,9% das participantes, enquanto o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno foram utilizados por 7,1% e 4%, respectivamente. Além disso, 6% das gestantes relataram o uso simultâneo de mais de um analgésico. Os principais motivos para o uso de analgésicos foram dores de cabeça e dores musculares (KRISTENSEN et al., 2011). Uma outra pesquisa, realizada em maternidades de hospitais universitários na França, indicou o uso de analgésicos por 81% das mulheres durante a gestação (PHILIPPAT et al., 2011). Estudos em países em desenvolvimento também já demonstraram um consumo bastante elevado de analgésicos por mulheres no período gestacional (MASHAYEKHI et al., 2009; KASSAW E WABE, 2012).

Os analgésicos e AINEs atravessam a barreira placentária (SIU et al., 2000; WUNSCH et al., 2003) e seu uso normalmente não é indicado durante a gestação, uma vez que está associado ao aumento do risco de aborto espontâneo no início da gestação (OSTENSEN & SKOMSVOLL, 2004; LI et al., 2018; YING et al., 2021) e, particularmente, porque a administração durante o final da gestação pode afetar a fisiologia da gravidez e do feto. A inibição sistêmica da síntese de prostaglandinas durante o terceiro trimestre pode causar a constrição do canal arterial, estrutura

vascular fetal essencial responsável pela conexão entre a artéria pulmonar e a aorta, podendo comprometer a circulação fetal e causar hipertensão pulmonar em recém-nascidos. Outro efeito associado à inibição de prostaglandinas no feto é o comprometimento da função renal, que pode resultar em diminuição da produção de urina fetal e, conseqüentemente, a diminuição da produção de líquido amniótico (oligoidrâmio). Além disso, pode haver retardo no trabalho de parto, bem como um risco aumentado de hemorragia durante o parto devido a inibição irreversível da COX e conseqüente inibição da ativação plaquetária, efeito mais relacionado ao uso de ácido acetilsalicílico (SCHOENFELD et al., 1992; RATHMELL et al., 1997; ANTONUCCI et al., 2012; SERVEY & CHANG, 2014).

O paracetamol é considerado o analgésico de primeira escolha para uso na gestação por não ser um anti-inflamatório típico e não causar muitos dos efeitos adversos causados pelos AINEs. Estudos indicam que o uso do paracetamol aumentou nos últimos anos e permanece elevado. Estima-se que este fármaco seja utilizado por aproximadamente 50 a 70% das mulheres em algum momento durante a gravidez (WERLER et al., 2005; REBORDOSA et al., 2008; THORPE et al., 2013; LIND et al., 2017; BERTOLDI et al., 2020; NAVARRO-LAFUENTE et al., 2021). Apesar de ser considerado mais seguro do que os demais analgésicos, o paracetamol não está livre de toxicidade e a sua crescente utilização por gestantes tem levantado preocupações sobre seus possíveis efeitos adversos ao feto (BAUER et al., 2021).

Estudos experimentais e epidemiológicos sugerem que a exposição pré-natal ao paracetamol pode alterar o desenvolvimento fetal, o que pode aumentar os riscos de alguns distúrbios do neurodesenvolvimento, como transtorno de déficit de atenção e hiperatividade e autismo, além de distúrbios urogenitais e reprodutivos. Seu uso também está associado a aborto espontâneo, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer, problemas no trato respiratório (asma) e infertilidade (JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011; SNIJDER et al., 2012; ALBERT et al., 2013; LIEW et al., 2014; AMINOSHARIAE E KHAN, 2015; SORDILLO et al., 2015; DEAN et al., 2016; MASARWA et al., 2018; BAUER et al., 2021).

Diante deste contexto, é importante ressaltar que além da automedicação, existe uma exposição não intencional que pode ocorrer por meio da ingestão dos resíduos de analgésicos em alimentos e na água (STUMPF et al., 1999; KIM et al., 2014; HANAFIAH et al., 2021). Existe uma crescente preocupação com a presença

de substâncias químicas em ambientes aquáticos e seus possíveis impactos ambientais e sobre a saúde humana e animal. Pesquisadores em diversos países detectaram concentrações residuais de medicamentos, entre eles analgésicos e AINEs, em águas naturais e em efluentes de estações de tratamento de esgoto (BUSER et al., 1999; STUMPF et al., 1999; BILA E DEZOTTI, 2003; ASHTON et al., 2004; CAHILL et al., 2004; SANTOS et al., 2013; BOUISSOU-SCHURTZ et al., 2014; EBELE et al., 2016; MELLO et al., 2021; ŚWIACKA et al., 2021). Após a administração, uma parte significativa dos fármacos e seus metabólitos é excretada no esgoto doméstico e hospitalar, além dos resíduos provenientes das indústrias farmacêuticas e do descarte incorreto de medicamentos, que são outras fontes de contaminação ambiental. Muitos destes contaminantes são persistentes no meio ambiente e resistem aos processos de tratamento de água e esgoto (MELLO et al., 2021; ŚWIACKA et al., 2021).

Desta maneira, a exposição analgésica durante a gestação pode ocorrer diretamente pelo uso terapêutico do medicamento e/ou indiretamente por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. Esta exposição concomitante é particularmente preocupante pois a interação entre diversas substâncias, que podem agir por múltiplos mecanismos de ação, pode potencializar os efeitos de desregulação endócrina e, por consequência, afetar de maneira irreversível a saúde humana e animal como um todo, especialmente a saúde reprodutiva.

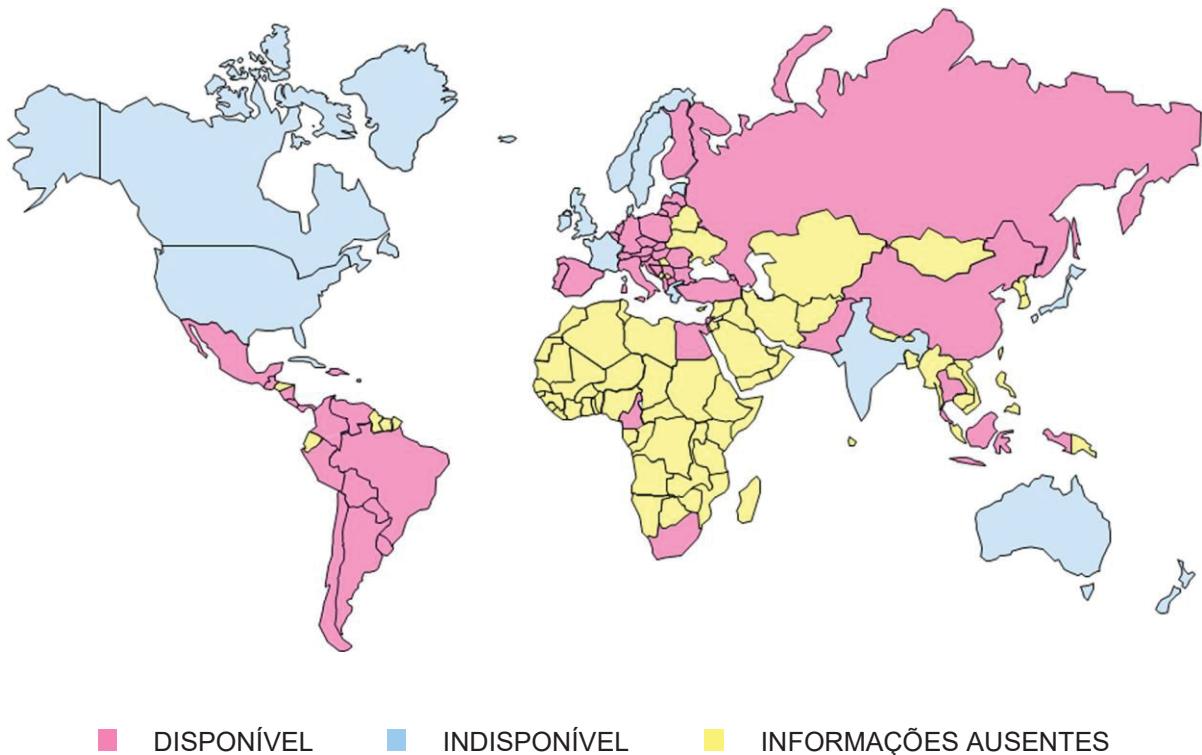
2.3 DIPIRONA

A dipirona, conhecida como metamizol (1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometanossulfônico), é um derivado pirazolônico não-opioide que possui propriedades analgésicas, antipiréticas e antiespasmódicas, frequentemente utilizada para tratamento da dor aguda ou crônica e febre. A dipirona foi sintetizada na Alemanha pela Hoechst AG em 1920 e no ano seguinte foi comercializada como a primeira pirazolona de uso clínico. Desde 1922, quando foi introduzida no Brasil sob o nome de Novalgina® pelo laboratório Sanofi Aventis®, sua comercialização tornou-se mundialmente crescente até a década de 1970 (CHETLEY, 1993). Apesar de a dipirona ser geralmente bem tolerada, foi retirada do mercado nos Estados Unidos, Austrália, Japão e em alguns países europeus ou passou a ser utilizada com restrições devido a possíveis associações com discrasias sanguíneas como

agranulocitose, uma alteração caracterizada por uma redução significativa da contagem de leucócitos granulócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos), e anemia aplástica, caracterizada pela produção insuficiente de células sanguíneas na medula óssea (HEDENMALM & SPIGSET, 2002; ANDRADE et al., 2016; HOFFMANN et al., 2020a).

Diante destas evidências, surgiram alguns estudos demonstrando que os riscos de agranulocitose na realidade são mínimos e comuns a todos os medicamentos pertencentes à essa classe, além de serem dependentes de fatores como predisposição genética, altas doses ou exposição contínua. Em 1986 foram publicados os dados do Estudo de Boston pelo “*International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study*” (IAAAS), um estudo epidemiológico que procurou analisar a associação entre o uso de dipirona e agranulocitose. Foi conduzido em sete países (Alemanha, Itália, Espanha, Hungria, Israel, Bulgária e Suécia) de 1980 a 1984, incluindo 300 hospitais e 22,2 milhões de pessoas, e concluiu que o risco estimado para agranulocitose entre os usuários de dipirona era baixo. Segundo a IAAAS, a incidência estimada da agranulocitose é aceitável, pois corresponde a mais ou menos 4,4 casos por milhão de pessoas por ano. De fato, o risco de agranulocitose deve ser entendido no contexto dos riscos associados com o uso de outros analgésicos e medicamentos de outras classes que estão associados com discrasias sanguíneas (CHETLEY, 1993; BENSEÑOR, 2005). Apesar disso, a dipirona ainda é comercializada e amplamente utilizada em alguns países da Europa, América do Sul, África e Ásia (FIGURA 1) – (BAR-OZ et al., 2005; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009; HOFFMANN et al., 2015; PIZZOL et al., 2016).

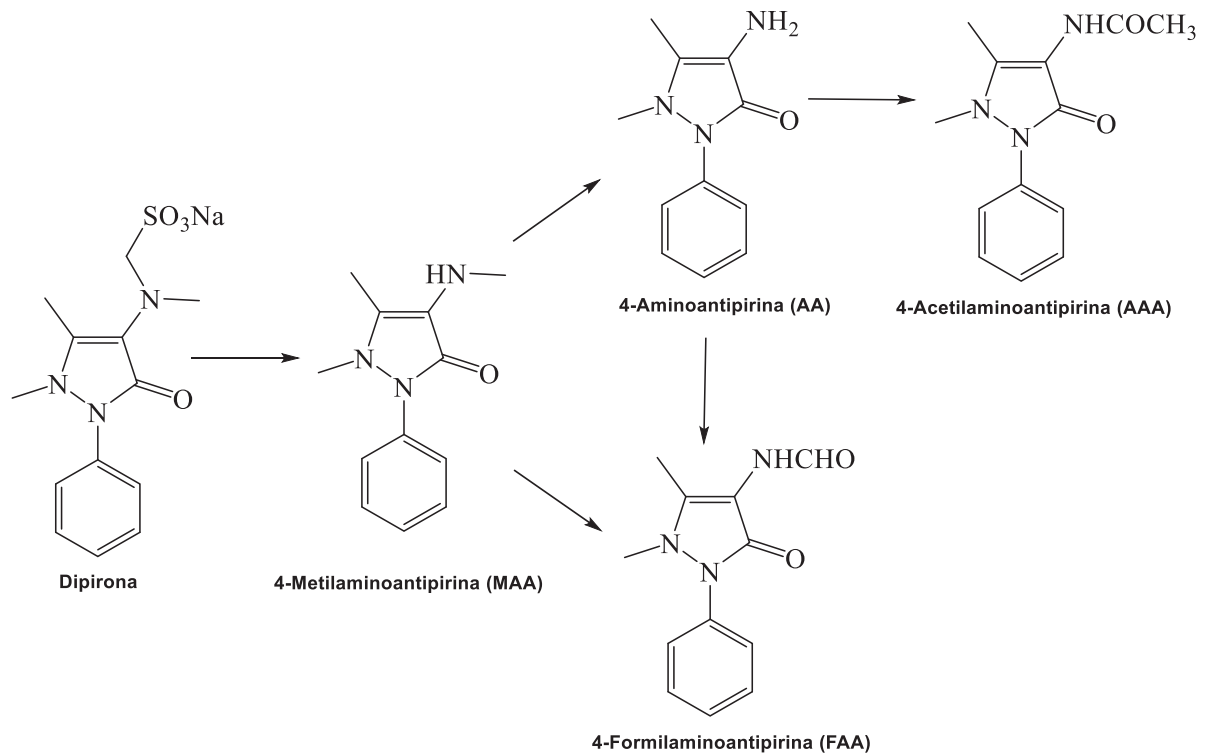
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DOS PAÍSES ONDE A DAPIRONA ENCONTRA-SE DISPONÍVEL NO MERCADO



FONTE: Stammschulte et al. (2015).

A dipirona é um pró-fármaco que após administração oral é rapidamente hidrolisada no trato gastrointestinal para o seu metabólito primário 4-Metilaminoantipirina (MAA), que é prontamente absorvido, metabolizado no fígado e convertido em outros metabólitos, como 4-Aminoantipirina (AA), 4-Formilaminoantipirina (FAA) e 4-Acetilaminoantipirina (AAA) – (FIGURA 2). Os metabólitos MAA e AA são farmacologicamente ativos e responsáveis pelo efeito analgésico, enquanto que os metabólitos FAA e AAA possuem pouca atividade farmacológica (WEITHMANN E ALPERMANN, 1985; LEVY et al., 1995).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA DIPIRONA



FONTE: O autor (2017).

O mecanismo farmacológico responsável pelo efeito analgésico dos metabólitos ativos é complexo e ainda não está completamente elucidado. Acredita-se que provavelmente se dê por meio da inibição não seletiva das isoformas da COX, especialmente COX-3, inibindo a síntese de prostaglandinas tanto na periferia quanto no Sistema Nervoso Central. No entanto, outros mecanismos de ação têm sido propostos, como a ativação do sistema opioidérgico e do sistema endocanabinoide (ROGOSCH et al., 2012; JASIECKA et al., 2014; CRUNFLI et al., 2015; TOPUZ et al., 2020) ou então, a atuação por meio de um mecanismo de bloqueio direto da hiperalgisia inflamatória periférica, estimulando a via de arginina/GMPc nos neurônios sensoriais (LORENZETTI & FERREIRA, 1996). Assim, é tão eficaz quanto o paracetamol como agente analgésico e antipirético, porém, tem limitados efeitos anti-inflamatórios.

Embora a dipirona tenha sido retirada do mercado em diversos países, ainda é amplamente utilizada na medicina humana e veterinária, principalmente no Brasil, onde é um dos principais analgésicos utilizados pela população em geral,

frequentemente por automedicação (ANVISA, 2001; ARRAIS et al., 2016; FERREIRA & LOPES, 2016; PIZZOL et al., 2016; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2019; MOREIRA DE BARROS et al., 2019). Isso se deve ao fato de ser um medicamento isento de prescrição (MIP), de baixo custo, fácil acesso e que está presente em diversas e diferentes formulações farmacêuticas, sendo o analgésico de primeira escolha por boa parte da população (KNAPPMANN & MELO, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) realizou em 2001 um “Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona” com objetivo de promover esclarecimentos sobre seus riscos. Ficou estabelecido então um consenso de que a eficácia da dipirona como analgésico e antitérmico era inquestionável, que os riscos atribuídos à sua utilização eram baixos e semelhantes a outros analgésicos e AINEs disponíveis no mercado, e que os dados científicos disponíveis sobre a ocorrência destes riscos não eram suficientes para indicar alteração da sua situação regulatória (venda sem prescrição médica). Mesmo assim, ainda existia certa preocupação no Brasil com relação à ocorrência de agranulocitose, que embora seja considerada uma reação rara, pode ser grave e até mesmo fatal. Assim, ficou determinado que o seu uso deveria ser evitado na ausência de orientação profissional e, caso fosse identificada alguma reação durante seu uso, o tratamento deveria ser imediatamente interrompido e o médico consultado (ANVISA, 2001). Posteriormente, Hamerschlak et al. (2008) avaliaram a incidência de agranulocitose em países latino-americanos, locais onde a dipirona é amplamente utilizada, e demonstraram baixa incidência geral desta condição, reforçando que os casos são muito raros e que não parece ser um grande problema de saúde pública nas regiões estudadas (HAMERSCHLAK et al., 2008).

Segundo dados da mesma publicação da ANVISA (2001) citada acima, a dipirona ocupava o primeiro lugar nas vendas de analgésicos correspondendo a 31,8% do mercado, seguida pelo paracetamol (29,7%) e pelo ácido acetilsalicílico (27,1%). Neste período, existiam no país 125 produtos à base de dipirona, dos quais 71 em associação com outras substâncias, sendo que mais de 80% das vendas registradas foram feitas sem prescrição médica. Em um estudo sobre a prevalência da automedicação no Brasil, Arrais et al. (2016) demonstraram que os analgésicos foram os medicamentos mais utilizados, sendo que a dipirona ocupava o primeiro lugar (15,4%), seguida de uma associação contendo dipirona, orfenadrina e cafeína (12,2%) e do paracetamol (11,4%).

Recentemente, a Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos (CMED) e a ANVISA publicaram o Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico (edição 2019/2020), apresentando os medicamentos mais consumidos pelos brasileiros no ano de 2019. A dipirona ocupou a 1ª posição entre os analgésicos mais comercializados, seguida do ibuprofeno e do paracetamol (CMED/ANVISA, 2021). Em outro estudo, Ferreira e Lopes (2016) avaliaram a frequência de prescrição de analgésicos na prática clínica pediátrica. A dipirona estava presente em 54,6% das prescrições, seguida do ibuprofeno (26,6%) e do paracetamol (11,3%). Além disso, usos não recomendados da dipirona foram encontrados em 15% das receitas e usos contraindicados em 13,3%, sendo que em 74,3% das prescrições contendo dipirona a dose estava incorreta.

Em outro estudo mais recente realizado em um município brasileiro, Moreira de Barros et al. (2019) demonstraram que a automedicação analgésica é praticada por 78,4% dos portadores de dor crônica, sendo que 48,4% relataram o uso de dipirona ou paracetamol. Outro estudo recente que avaliou a prevalência de uso de analgésicos no Brasil, demonstrou que a dipirona foi utilizada por 37,8% dos entrevistados, seguida do paracetamol (25,3%) e diclofenaco (10,7%), não distinguindo se foi uso ocasional ou contínuo, por prescrição médica ou automedicação (DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2019). Este padrão difere do observado em estudos realizados em países onde a dipirona foi banida ou sujeita a uso restrito, como nos EUA, onde o paracetamol e o ibuprofeno destacam-se como os analgésicos mais utilizados pela população geral (BLIEDEN et al., 2014; DAVIS et al., 2017). No entanto, a dipirona é amplamente comercializada sob prescrição médica em muitos outros países, como na Alemanha, onde inclusive seu uso aumentou nos últimos anos (HOFFMANN et al., 2015; HOFFMANN & SCHMIEMANN, 2016; HOFMANN et al., 2020b).

O fato de a dipirona ter sido retirada do mercado em muitos países contribuiu para a escassez de evidências sobre a segurança deste medicamento, principalmente durante a gestação. Embora contra-indicada durante a gravidez, alguns estudos sobre o uso de medicamentos durante a gestação indicam que a dipirona é um dos analgésicos mais utilizados durante este período, principalmente por gestantes brasileiras, reportada por aproximadamente 5 a 12% das mulheres entrevistadas (MENGUE et al., 2001; FONSECA et al., 2002; GUERRA et al., 2008;

DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009; COUTO et al., 2015; LUTZ et al., 2020), mas também é utilizada por gestantes em outros países (DATHE et al., 2017).

Estudos em roedores e humanos demonstraram que os metabólitos da dipirona atravessam facilmente a barreira placentária e podem ser transferidos da mãe para o feto (GIROUX et al., 1990; ESPIRIDIÃO et al., 1996). Além disso, o uso da dipirona já foi associado ao bloqueio da divisão celular na placenta no início da gestação, principalmente durante a fase de formação e diferenciação placentária (ESPIRIDIÃO et al., 1996). Estudos já relataram um aumento do risco de tumor de Wilms, um tumor renal comum na infância, nos filhos de mulheres que tomaram dipirona durante a gestação (SHARPE E FRANCO, 1996), além de uma associação significativa entre a exposição pré-natal à dipirona e um risco aumentado de leucemia infantil (POMBO-DE-OLIVEIRA E KOIFMAN, 2006; ZANROSSO et al., 2010). Estes estudos são considerados sugestivos de possível associação, mas os resultados estão longe de serem definitivos.

Tal como acontece com outros inibidores da síntese de prostaglandinas, a dipirona também foi associada com oligodrômio e fechamento prematuro do canal arterial quando utilizada no terceiro trimestre de gestação (CATALÁN et al., 1995; SÁNCHEZ DE LA NIETA et al., 2003; WEINTRAUB & MANKUTA, 2006; ARRUZA GÓMEZ et al., 2008). Estudos que avaliaram o perfil teratogênico da dipirona não encontraram associações entre o uso deste fármaco e anomalias congênitas. Os dados sugerem que a exposição a dipirona durante o primeiro trimestre (BAR-OZ et al. 2005; DATHE et al. 2017) ou terceiro trimestre de gestação (BANHIDY et al., 2007), provavelmente não está associada com um risco aumentado de abortos espontâneos ou malformações.

Assim como a maioria dos analgésicos e AINEs, o uso da dipirona não é recomendado durante a gravidez. Segundo a ANVISA (2017), recomenda-se não utilizar a dipirona durante o primeiro trimestre de gestação. O uso durante o segundo trimestre só deve ocorrer após cuidadosa avaliação do risco-benefício e não deve ser utilizada durante o terceiro trimestre. A dipirona é atribuída à categoria de risco D na gestação, que segundo os critérios propostos pela agência norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA), significa que já existe evidência de risco para fetos humanos, mas os benefícios em certas situações podem justificar seu uso durante a gestação apesar dos riscos, porém trata-se de uma prescrição de alto risco.

A classificação de risco do uso de medicamentos durante a gestação foi implementada em 1979 e obedecia a uma categorização por letras (A, B, C, D ou X), ordenando os medicamentos em relação aos riscos potenciais de teratogenicidade dos fármacos. No ano de 2014, o FDA desenvolveu o *Pregnancy and Lactation Labeling Rule* (PLLR), que atualmente substitui a categoria previamente estabelecida e modifica várias regras para o conteúdo e formato da rotulagem de medicamentos a partir de 2015. Segundo o FDA, a categorização por letras não era clara e não abordava adequadamente as informações disponíveis, além de não levar em consideração fatores importantes como as doses administradas, a duração do tratamento e o tempo gestacional, podendo levar a interpretações incorretas e induzir erros clínicos na prescrição dos medicamentos (FDA, 2015; PERNIA & DEMAAGD, 2016).

Atualmente, a PLLR incorpora informações descritivas mais detalhadas sobre o perfil de segurança dos medicamentos durante a gestação, que requerem uma análise mais crítica dos profissionais de saúde ao avaliar o caso de cada paciente. A PLLR abrange todo o período da gestação, o trabalho de parto, o parto e também fornece orientações para mulheres e homens em idade reprodutiva, sugerindo efeitos associados ao fármaco na fertilidade e/ou efeitos de perdas pré-implantação. Assim como a categorização por letras, considera os efeitos de teratogenicidade mas também outros efeitos adversos fetais, descrevendo detalhadamente o dano potencial, sua frequência e gravidade, e descreve também os riscos fetais de não tratar a doença (FDA, 2015). Apesar de a categoria de risco por letras não estar mais em vigor, ainda é utilizada principalmente no Brasil como uma orientação para pacientes e prescritores na avaliação do risco-benefício.

Assim como a maioria dos medicamentos, a dipirona não deve ser utilizada por gestantes sem orientação médica, e as mesmas devem ser informadas sobre os riscos potenciais para o feto. No entanto, muitas mulheres fazem uso da dipirona sem recomendação ou orientação médica e/ou farmacêutica, em qualquer período da gestação, e na maioria das vezes, sem ter conhecimento dos possíveis riscos provenientes da sua utilização. Além disso, considerando que a dipirona é o principal analgésico utilizado pela população brasileira, é possível que muitas mulheres utilizem este fármaco no início da gestação, quando ainda não sabem que estão grávidas. O uso inadvertido é preocupante do ponto de vista de desregulação

endócrina, pois muitos dos processos de desenvolvimento pré-natal dependentes de hormônios, como a diferenciação sexual, ocorrem no início da gestação.

Em um estudo publicado pelo nosso grupo, Passoni et al. (2018) avaliaram os efeitos da dipirona e seus principais metabólitos, 4-Metilaminoantipirina (MAA) e 4-Aminoantipirina (AA), na esteroidogênese *in vivo* e *in vitro*. Os resultados indicaram inibição *in vitro* da conversão de progestágenos em andrógenos, resultando na inibição significativa da produção de testosterona, mas apenas em altas concentrações. No entanto, não foram observados efeitos sobre a produção de testosterona testicular fetal de ratos expostos *in utero* à dipirona. Em outro estudo mais recente, Passoni et al. (2021) investigaram as atividades (anti)estrogênicas *in vivo* e *in vitro* da dipirona. Os resultados não indicaram atividades agonísticas ou antagonísticas significativas deste fármaco ou de seus principais metabólitos nos receptores de estrogênio. No entanto, os dados sobre a dipirona na gestação ainda são muito escassos e inconclusivos, e mais estudos se fazem necessários para avaliar seus possíveis riscos para a mãe e o feto.

2.4 AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DESREGULADORAS ENDÓCRINAS EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E MODELOS ANIMAIS

A avaliação de substâncias desreguladoras endócrinas é regulamentada por agências regulatórias internacionais que desenvolvem estratégias para a triagem e avaliação de substâncias que podem afetar o sistema endócrino, estabelecendo protocolos para os estudos de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento. Dentre os testes propostos por estas agências, estão incluídos ensaios *in vitro*, baseados em possíveis mecanismos de ação, como ligação em receptores ou interferência com a produção de hormônios, mas que não levam em consideração os aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos que ocorrem no organismo intacto.

Após estes testes, são recomendados estudos *in vivo* para avaliar os efeitos adversos dos potenciais desreguladores endócrinos identificados anteriormente, que por outro lado, podem detectar substâncias que atuam por mecanismos não diretamente relacionados aos receptores, como a interferência na síntese, conversão, liberação e transporte dos hormônios. Além disso, os estudos *in vivo* permitem avaliar os efeitos da exposição *in utero* durante todos os estágios de desenvolvimento da prole, desde o período pré-natal, na lactação, e até a idade

adulta (BAKER, 2001; KOLLE et al., 2012). Embora haja um esforço mundial na tentativa de desenvolver métodos alternativos para a substituição e/ou redução do uso de animais de laboratório, os testes *in vivo* ainda são necessários para a avaliação dos riscos à saúde humana.

Muitos estudos epidemiológicos corroboram os achados em estudos utilizando animais de laboratório e indicam associações entre a exposição a muitas substâncias e diversos desfechos reprodutivos. As avaliações de exposição podem ser realizadas por meio de entrevistas com voluntários recrutados em pesquisas ou por meio da quantificação dos agentes químicos e/ou seus metabólitos em amostras biológicas (biomonitoramento).

Neste contexto, alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado associações entre a exposição a diversos agentes químicos ambientais e medicamentos e endpoints reprodutivos não-invasivos, como medidas genitais em recém-nascidos. Alguns destes marcadores anatômicos, como a distância anogenital (AGD), refletem o ambiente androgênico pré-natal e são suscetíveis a ação de desreguladores endócrinos. Estudos indicam associações negativas entre a exposição materna a ftalatos (SWAN et al., 2005, 2015) e ao paracetamol (FISHER et al., 2016; LIND et al., 2017) e a AGD em recém-nascidos do sexo masculino, corroborando as evidências de efeitos antiandrogênicos destas substâncias em modelos experimentais.

No Brasil existem poucos estudos nas áreas de epidemiologia ambiental e reprodutiva. O Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR), projeto coordenado pelo Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e em andamento desde 2014, tem como objetivo avaliar a exposição de gestantes de Curitiba a agentes químicos ambientais e a prevalência do uso de analgésicos e AINEs durante o período gestacional, assim como possíveis associações entre a exposição a estes agentes e desfechos reprodutivos em recém nascidos. Adicionalmente, um programa de educação em saúde ambiental é realizado com as gestantes participantes, com o objetivo de alertar sobre os riscos e minimizar a exposição a medicamentos e agentes químicos ambientais. Inicialmente, foi realizado um estudo coorte gestacional piloto com 50 gestantes (BERTONCELLO SOUZA et al., 2018) e o estudo principal foi desenvolvido posteriormente, de março de 2018 a março de 2020.

Desta forma, a combinação de estudos toxicológicos de avaliação de desregulação endócrina em modelos experimentais com estudos epidemiológicos que investiguem exposições a substâncias químicas ambientais e medicamentos e possíveis desfechos de saúde associados a tais exposições, é fundamental para a avaliação dos riscos à saúde reprodutiva humana.

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos indicam que a exposição pré-natal a desreguladores endócrinos, incluindo alguns analgésicos e AINEs de uso comum, pode levar a graves distúrbios endócrinos e reprodutivos. Devido à alta prevalência de uso de analgésicos durante a gestação, existe uma preocupação com os possíveis riscos associados à exposição pré-natal a estes medicamentos. A dipirona é o principal analgésico utilizado no Brasil (ANVISA, 2001; ARRAIS et al., 2016; FERREIRA & LOPES, 2016; PIZZOL et al., 2016; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2019; MOREIRA DE BARROS et al., 2019) e, embora o paracetamol seja o analgésico recomendado para uso durante a gestação, alguns estudos demonstram ampla utilização da dipirona neste período (MENGUE et al., 2001; FONSECA et al., 2002; GUERRA et al., 2008; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009; COUTO et al., 2015; DATHE et al., 2017; LUTZ et al., 2020).

O fato de a dipirona ter sido retirada do mercado ou ser utilizada com restrições em muitos países em virtude de sua associação com discrasias sanguíneas, contribuiu para a escassez de evidências sobre a segurança deste medicamento, incluindo efeitos sobre a função reprodutiva (DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009). Isto é ilustrado pela ausência de estudos sobre os possíveis efeitos endócrinos da dipirona a despeito de dados que indicam que outros analgésicos de uso comum como o paracetamol, o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno podem atuar como desreguladores endócrinos (KRISTENSEN et al., 2011, 2012; SNIJDER et al., 2012; ALBERT et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; DEAN et al., 2013, 2016; HOLM et al., 2015, 2016; BEN MAAMAR et al., 2017; LIND et al., 2017; ROSSITTO et al., 2019a, 2019b).

Ao mesmo tempo que o uso da dipirona não é recomendado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres utilizam este fármaco ao longo deste

período e há um risco para a exposição inadvertida. Portanto, tendo em vista a susceptibilidade de organismos imaturos a perturbações endócrinas e a possibilidade da exposição pré-natal a este analgésico, a investigação dos seus possíveis efeitos desreguladores endócrinos é fundamental para identificar e caracterizar riscos à saúde reprodutiva humana. Dadas as evidências experimentais de desregulação endócrina desta classe de medicamentos, a avaliação da prevalência de uso de analgésicos por gestantes e a investigação dos seus possíveis efeitos desreguladores endócrinos é essencial para a avaliação dos riscos do uso gestacional destes fármacos. Tais estudos são particularmente necessários em países como o Brasil, onde a automedicação é um hábito comum entre a população geral, os dados de prevalência de uso de medicamentos na gestação são escassos, e o perfil de analgésicos vendidos e consumidos difere de outros países, como demonstrado pela alta prevalência do uso da dipirona pela população brasileira.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência de uso dos principais analgésicos e AINEs – dipirona, paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico e diclofenaco – por gestantes de Curitiba participantes do Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução (CUIDAR) e investigar os efeitos reprodutivos da dipirona em ratos machos e fêmeas expostos *in utero* entre os dias 10 e 21 de gestação, com foco no desenvolvimento pós-natal da prole desde o nascimento até a idade adulta.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Estudo epidemiológico

- Avaliar a prevalência de uso de analgésicos e AINEs no início da gestação (\leq 16 semanas) por meio de questionário aplicado no recrutamento de gestantes do CUIDAR em unidades de saúde de Curitiba.
- Avaliar associações entre o uso de analgésicos e AINEs na gestação e fatores sociodemográficos e de estilo de vida.

4.2.2 Estudo toxicológico em modelo animal

- Avaliar os efeitos do tratamento com a dipirona sobre parâmetros da gestação e viabilidade dos filhotes.
- Avaliar os marcadores externos do desenvolvimento sexual da prole exposta *in utero*: distância anogenital e número de mamilos em machos e fêmeas.
- Avaliar marcadores do início da puberdade: separação prepucial em machos e abertura do canal vaginal e primeiro estro em fêmeas.
- Avaliar o impacto da exposição pré-natal à dipirona sobre parâmetros reprodutivos na idade adulta:
 - Nos descendentes do sexo feminino avaliar a regularidade do ciclo estral, o peso de órgãos reprodutivos, quantificação sérica de progesterona e histologia do útero e dos ovários.
 - Nos descendentes do sexo masculino avaliar o peso de órgãos reprodutivos, produção espermática, quantificação sérica de testosterona e histologia dos testículos e epidídimos.
- Avaliar a expressão gênica de marcadores moleculares da função reprodutiva em ovários, testículos e vesícula seminal pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR).

5 ARTIGO CIENTÍFICO 1 – “Prevalence and predictors of early gestation use of analgesics in a Brazilian population”

Artigo submetido ao periódico *Reproductive Toxicology*

Prevalence and predictors of early gestation use of analgesics in a Brazilian population

Marcella Tapias Passoni^a, Mariana Regina Rompkovski^b, Vitória Aline Santana Rios^b, Daniele Cristine Krebs Ribeiro^a, Amanda Atuati Maltoni^b, Carla Giovana Basso^b, Sara Emilia Lima Tolouei^a, Juliana Machado Franco^b, Bianca Manfroi da Silva^b, Anderson Joel Martino-Andrade^{a,b}, and the CARES Study Group^c

^aReproductive Toxicology Laboratory, Department of Pharmacology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^bAnimal Endocrine and Reproductive Physiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^cMembers of the CARES study group are listed at the end of the article.

Corresponding author:

Anderson J. Martino-Andrade

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico – Jardim das Américas, ZIP 81531-980, Curitiba – PR, PO Box 19031, Brazil.

Phone: + 55 (41) 33611719 / Fax: + 55 (41) 33611714

E-mail: anderson.andrade@ufpr.br

Abstract

Although generally not recommended during gestation, some studies indicate a high prevalence of analgesic use by pregnant women. Here, we assessed the prevalence of early pregnancy analgesic use in a Brazilian population and potential sociodemographic and lifestyle predictors. Pregnant women up to 16 weeks gestation (N = 275) were recruited in Curitiba (Brazil) and specifically asked about the use of paracetamol, dipyron, ibuprofen, acetylsalicylic acid, and diclofenac, including their most common brand names, as well as indications of use. The consumption of any analgesic since the start of pregnancy was reported by 61.5% of women, and usually to treat headaches. Paracetamol was the most used analgesic (55.3%), followed by dipyron (13.5%) and ibuprofen (12%), and the use of more than one analgesic was reported by 18.5% of participants. The self-reported health status was a significant predictor. Women reporting fair/poor health were more likely to use any analgesic and paracetamol than those who reported good/excellent health status. Among paracetamol users, women reporting the consumption of paracetamol combined to other analgesics ingested more paracetamol pills than those participants who reported the use of paracetamol-only. Similarly, the use of pharmaceuticals other than analgesics was also positively associated with the heavy use of paracetamol. Overall, the high prevalence of early pregnancy analgesic use, in particular paracetamol and combinations of different analgesics, is a cause of concern especially considering the well-established risks of analgesic use during pregnancy and other potential risks such as endocrine disruption and adverse neurodevelopmental outcomes.

Keywords: Analgesics; paracetamol; dipyron; ibuprofen; pregnancy.

1. Introduction

Mild analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most used pharmaceuticals worldwide, usually as self-medication (Beckhauser et al., 2010; Dale et al., 2015; Sarganas et al., 2015; Arrais et al., 2016; da Silva Dal Pizzol et al., 2019; Moreira de Barros et al., 2019). In addition to the widespread use by the general population, studies in different countries indicate a high prevalence of analgesic use by pregnant women, and occasionally, simultaneous use of more than one analgesic (McKenna e McIntyre, 2006; Rebordosa et al., 2008; Kristensen et al., 2011; Philippat et al., 2011; Thorpe et al., 2013). These drugs are frequently used to relieve acute and chronic pain, and often to control fever and inflammatory conditions, symptoms commonly experienced during the gestational period (Ostensen & Skomsvoll, 2004; Black et al., 2019). In most countries, analgesics are of easy acquisition since they are available as over-the-counter drugs and usually at affordable prices, which increases self-medication practice and, consequently, the risks associated with their use, especially during pregnancy.

Analgesics and NSAIDs are able to cross the placenta (Wunsch et al., 2003) and their use is not indicated during gestation unless the benefits outweigh the risks for mother and fetus. Its use is associated with spontaneous abortion, premature closure of the ductus arteriosus, impaired fetal renal function, oligohydramnios, and delayed labor (Schoenfeld et al., 1992; Rathmell et al., 1997; Antonucci et al., 2012; Servey & Chang, 2014; Li et al., 2018; Ying et al., 2021). Paracetamol is the most frequently used drug for analgesia during pregnancy as it does not cause many of the aforementioned adverse effects. It is estimated that approximately 50 to 70% of women use paracetamol at some point during the gestation period (Werler et al., 2005; Rebordosa et al., 2008; Kristensen et al., 2011; Thorpe et al., 2013; Lind et al., 2017; Bertoldi et al., 2020; Navarro-Lafuente et al., 2021). Although paracetamol is considered appropriate for use during pregnancy when medically indicated, recent studies suggest that prenatal exposure to this drug appears to be associated with neurodevelopmental, respiratory, urogenital, and reproductive disorders (Jensen et al., 2010; Kristensen et al., 2011; Snijder et al., 2012; Liew et al., 2014; Aminoshariae e Khan, 2015; Sordillo et al., 2015; Masarwa et al., 2018; Bauer et al., 2021).

Besides paracetamol, other analgesics are also widely used by pregnant women, but the pattern of analgesic use may differ across countries. Some studies

indicate that dipyrone is frequently used during the gestational period in different countries, especially in Brazil, where it is commonly reported as the second most used analgesic by pregnant women (Mengue et al., 2001; Fonseca et al., 2002; Da Silva Dal Pizzol et al., 2009; Dathe et al., 2017). Nonetheless, places where dipyrone has been banned or subject to restricted use, such as in the USA and Western Europe, ibuprofen is usually the second most used analgesic during gestation (Kristensen et al., 2011; Thorpe et al., 2013).

In addition to concerns on the well-established adverse outcomes of prenatal analgesics and NSAIDs use, many other potential adverse consequences have been under scrutiny in recent years. For instance, several epidemiological and experimental *in vivo* and *in vitro* studies suggest that analgesics and NSAIDs, such as paracetamol, ibuprofen, acetylsalicylic acid, indomethacin, diclofenac, and dipyrone may have endocrine disrupting properties capable of causing reproductive disorders in humans and animals of both sexes at different life stages (Kristensen et al., 2011, 2012; Albert et al., 2013; Mazaud-Guittot et al., 2013; Dean et al., 2013; Holm et al., 2015, 2016; Ben Maamar et al., 2017; Lind et al., 2017; Leverrier-Penna et al., 2018; Passoni et al., 2018; Krebs Ribeiro et al., 2020). Also, studies have shown that prenatal exposure to analgesics can lead to intergenerational consequences, affecting the subsequent generations fertility (Dean et al., 2016; Rossitto et al., 2019a, 2019b).

Considering the mounting evidence of potential adverse health outcomes associated with gestational exposure to analgesics and NSAIDs, up-to-date assessments of prenatal analgesic use are essential to direct and prioritize research efforts in experimental and epidemiological studies in different regions. The aim of the present study was to investigate the prevalence of early pregnancy analgesic use in a Brazilian population and to identify predictors of use among these women according to their sociodemographic and health-related characteristics.

2. Material and methods

2.1. Study design and population

This study is part of an ongoing pregnancy cohort, the Curitiba Reproductive and Environment Study (CARES), in the city of Curitiba (Brazil). CARES was designed to investigate exposure of pregnant women to environmental chemicals and pharmaceuticals, in particular analgesics and NSAIDs, and possible associations

between such exposures and sociodemographic and lifestyle factors, as well as maternal-infant health outcomes. Here, we present data on the prevalence and predictors of analgesics and NSAIDs use in early pregnancy (≤ 16 weeks).

Pregnant women (N = 275) were recruited between March 2018 and March 2020 at ten public health care centers in Curitiba, representing the ten health districts of the city. At the beginning of the study, one of the health districts was dropped due to lack of accessibility. Participants who fulfilled the following inclusion criteria were enrolled in the study: pregnant women up to 16 weeks gestation who were registered in the Curitiba Maternal-Infant Health Care Program, residents of Curitiba city, aged between 18 and 40 years, and whose pregnancy was classified as low-risk according to the Curitiba Maternal-Infant Health Care Program guidelines.

Questionnaires were applied in the form of a face-to-face interview by a trained researcher linked to the study. The questions were structured so as to obtain information related to sociodemographic and lifestyle characteristics, including age, gestational age at recruitment, pre-pregnancy body mass index (BMI), prior pregnancies, self-reported health status, marital status, race, education level, income, smoking, drinking, and analgesic use.

Participants were only interviewed after providing signed informed consent. CARES study protocols were approved by the Research Ethics Committees of the Health Sciences Sector of Federal University of Paraná (34820214.9.0000.0102 – nº 786.120) and the Municipal Health Department of Curitiba (34820214.9.3001.0101 – nº 926.727).

2.2. Data on analgesic use

The interview questionnaire at recruitment presented questions in sequence about indications and use of specific analgesics and NSAIDs. Firstly, women were asked whether they have experienced specific common symptoms since the beginning of pregnancy such as headache, pain in the legs, back, stomach, or throat, flu, cold, fever, cramps, nausea, or others. Subsequently, women were specifically asked about the use of five main analgesics and NSAIDs to treat the previously mentioned symptoms or any other conditions: paracetamol, dipyrone, ibuprofen, acetylsalicylic acid, and diclofenac, one medication at a time and mentioning the name of the active ingredient and the most commonly used brand names of these drugs in Brazil.

For each medication, women could answer yes or no as to whether they used such a drug. Those who responded positively were asked about the reason that led them toward taking the medication, being asked again about the specific symptoms or conditions mentioned above. Also, we asked about the number of pills they had taken since the start of pregnancy, regardless the dose amount in each pill. The use of drops was converted into the equivalent dose amount of one pill of paracetamol (500 mg), dipyron (500 mg), or ibuprofen (400 mg). In addition, women were also asked if they used other pharmaceuticals, either of continuous or occasional use.

2.3. Statistical analyses

Descriptive statistics were obtained for the sociodemographic characteristics and pattern of analgesic use in the study population. Age, gestational age at recruitment, and pre-pregnancy BMI were analyzed as continuous variables, while all other variables were categorical.

We used bivariate logistic regression analyses to examine the associations between analgesic use in early pregnancy and the sociodemographic and lifestyle factors assessed in this study. Dependent variables were the use of any analgesic (no/yes) and the use of paracetamol (no/yes). The variables listed in **Table 1** were considered as potential predictors for analgesic use, in addition to recruitment site (**Supplementary Table 1**), and the use of pharmaceuticals other than analgesics (no/yes). We conducted univariate analyses between all these potential predictors and the three outcome variables described above.

Among paracetamol users, we also conducted bivariate logistic regression analyses to examine potential predictors of the categorized number of consumed pills since the beginning of pregnancy (1-19 pills/20 or more pills). We used the same set of independent variables described above for the use of any analgesic or the use of paracetamol, but we also considered the use of more than one analgesic as a potential predictor (use of “paracetamol-only”/use of “paracetamol and other analgesics”). Also, in this specific analysis, categorial variables with more than 2 categories were recoded into 2 categories, because of the smaller sample size in this analysis (paracetamol users only).

In the multivariable logistic regression models, all independent variables that resulted in p-values less than 0.25 in the univariate analyses were included in the

final models. The Hosmer-Lemeshow test was used to assess the goodness of fit, and models with p-values > 0.05 were considered adequate. Associations between paracetamol use (“paracetamol-only” and “paracetamol and other analgesics”) and the number of consumed pills were also examined by Mann-Whitney test using the number of pills (ranked values) consumed by each participant. All statistical analyses were conducted in IBM SPSS statistics 28.0.0.0 (Armonk, USA) and GraphPad Prism 9.1.2 (La Jolla, USA).

3. Results

3.1. Sociodemographic and lifestyle characteristics of study population

General data on our study population are shown in **Table 1**. A total of 275 pregnant women were recruited in nine municipal public health care units of Curitiba, Brazil (**Supplementary Table 1**). Mean age (\pm standard deviation) at enrollment was 27.5 ± 6.1 years and the mean gestational age was 11.8 ± 2.94 weeks, ranging from 3 to 16 weeks (median = 12.0 weeks). Most women were white (63.3%), married or living as married (61.1%), with low income (60.0%), basic or secondary education (78.1%), and were pregnant for the first time (55.3%). Smoking was reported by 19.3% of participants and 33.5% reported drinking at least one drink since the beginning of pregnancy (**Supplementary Table 2**). Self-reported health status was good or excellent for 80.7% of enrolled women. The mean pre-pregnancy body mass index (BMI; \pm standard deviation) was 25.2 kg/m^2 (± 5.0) and 41.5% of women were overweight or obese (BMI $\geq 25.0 \text{ kg/m}^2$).

Table 1. Sociodemographic characteristics of study participants

Variable	Mean \pm SD or N (%) ^a
Number of participants	275
Age (years)	27.5 ± 6.1
Gestational age at recruitment (weeks)	11.8 ± 2.9
Pre-pregnancy BMI (kg/m^2) (N = 268)	25.2 ± 5.0
Prior pregnancies	
No	152 (55.3%)
Yes	123 (44.7%)
Self-reported health status	
Good/excellent	222 (80.7%)

<i>Fair/Poor</i>	53 (19.3%)
Marital Status	
<i>Married/living as married</i>	168 (61.1%)
<i>Living without a partner</i>	106 (38.5%)
<i>Missing</i>	1 (0.4%)
Race	
<i>White</i>	175 (63.3%)
<i>Other</i>	95 (34.5%)
<i>Missing</i>	5 (1.8%)
Education	
<i>Basic</i>	65 (23.6%)
<i>High School</i>	150 (54.5%)
<i>College or higher</i>	60 (21.8%)
Income	
<i>Up to 3 minimum wages</i>	165 (60.0%)
<i>3-6 minimum wages</i>	79 (28.7%)
<i>> 6 minimum wages</i>	22 (8.0%)
<i>Missing</i>	9 (3.3%)
Smoking	
<i>No</i>	221 (80.4%)
<i>Yes</i>	53 (19.3%)
<i>Missing</i>	1 (0.4%)
Drinking	
<i>No</i>	182 (66.2%)
<i>Yes</i>	92 (33.5%)
<i>Missing</i>	1 (0.4%)

^aData on continuous variables are presented as mean \pm standard deviation and categorical data as counts and percentage.

3.2. Analgesic use

The use of at least one analgesic from the beginning of pregnancy up to study enrollment was reported by 61.5% of participants (**Table 2**). In this study we specifically asked about the use of paracetamol, dipyrrone, ibuprofen, acetylsalicylic acid (AAS), and diclofenac. Paracetamol was by far the most used analgesic (55.3%), followed by dipyrrone (13.5%) and ibuprofen (12%). AAS and diclofenac

were used by only 2.5% and 1.5% of study participants, respectively. The use of more than one analgesic was reported by 51 women (18.5%) (**Table 2**). The use of paracetamol and dipyrrone was reported by 20 women, which corresponds to 7.3% of study participants and 39% among those reporting the use of more than one analgesic, while paracetamol and ibuprofen were used by 15 women (5.5 % of total participants and 29% of women that used more than one analgesic).

Table 2. Use of mild analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs in early pregnancy

Variable	N (%)
Participants	275
Any analgesic	
<i>No</i>	106 (38.5%)
<i>Yes</i>	169 (61.5%)
<i>Paracetamol</i>	152 (55.3%)
<i>Dipyrrone</i>	37 (13.5%)
<i>Ibuprofen</i>	33 (12.0%)
<i>Acetylsalicylic acid (AAS)</i>	7 (2.5%)
<i>Diclofenac</i>	4 (1.5%)
More than one analgesic	51 (18.5%)
<i>Paracetamol + Dipyrrone</i>	20 (7.3%)
<i>Paracetamol + Ibuprofen</i>	15 (5.5%)
<i>Paracetamol + Dipyrrone + Ibuprofen</i>	9 (3.3%)
<i>Other combinations</i>	7 (2.5%)

Most women reported sporadic use of individual analgesics (1-5 pills), but some participants indicated the use of higher amounts (**Table 3**). For paracetamol, we categorized the total amount of used pills in four categories and found that 11.8% of paracetamol users consumed 20 or more pills from the beginning of pregnancy up to recruitment (**Table 3**). Among dipyrrone users, five participants reported intravenous use. The most common reasons for taking analgesics were headache or headache combined to other reasons (**Table 3**). We also asked women about the use of pharmaceuticals other than analgesics and found that 48.8% of the participants used at least one drug, with the most common classes being antiemetics

and antibiotics (**Supplementary Table 3**).

Table 3. Dose and reasons of paracetamol, dipyron, and ibuprofen use in early pregnancy

Variable	N (%)
Paracetamol (number of users)	152
<i>Total number of pills up to study enrollment</i>	
1-5 pills	103 (67.8%)
6-10 pills	17 (11.2%)
11-19 pills	8 (5.3%)
≥ 20 pills	18 (11.8%)
Unknown/not reported	6 (3.9%)
<i>Self-reported reasons of paracetamol use</i>	
Headache only	73 (48.0%)
Headache and others	63 (41.4%)
Others	16 (10.5%)
Dipyron (number of users)	37
<i>Total number of pills up to study enrollment</i>	
1-5 pills	21 (56.8%)
6-10 pills	3 (8.1%)
>10 pills	1 (2.7%)
Intravenous use	5 (13.5%)
Unknown/not reported	7 (18.9%)
<i>Self-reported reasons of dipyron use</i>	
Headache only	18 (48.6%)
Headache and others	9 (24.3%)
Others	7 (18.9%)
Missing	3 (8.1%)
Ibuprofen (number of users)	33
<i>Total number of pills up to study enrollment</i>	
1-5 pills	21 (63.6%)
6-10 pills	6 (18.2%)
>10 pills	3 (9.1%)
Unknown/not reported	3 (9.1%)
<i>Self-reported reasons of ibuprofen use</i>	

<i>Headache only</i>	12 (36.4%)
<i>Headache and others</i>	11 (33.3%)
<i>Others</i>	10 (30.3%)

3.3. Predictors of analgesic use

Associations between sociodemographic and lifestyle factors and the use of any analgesic or paracetamol were assessed by univariate and multivariate logistic regression. The self-reported health status was associated with the use of any analgesic and paracetamol in both univariate and multivariate models. In the adjusted models, the odds of using any analgesic or paracetamol were significantly higher in women reporting fair/poor health than in those with good/excellent health perception (**Tables 4 and 5**). The gestational age was also positively associated with the use of any analgesic.

Table 4. Univariate and multivariate analysis of sociodemographic and lifestyle factors associated with early pregnancy use of any analgesic

Variables	Use of any analgesic ^a		Crude OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR (95% CI)	p-value
	No	Yes				
Age (years)	106 (26.9 ± 6.2)	169 (27.6 ± 6.1)	1.03 (0.99 - 1.07)	0.210	1.04 (0.99 - 1.08)	0.113
Gestational age (weeks)	106 (11.4 ± 3.0)	169 (12.1 ± 2.9)	1.08 (0.99 - 1.18)	0.062	1.12 (1.02 - 1.23)	0.016
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	101 (24.5 ± 5.5)	167 (25.6 ± 4.6)	1.05 (0.99 - 1.10)	0.081	1.05 (0.99 - 1.11)	0.085
Self-reported health status	106 (38.5%)	169 (61.5%)				
<i>Good/excellent</i>	94 (42.3%)	128 (57.7%)	Reference		Reference	
<i>Fair/Poor</i>	12 (22.6%)	41 (77.4%)	2.51 (1.25 - 5.03)	0.010	3.05 (1.44 - 6.50)	0.003
Race	106 (39.3%)	164 (60.7%)				
<i>White</i>	74 (42.3%)	101 (57.7%)	Reference		Reference	
<i>Other</i>	32 (33.7%)	63 (66.3%)	1.44 (0.86 - 2.43)	0.168	1.43 (0.82 - 2.50)	0.204
Use of other pharmaceuticals ^b						
No	61 (43%)	81 (57%)	Reference		Reference	
Yes	45 (33.8%)	88 (66.2%)	1.47 (0.93 - 2.40)	0.121	1.27 (0.75 - 2.13)	0.378

OR = odds ratio; CI = confidence interval. Adjusted models included all variables in the Table. Sample size of adjusted model = 263. Significant associations are marked in bold. ^aData represent count (mean ± standard deviation) for continuous variables and count (%) for categorical variables. ^bUse of any pharmaceuticals other than analgesics.

Table 5. Univariate and multivariate analysis of sociodemographic and lifestyle factors associated with early pregnancy use of paracetamol

Variables	Use of paracetamol ^a		Crude OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR (95% CI)	p-value
	No	Yes				
Gestational age (weeks)	123 (11.5 ± 3.0)	152 (12.0 ± 2.9)	1.06 (0.98 - 1.15)	0.159	1.08 (0.99 - 1.18)	0.090
Pre-pregnancy BMI (kg/m ²)	118 (24.7 ± 5.3)	150 (25.6 ± 4.6)	1.04 (0.99 - 1.09)	0.175	1.05 (0.99 - 1.10)	0.097
Self-reported health status						
<i>Good/excellent</i>	109 (49.1%)	113 (50.9%)	Reference		Reference	
<i>Fair/Poor</i>	14 (26.4%)	39 (73.6%)	2.69 (1.38 - 5.23)	0.004	2.84 (1.39 - 5.79)	0.004
Race						
<i>White</i>	85 (48.6%)	90 (51.4%)	Reference		Reference	
<i>Other</i>	38 (40.0%)	57 (60.0%)	1.42 (0.85 - 2.35)	0.178	1.31 (0.76 - 2.28)	0.332
Education						
<i>Basic</i>	24 (36.9%)	41 (63.1%)	Reference		Reference	
<i>High School</i>	69 (46.0%)	81 (54.0%)	0.69 (0.38 - 1.25)	0.218	0.67 (0.35 - 1.31)	0.241
<i>College or higher</i>	30 (50.0%)	30 (50.0%)	0.59 (0.29 - 1.20)	0.142	0.62 (0.280 - 1.37)	0.239
Use of other pharmaceuticals ^b						
<i>No</i>	71 (50.0%)	71 (50.0%)	Reference		Reference	
<i>Yes</i>	52 (39.1%)	81 (60.9%)	1.56 (0.97 - 2.52)	0.070	1.45 (0.87 - 2.42)	0.151

OR = odds ratio; CI = confidence interval. Adjusted models included all variables in the Table. Sample size of adjusted model = 263. Significant associations are marked in bold. ^a Data represent count (mean ± standard deviation) for continuous variables and count (%) for categorical variables. ^b Use of any pharmaceuticals other than analgesics.

Among paracetamol users, we also examined the predictors of the amount (number of pills) of paracetamol consumed from the beginning of pregnancy up to study enrollment. The median number of paracetamol pills consumed was significantly higher in women who reported using paracetamol and other analgesics than those who reported using paracetamol-only (**Figure 1A**). When considering the amount of paracetamol consumed as a categorical variable (1-19 pills/20 or more pills), the odds (95% CI) of being a heavy paracetamol consumer (≥ 20 pills) was 3.84 (1.17 – 12.65) times higher in women who reported the use of paracetamol and other analgesics when compared to participants who used paracetamol-only (**Figure 1B** and **Supplementary Table 4**). Likewise, the use of pharmaceuticals other than analgesics was significantly associated with the consumption of higher amounts of paracetamol (adjusted OR = 3.70; 95% CI = 1.08 – 12.74).

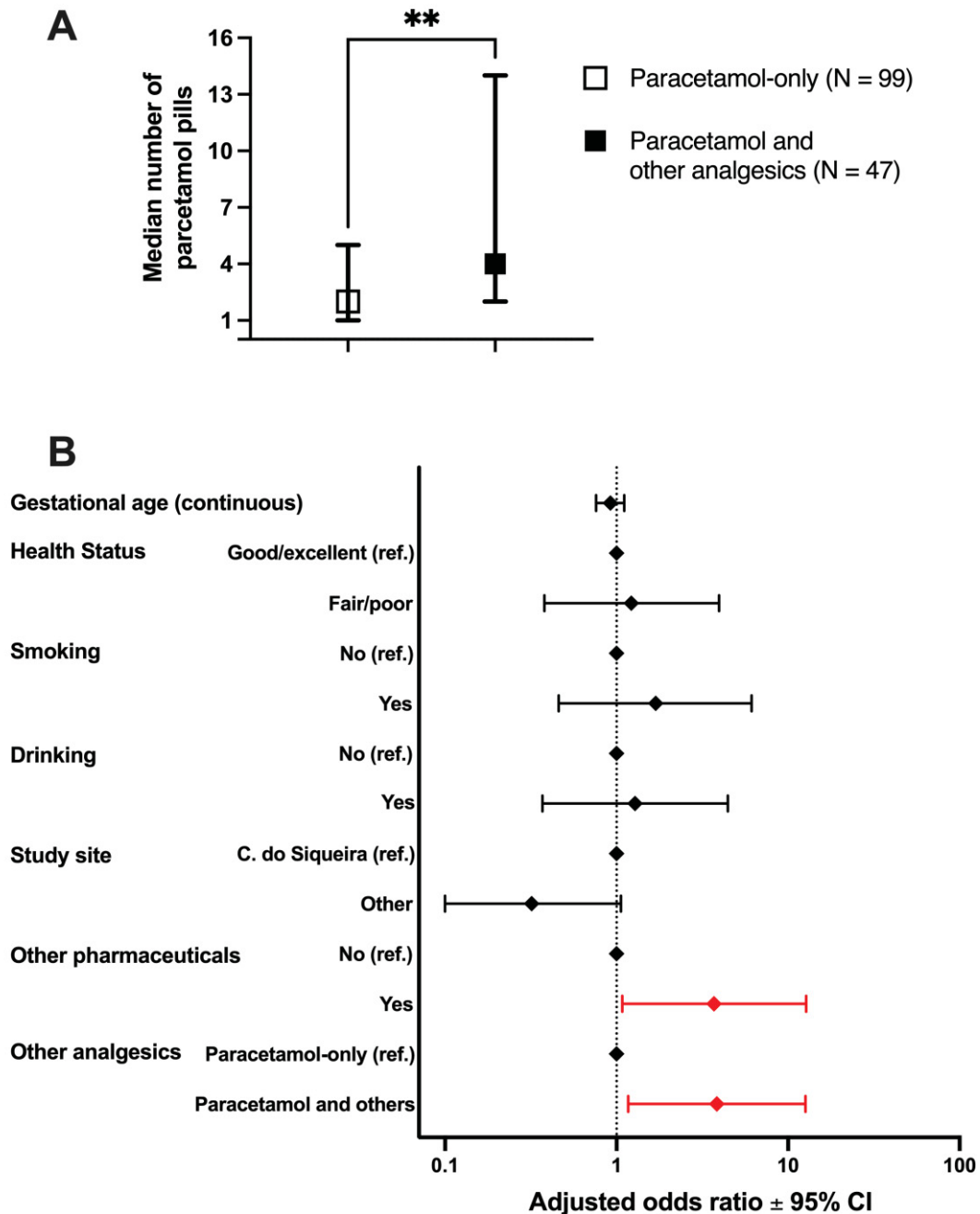


Figure 1. Predictors of total amount of paracetamol consumed in early pregnancy. (A) Median number of consumed paracetamol pills among paracetamol-only users and participants who reported consumption of paracetamol and other analgesic types. Data represent median \pm interquartile range; ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney test). (B) Multivariate logistic regression model for the (categorized) outcome amount of paracetamol pills used (1-19 pills/20 or more pills) from pregnancy begin up to study enrollment. Sample size = 145 (1-19 pills = 127; 20 or more pills = 18). Data in red are statistically significant ($p < 0.05$). All covariates presented were used in the final model. Ref. = reference; CI = confidence intervals.

4. Discussion

The prevalence of analgesic use in our study reveals that 61.5% (N = 169) of the participants used some analgesic at least once during early pregnancy. Paracetamol was the most used analgesic by pregnant women, corresponding to 55.3% (N = 152), a percentage that is remarkably similar to the numbers observed in studies from different countries (Werler et al., 2005; Rebordosa et al., 2008; Kristensen et al., 2011; Thorpe et al., 2013; Lind et al., 2017; Bertoldi et al., 2020; Navarro-Lafuente et al., 2021). However, a large number of study participants also reported the use of other analgesics as well as the use of more than one analgesic type. A strength of our study is that exposure assessments included questions about the names of specific drugs and indications of use. In general, the overall use of pharmaceuticals may be underreported due to recall bias and to effects of questionnaire design, such as the use of open-ended questions (Mitchell et al., 1986).

The second most used analgesic was dipyrrone, reported by 13.5% (N = 37) of pregnant women, followed by ibuprofen 12% (N = 33), which is in contrast to most studies conducted in the USA and Western Europe, where the use of dipyrrone among pregnant women is usually not reported. These results reflect the easy access and widespread use of dipyrrone as a common over-the-counter analgesic in Brazil. Dipyrrone is usually not indicated during pregnancy, although it has not been associated with malformations or other adverse pregnancy outcomes in different studies (Bar-Oz et al., 2005; Da Silva Dal Pizzol et al., 2009; Dathe et al., 2017). On the other hand, there are case reports of dipyrrone use and occurrence of oligohydramnios and fetal ductus arteriosus narrowing (Catalán et al., 1995; Sánchez de la Nieta et al., 2003; Weintraub & Mankuta, 2006), as well as case-control studies indicating possible associations of prenatal dipyrrone use with increased risk for Wilm's tumor and leukemia in children (Sharpe & Franco, 1996; Alexander et al., 2001; Couto et al., 2015). In a recent experimental study conducted by our group, we found evidence for endocrine-disruptive properties of dipyrrone and its main metabolites (Passoni et al., 2018).

In addition, we assessed associations between the use of analgesics and several sociodemographic and lifestyle factors. The self-reported health status was the main predictor of any analgesic or paracetamol use in early pregnancy. The odds of using any analgesic or paracetamol were significantly higher in women who

reported fair or poor health, compared to participants who reported good or excellent health status. We also observed an association between the use of any analgesic and gestational age. Participants in this study were between three and sixteen weeks pregnant and, as expected, the odds of reporting analgesic use were higher in women recruited at a later gestational period.

Of note, a large number of women (18.5%) reported using different types of analgesics (two or three) since the start of pregnancy, regardless of whether this use occurred at the same time or not. The use of paracetamol and dipyron was the most prevalent combination, reported by 7.3% (N = 20) of participants, followed by paracetamol and ibuprofen 5.5% (N = 15), and paracetamol, dipyron, and ibuprofen 3.3% (N = 9). Pregnant women were also asked about the use of other pharmaceuticals in early pregnancy. The most used drug classes were antiemetics 13.8% (N = 38) and antibiotics 11.3% (N = 31), but far less than overall self-reported analgesic use.

Most women in our study consumed a small number of analgesic pills (1 to 5 pills), regardless of the analgesic type, and usually to treat headaches. However, some women reported the use of higher amounts of analgesics, especially paracetamol. Among paracetamol users, 11.8% (N = 18) used 20 or more pills from pregnancy start up to study enrollment. Interestingly, we observed a significant association between heavy use of paracetamol (≥ 20 pills) and the consumption of more than one type of analgesic. Women who reported the use of paracetamol-only ingested fewer paracetamol pills than those participants who reported the use of paracetamol and any other analgesic. The odds of using 20 or more paracetamol pills were significantly higher in women who reported the use of paracetamol and other analgesics than in paracetamol-only users, after adjustment for a set of covariates (**Figure 1**), including gestational age. Similarly, the use of pharmaceuticals other than analgesics was also positively associated with the use of 20 or more paracetamol pills.

The fact that pregnant women consuming higher amounts of paracetamol may be more prone to use other analgesics is a cause of concern. Many of these drugs are suspected of acting as endocrine disruptors that may affect common signaling pathways and/or negatively impact similar target tissues, and together, contribute to the induction of adverse effects during fetal development (Kristensen et al., 2012; Mazaud-Guittot et al., 2013; Ben Maamar et al., 2017; Leverrier-Penna et

al., 2018; Rossitto et al., 2019a, 2019b). In a study that investigated the potential endocrine disrupting properties of mild analgesics after intrauterine exposure, Kristensen et al. (2011) demonstrated an increased risk of cryptorchidism in sons of women reporting simultaneous use of more than one analgesic when compared to sons of participants who used none or only one type of analgesic. In another study, prenatal exposure to paracetamol and other analgesics, but not paracetamol-only, was associated with reduced anoscrotal distance in male infants, a marker of androgen insufficiency during fetal development (Lind et al., 2017).

Recently, a group of scientists, clinicians, and health professionals published a Consensus Statement on paracetamol use during pregnancy. In this Consensus Statement, the group raised concerns about the high prevalence of paracetamol use by pregnant women, which was also observed in the present study, due to possible associations between prenatal paracetamol exposure and neurodevelopmental, urogenital, and reproductive disorders. Although data on these associations are still inconclusive, the authors of this Consensus Statement recommend precautionary actions to minimize the exposure. They reinforce that paracetamol should be used cautiously by pregnant women, at the lowest effective dose, for the shortest possible time, and only with medical advice (Bauer et al., 2021).

There are few data on the analgesic use during pregnancy in Brazil. Our study results showed that analgesics, especially paracetamol, are widely used by Brazilian pregnant women to manage painful conditions. Although the prevalence of paracetamol use was higher, we observed a wide use of other analgesics such as dipyron and ibuprofen. Moreover, among pregnant women who are heavy users of paracetamol, the use of paracetamol combined to other analgesics was also more frequent, a fact that raises concern mainly due to the possibility of combined effects. In this regard, a focused research effort is needed to clearly establish the impact and mechanisms of prenatal use of paracetamol and other analgesics on a diverse range of health outcomes, including neurodevelopmental and reproductive consequences. In any case, as a precautionary measure, women should be counselled to avoid the indiscriminate use of single and combined analgesics during pregnancy.

5. Funding

This study was financed by Fundação Araucária PPSUS 2015 – Grant number 052/2017 and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

6. Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

7. Acknowledgments

We are extremely grateful to all of the pregnant women who participated in this study, the health care units staff, and the whole CARES team for their commitment and their role in the success of the study. The CARES Study Group is composed of the following members: Prof^o. Dr. Anderson Joel Martino Andrade, Marcella Tapias Passoni, Mariana Regina Rompkovski, Vitória Aline Santana Rios, Daniele Cristine Krebs Ribeiro, Amanda Atuati Maltoni, Carla Giovana Basso, Sara Emilia Lima Tolouei, Juliana Machado Franco, Bianca Manfroi da Silva, Débora Salles da Silva Coutinho, Amanda Caroline Venturelli, Katlyn Barp Meyer, Daniele Dietrich da Moura Costa, Sofia Santos Lima Figueiredo, Juliane Centeno Müller, Marianne Orlandini Klein, Michele Bertoncello Souza, Prof^a. Dra. Rosana Nogueira de Moraes and Dra. Karin Lucilda Schultz.

Marcella Tapias Passoni is a scholarship recipient from CAPES – PhD Student. Anderson Joel Martino-Andrade is fellowship recipient from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil).

8. References

- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejucq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(7), 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Alexander, F. E., Patheal, S. L., Biondi, A., Brandalise, S., Cabrera, M. E., Chan, L. C., Chen, Z., Cimino, G., Cordoba, J. C., Gu, L. J., Hussein, H., Ishii, E., Kamel, A. M., Labra, S., Magalhães, I. Q., Mizutani, S., Petridou, E., de Oliveira, M. P., Yuen, P., Wiemels, J. L., ... Greaves, M. F. (2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer research*, 61(6), 2542–2546.

Aminoshariae, A., & Khan, A. (2015). Acetaminophen: old drug, new issues. *Journal of endodontics*, 41(5), 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.024>

Antonucci, R., Zaffanello, M., Puxeddu, E., Porcella, A., Cuzzolin, L., Pilloni, M. D., & Fanos, V. (2012). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. *Current drug metabolism*, 13(4), 474–490. <https://doi.org/10.2174/138920012800166607>

Arrais, P. S., Fernandes, M. E., Pizzol, T. D., Ramos, L. R., Mengue, S. S., Luiza, V. L., Tavares, N. U., Farias, M. R., Oliveira, M. A., & Bertoldi, A. D. (2016). Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. *Revista de saude publica*, 50(suppl 2), 13s. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006117>

Bar-Oz, B., Clementi, M., Di Gianantonio, E., Greenberg, R., Beer, M., Merlob, P., Arnon, J., Ornoy, A., Zimmerman, D. M., & Berkovitch, M. (2005). Metamizol (dipyrone, optalgin) in pregnancy, is it safe? A prospective comparative study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 119(2), 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.07.004>

Bauer, A. Z., Swan, S. H., Kriebel, D., Liew, Z., Taylor, H. S., Bornehag, C. G., Andrade, A. M., Olsen, J., Jensen, R. H., Mitchell, R. T., Skakkebaek, N. E., Jégou, B., & Kristensen, D. M. (2021). Paracetamol use during pregnancy - a call for precautionary action. *Nature reviews. Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00553-7>

Beckhauser, G. C., de Souza, J. M., Valgas, C., Piovezan, A. P., & Galato, D. (2010). Utilização de medicamentos na pediatria: A prática de automedicação em crianças por seus responsáveis. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 28, n. 3, p. 262-268. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822010000300002>

Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K. R., Coiffec, I., Rolland, A. D., Chevrier, C., Kristensen, D. M., Lavoué, V., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Dejuçq-Rainsford, N., Mitchell, R. T., Mazaud-Guittot, S., & Jégou, B. (2017). Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Scientific reports*, 7, 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>

Bertoldi, A. D., Rifas-Shiman, S. L., Boing, A. C., da Silva Dal Pizzol, T., Miranda, V., Silveira, M., Freitas Silveira, M., Domingues, M. R., Santos, I. S., Bassani, D. G., Tovo-Rodrigues, L., & Oken, E. (2020). Associations of acetaminophen use during pregnancy and the first year of life with neurodevelopment in early childhood. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 34(3), 267–277. <https://doi.org/10.1111/ppe.12632>

Black, E., Khor, K. E., Kennedy, D., Chutatape, A., Sharma, S., Vancaillie, T., & Demirkol, A. (2019). Medication Use and Pain Management in Pregnancy: A Critical Review. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 19(8), 875–899. <https://doi.org/10.1111/papr.12814>

Catalán, J. L., Santonja, J., Martínze, L., & Jiménez, N. V. (1995). Oligoamnios asociado al uso de dipirona magnésica [Oligoamnios associated with the use of magnesium dipyron]. *Medicina clinica*, 104(14), 541–543.

Couto, A. C., Ferreira, J. D., Pombo-de-Oliveira, M. S., & Koifman, S. (2015). Pregnancy, maternal exposure to analgesic medicines, and leukemia in Brazilian children below 2 years of age. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 24(3), 245–252. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000070>

Da Silva Dal Pizzol, T., Schüler-Faccini, L., Mengue, S. S., & Fischer, M. I. (2009). Dipyron use during pregnancy and adverse perinatal events. *Archives of gynecology and obstetrics*, 279(3), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s00404-008-0707-3>

da Silva Dal Pizzol, T., Turmina Fontanella, A., Cardoso Ferreira, M. B., Bertoldi, A. D., Boff Borges, R., & Serrate Mengue, S. (2019). Analgesic use among the Brazilian population: Results from the National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines (PNAUM). *PLoS one*, 14(3), e0214329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214329>

Dale, O., Borchgrevink, P. C., Fredheim, O. M., Mahic, M., Romundstad, P., & Skurtveit, S. (2015). Prevalence of use of non-prescription analgesics in the Norwegian HUNT3 population: Impact of gender, age, exercise and prescription of opioids. *BMC public health*, 15, 461. <https://doi.org/10.1186/s12889-015-1774-6>

Dathe, K., Padberg, S., Hultsch, S., Meixner, K., Tissen-Diabaté, T., Meister, R., Beck, E., & Schaefer, C. (2017). Metamizole use during first trimester-A prospective observational cohort study on pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 26(10), 1197–1204. <https://doi.org/10.1002/pds.4277>

Dean, A., Mungall, W., McKinnell, C., & Sharpe, R. M. (2013). Prostaglandins, masculinization and its disorders: effects of fetal exposure of the rat to the cyclooxygenase inhibitor- indomethacin. *PLoS one*, 8(5), e62556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062556>

Dean, A., van den Driesche, S., Wang, Y., McKinnell, C., Macpherson, S., Eddie, S. L., Kinnell, H., Hurtado-Gonzalez, P., Chambers, T. J., Stevenson, K., Wolfinger, E., Hrabalkova, L., Calarrao, A., Bayne, R. A., Hagen, C. P., Mitchell, R. T., Anderson, R. A., & Sharpe, R. M. (2016). Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific reports*, 6, 19789. <https://doi.org/10.1038/srep19789>

Fonseca, M. R., Fonseca, E. d., & Bergsten-Mendes, G. (2002). Prevalência do uso de medicamentos na gravidez: uma abordagem farmacoepidemiológica [Prevalence of drug use during pregnancy: a pharmacoepidemiological approach]. *Revista de saude publica*, 36(2), 205–212. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102002000200013>

Holm, J. B., Chalmey, C., Modick, H., Jensen, L. S., Dierkes, G., Weiss, T., Jensen, B. A., Nørregård, M. M., Borkowski, K., Styrrishave, B., Martin Koch, H., Mazaud-

Guittot, S., Jegou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2015). Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 148(1), 288–298. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv179>

Holm, J. B., Mazaud-Guittot, S., Danneskiold-Samsøe, N. B., Chalmey, C., Jensen, B., Nørregård, M. M., Hansen, C. H., Styrihave, B., Svingen, T., Vinggaard, A. M., Koch, H. M., Bowles, J., Koopman, P., Jégou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2016). Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 150(1), 178–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv332>

Jensen, M. S., Rebordosa, C., Thulstrup, A. M., Toft, G., Sørensen, H. T., Bonde, J. P., Henriksen, T. B., & Olsen, J. (2010). Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 21(6), 779–785. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181f20bed>

Krebs Ribeiro, D. C., Passoni, M. T., Meldola, H., Curi, T. Z., da Silva, G. N., Tolouei, S., Hey, G. S., Grechi, N., Dos Santos, A. C., Souza, R., Spencoski, K. M., Ramos, A., & Martino-Andrade, A. J. (2020). Prenatal diclofenac exposure delays pubertal development and induces behavioral changes in rats. *Reproductive toxicology*, 96, 380–389. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.001>

Kristensen, D. M., Hass, U., Lesné, L., Lottrup, G., Jacobsen, P. R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J. H., Toppari, J., Jensen, T. K., Brunak, S., Skakkebaek, N. E., Nellemann, C., Main, K. M., Jégou, B., & Leffers, H. (2011). Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(1), 235–244. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq323>

Kristensen, D. M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejucq-Rainsford, N., Leffers, H., & Jégou, B. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International journal of andrology*, 35(3), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x>

Leverrier-Penna, S., Mitchell, R. T., Becker, E., Lecante, L., Ben Maamar, M., Homer, N., Lavoué, V., Kristensen, D. M., Dejucq-Rainsford, N., Jégou, B., & Mazaud-Guittot, S. (2018). Ibuprofen is deleterious for the development of first trimester human fetal ovary ex vivo. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(3), 482–493. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex383>

Li, D. K., Ferber, J. R., Odouli, R., & Quesenberry, C. (2018). Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs during pregnancy and the risk of miscarriage. *American journal of obstetrics and gynecology*, 219(3), 275.e1–275.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.06.002>

Liew, Z., Ritz, B., Rebordosa, C., Lee, P. C., & Olsen, J. (2014). Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. *JAMA pediatrics*, *168*(4), 313–320. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.4914>

Lind, D. V., Main, K. M., Kyhl, H. B., Kristensen, D. M., Toppari, J., Andersen, H. R., Andersen, M. S., Skakkebaek, N. E., & Jensen, T. K. (2017). Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. *Human reproduction (Oxford, England)*, *32*(1), 223–231. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew285>

Masarwa, R., Levine, H., Gorelik, E., Reif, S., Perlman, A., & Matok, I. (2018). 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*, *187*(8), 1817–1827. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy086>

Mazaud-Guittot, S., Nicolas Nicolaz, C., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Ben Maamar, M., Balaguer, P., Kristensen, D. M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejuçq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *98*(11), E1757–E1767. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>

McKenna, L., & McIntyre, M. (2006). What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. *Journal of advanced nursing*, *56*(6), 636–645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2006.04037.x>

Mengue, S. S., Schenkel, E. P., Duncan, B. B., & Schmidt, M. I. (2001). Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras [Drug use by pregnant women in six Brazilian cities]. *Revista de saude publica*, *35*(5), 415–420. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102001000500002>

Mitchell, A. A., Cottler, L. B., & Shapiro, S. (1986). Effect of questionnaire design on recall of drug exposure in pregnancy. *American journal of epidemiology*, *123*(4), 670–676. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a114286>

Moreira de Barros, G. A., Calonego, M., Mendes, R. F., Castro, R., Faria, J., Trivellato, S. A., Cavalcante, R. S., Fukushima, F. B., & Dias, A. (2019). Uso de analgésicos e o risco da automedicação em amostra de população urbana: estudo transversal [The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study]. *Brazilian journal of anesthesiology (Elsevier)*, *69*(6), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.bjan.2019.09.005>

Navarro-Lafuente, F., Areense-Gonzalo, J. J., Adoamnei, E., Prieto-Sánchez, M. T., Sánchez-Ferrer, M. L., García-Marcos, L., Morales, E., Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., & The Nela Study Group (2021). Is Maternal Use of Paracetamol during Pregnancy Associated with Anogenital Distance in Male Newborns? The Results from the NELA Birth Cohort. *International journal of environmental research and public health*, *18*(12), 6338. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126338>

- Ostensen, M. E., & Skomsvoll, J. F. (2004). Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(3), 571–580. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.3.571>
- Passoni, M. T., Kristensen, M. N., Morais, R. N., Woitkowiak, C., Boareto, A. C., da Silva Amaral, B. A., Grechi, N., Dalsenter, P. R., Munkboel, C. H., Styrihave, B., Kristensen, D. M., Gomes, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2018). Assessment of the analgesic dipyron as a possible (anti)androgenic endocrine disruptor. *Toxicology Letters*, 285, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.021>
- Philippat, C., Giorgis-Allemand, L., Chevrier, C., Cordier, S., Jégou, B., Charles, M. A., & Slama, R. (2011). Analgesics during pregnancy and undescended testis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 22(5), 747–749. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318225bf33>
- Rathmell, J. P., Viscomi, C. M., & Ashburn, M. A. (1997). Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. *Anesthesia and analgesia*, 85(5), 1074–1087. <https://doi.org/10.1097/00000539-199711000-00021>
- Rebordosa, C., Kogevinas, M., Sørensen, H. T., & Olsen, J. (2008). Pre-natal exposure to paracetamol and risk of wheezing and asthma in children: a birth cohort study. *International journal of epidemiology*, 37(3), 583–590. <https://doi.org/10.1093/ije/dyn070>
- Rossitto, M., Marchive, C., Pruvost, A., Sellem, E., Ghetas, A., Badiou, S., Sutra, T., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019a). Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(1), 339–357. <https://doi.org/10.1096/fj.201800488RRR>
- Rossitto, M., Ollivier, M., Déjardin, S., Pruvost, A., Brun, C., Marchive, C., Nguyen, A. L., Ghetas, A., Keime, C., de Massy, B., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019b). In utero exposure to acetaminophen and ibuprofen leads to intergenerational accelerated reproductive aging in female mice. *Communications biology*, 2, 310. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0552-x>
- Sánchez de la Nieta, M. D., Rivera, F., De la Torre, M., Alcázar, R., Caparrós, G., Paz Alcaide, M., Vozmediano, C., & Sánchez, A. (2003). Acute renal failure and oligohydramnios induced by magnesium dipyron (metamizol) in a pregnant woman. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(8), 1679–1680. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq240>
- Sarganas, G., Buttery, A. K., Zhuang, W., Wolf, I. K., Grams, D., Rosario, A. S., Scheidt-Nave, C., & Knopf, H. (2015). Prevalence, trends, patterns and associations of analgesic use in Germany. *BMC pharmacology & toxicology*, 16, 28. <https://doi.org/10.1186/s40360-015-0028-7>

- Schoenfeld, A., Bar, Y., Merlob, P., & Ovadia, Y. (1992). NSAIDs: maternal and fetal considerations. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 28(3-4), 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1992.tb00777.x>
- Servey, J., & Chang, J. (2014). Over-the-Counter Medications in Pregnancy. *American family physician*, 90(8), 548–555.
- Sharpe, C. R., & Franco, E. L. (1996). Use of dipyrrone during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 7(5), 533–535. <https://doi.org/10.1097/00001648-199609000-00014>
- Snijder, C. A., Kortenkamp, A., Steegers, E. A., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Hass, U., & Burdorf, A. (2012). Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(4), 1191–1201. <https://doi.org/10.1093/humrep/der474>
- Sordillo, J. E., Scirica, C. V., Rifas-Shiman, S. L., Gillman, M. W., Bunyavanich, S., Camargo, C. A., Jr, Weiss, S. T., Gold, D. R., & Litonjua, A. A. (2015). Prenatal and infant exposure to acetaminophen and ibuprofen and the risk for wheeze and asthma in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 135(2), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.065>
- Thorpe, P. G., Gilboa, S. M., Hernandez-Diaz, S., Lind, J., Cragan, J. D., Briggs, G., Kweder, S., Friedman, J. M., Mitchell, A. A., Honein, M. A., & National Birth Defects Prevention Study (2013). Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 22(9), 1013–1018. <https://doi.org/10.1002/pds.3495>
- Weintraub, A., & Mankuta, D. (2006). Dipyrrone-induced oligohydramnios and ductus arteriosus restriction. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, 8(10), 722–723.
- Werler, M. M., Mitchell, A. A., Hernandez-Diaz, S., & Honein, M. A. (2005). Use of over-the-counter medications during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 193(3 Pt 1), 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.100>
- Wunsch, M. J., Stanard, V., & Schnoll, S. H. (2003). Treatment of pain in pregnancy. *The Clinical journal of pain*, 19(3), 148–155. <https://doi.org/10.1097/00002508-200305000-00002>
- Ying, X. H., Bao, D. N., Jiang, H. Y., & Shi, Y. D. (2021). Maternal non-steroidal anti-inflammatory drug exposure during pregnancy and risk of miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical pharmacology*, 10.1007/s00228-021-03222-w. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00228-021-03222-w>

9. Supplementary material

Supplementary Table 1. Recruiting study sites – health care units

Variables	N (%)
Participants	275
Health Care Units	
<i>Campina do Siqueira</i>	79 (28.7%)
<i>Mae Curitiba</i>	61 (22.2 %)
<i>Cajuru</i>	46 (16.7%)
<i>Other</i>	89 (32.4 %)

Participating women were recruited in 9 health care units in the city of Curitiba.

Supplementary Table 2. Smoking and drinking habits in study participants

Variables	N (%)
Participants	275
Smoking	53 (19.3%)
<i>Less than 1 cigarette/day</i>	17 (6.2%)
<i>1-5 cigarettes/day</i>	13 (4.7%)
<i>More than 5 cigarettes/day</i>	19 (6.9%)
<i>Unknown amount/not reported</i>	4 (1.5%)
Drinking	92 (33.5%)
<i>1-5 drinks^a</i>	57 (20.7%)
<i>6-10 drinks^a</i>	15 (5.5%)
<i>More than 10 drinks^a</i>	12 (4.4%)
<i>Unknown amount/not reported</i>	8 (2.9%)

^aTotal number of standard drinks up to study enrollment. A standard drink is defined as any drink containing 13 g of pure alcohol.

Supplementary Table 3. Early pregnancy use of pharmaceuticals

Variable	N (%)
Participants	275
No	142 (51.6%)
Yes	133 (48.4%)
<i>Antiemetics</i>	38 (13.8%)
<i>Antibiotics</i>	31 (11.3%)
<i>Thyroid hormones</i>	15 (5.5%)
<i>Progestins</i>	13 (4.7%)
<i>Antidepressants</i>	10 (3.6%)
<i>Spasmolytics</i>	10 (3.6%)
<i>Other</i>	46 (16.7%)

Self-reported use of any pharmaceutical (except analgesics) up to enrollment. Some participants reported the use of more than one pharmaceutical class.

Supplementary Table 4. Univariate and multivariate analysis of predictors of paracetamol amount used in early pregnancy

Variables	Number of paracetamol pills ^a		Crude OR (95% CI)	p-value	Adjusted OR (95% CI)	p-value
	1-19	≥ 20 pills				
Gestational age (weeks)	128 (12.0 ± 2.8)	18 (11.2 ± 3.6)	0.91 (0.77 – 1.07)	0.246	0.92 (0.76 – 1.11)	0.398
Self-reported health status	128 (87.7%)	18 (12.3%)				
<i>Good/excellent</i>	96 (89.7%)	11 (10.3%)	Reference		Reference	
<i>Fair/Poor</i>	32 (82.1%)	7 (17.9%)	1.09 (0.68 – 5.34)	0.218	1.22 (0.38 – 3.96)	0.740
Smoking	127 (87.6%)	18 (12.4%)				
<i>No</i>	105 (89.7%)	12 (10.3%)	Reference		Reference	
<i>Yes</i>	22 (78.6%)	6 (21.4%)	2.39 (0.81 – 7.04)	0.115	1.69 (0.46 – 6.13)	0.428
Drinking	127 (87.6%)	18 (12.4%)				
<i>No</i>	87 (90.6%)	9 (9.4%)	Reference		Reference	
<i>Yes</i>	40 (81.6%)	9 (18.4%)	2.18 (0.80 – 5.89)	0.127	1.28 (0.37 – 4.45)	0.699
Study site	128 (87.7%)	18 (12.3%)				
<i>Campina do Siqueira</i>	36 (80.0%)	9 (20.0%)	Reference		Reference	
<i>Other</i>	92 (91.1%)	9 (8.9%)	0.39 (0.14 – 1.07)	0.066	0.32 (0.10 – 1.06)	0.063
Use of other pharmaceuticals ^b	128 (87.7%)	18 (12.3%)				
<i>No</i>	64 (94.1%)	4 (5.9%)	Reference		Reference	
<i>Yes</i>	64 (82.1%)	14 (17.9%)	3.5 (1.09 – 11.21)	0.035	3.70 (1.08 – 12.74)	0.038
Other analgesics	128 (87.7%)	18 (12.3%)				
<i>Paracetamol-only</i>	91 (91.9%)	8 (8.1%)	Reference		Reference	
<i>Paracetamol and others</i>	37 (78.7%)	10 (21.3%)	3.07 (1.13 – 8.40)	0.029	3.84 (1.17 – 12.65)	0.027

OR = odds ratio; CI = confidence interval. Adjusted models included all variables in the Table. Sample size of adjusted model = 145. Significant associations are marked in bold. ^aData represent count (mean ± standard deviation) for continuous variables and count (%) for categorical variables. ^bUse of any pharmaceuticals other than analgesics.

6 ARTIGO CIENTÍFICO 2 – “The analgesic dipyrrone affects pregnancy outcomes and endocrine-sensitive endpoints in female and male offspring rats”

Artigo submetido ao periódico *Toxicological Sciences*

The analgesic dipyrrone affects pregnancy outcomes and endocrine-sensitive endpoints in female and male offspring rats

Marcella Tapias Passoni^a, Daniele Cristine Krebs Ribeiro^a, Samara Christina França de Almeida^b, Bruna Furtado da Costa^b, Nicole Grechi^a, Sara Emilia Lima Tolouei^a, Tatiana Zauer Curi^a, Mônica Degraf Cavallin^c, Renata Marino Romano^c, Marco Aurélio Romano^c, Katherinne Maria Spencoski^d, Ariany Carvalho dos Santos^e, Roosevelt Isaias Carvalho Souza^e, Paulo Roberto Dalsenter^a, Anderson Joel Martino-Andrade^{a,b}

^aReproductive Toxicology Laboratory, Department of Pharmacology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^bAnimal Endocrine and Reproductive Physiology Laboratory, Department of Physiology, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

^cReproductive Toxicology Laboratory, Department of Medicine, State University of Centro-Oeste, Guarapuava, PR, Brazil

^dDepartment of Biosciences, Federal University of Paraná (UFPR), Palotina, PR, Brazil

^eHistopathology Laboratory, Department of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brazil

Corresponding author:

Anderson J. Martino-Andrade

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico – Jardim das Américas, ZIP 81531-980, Curitiba – PR, PO Box 19031, Brazil.

Phone: + 55 (41) 33611719 / Fax: + 55 (41) 33611714

E-mail: anderson.andrade@ufpr.br

Abstract

Dipyrone is an analgesic and antipyretic drug commonly used in many countries. Although generally not recommended during pregnancy, it is known that many women use dipyrone during the gestational period. In this study, we investigated the endocrine and reproductive effects of dipyrone in female and male offspring rats exposed *in utero* from gestational days 10-21. Pregnant rats were treated with dipyrone at 25, 75 and 225 mg/kg/day via oral gavage. Developmental landmarks – anogenital index (AGI), number of nipples, vaginal opening, first estrus, and preputial separation – were evaluated in the offspring. Reproductive parameters, including estrous cycle regularity, daily sperm production, weight and histopathology of reproductive organs, steroid hormone levels, and gene expression of selected markers of reproductive function were assessed at adulthood. At the highest dose, dipyrone induced a significant increase in post-implantation losses/fetal death and delayed parturition in dams. Offspring exposed *in utero* to the highest dose also exhibited significant changes in some early life markers of endocrine disruption, in particular increased AGI in females, indicating a proandrogenic effect, and increased rate of retained nipples in males, indicating an antiandrogenic response. No changes were observed in markers of puberty onset or reproductive parameters at adulthood. These results suggest that exposure to therapeutically relevant doses of dipyrone may induce mild endocrine disruptive effects that can be detected in late pregnancy and early life. Such effects may be relevant considering dipyrone use by pregnant women and the possibility of co-exposures with other endocrine disruptors.

Keywords: Metamizole; analgesics; endocrine disruptors; reproductive toxicology.

1. Introduction

Exposure to medicines and environmental chemicals capable of deregulating the endocrine system is an increasing concern for human and animal health. Although the strongest evidence of human endocrine disruption is related to a pharmaceutical product (diethylstilbestrol – DES), the possibility of endocrine disruption due to the use of commonly drugs, such as analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), is a recent concern (Kristensen et al., 2016; Sabir et al., 2019). These drugs are widely used worldwide and there are many evidences of epidemiologic, *in vivo*, and *in vitro* experimental studies demonstrating that certain analgesics and NSAIDs, such as paracetamol, ibuprofen, and acetylsalicylic acid, can act as endocrine disrupting chemicals causing reproductive disorders after *in utero* exposure (Kristensen et al., 2011, 2012; Albert et al., 2013; Mazaud-Guittot et al., 2013; Holm et al., 2015, 2016; Dean et al., 2016; Ben Maamar et al., 2017; Rossitto et al., 2019a, 2019b; Krebs Ribeiro et al., 2020). In addition to the widespread use by the general population, some studies indicate a high prevalence of analgesic use by women during the gestational and lactational periods, and sometimes, simultaneous use of more than one analgesic (Rathmell et al., 1997; McKenna e McIntyre, 2006; Kristensen et al., 2016; Thorpe et al., 2013).

Dipyrone, also known as metamizole, is a non-opioid pyrazolone derivative used as mild analgesic and antipyretic drug. Its mechanism of action is not completely elucidated, but it is known that the analgesic effects are achieved through the suppression of prostaglandin synthesis via cyclooxygenase (COX) enzymes inhibition, especially COX-3, and other associated mechanisms such as the endocannabinoid and opioidergic systems activation (Rogosch et al., 2012; Jasiocka et al., 2014; Crunfli et al., 2015; Topuz et al., 2020). Although it is generally well tolerated, dipyrone has been withdrawn from the market in the United States and some European countries or started to be used with restrictions due to possible associations with blood dyscrasias, such as agranulocytosis (Hedenmalm and Spigset, 2002; Andrade et al., 2016; Hoffmann et al., 2020a). This fact contributed to the lack of evidence on the safety of this drug, including possible endocrine disrupting effects. Although banned in several countries, dipyrone is still widely used worldwide, mainly in Brazil, where it is one of the main analgesics used by the general population usually as self-medication, since it is available as an over-the-counter drug (Da Silva Dal Pizzol et al., 2009; Arrais et al., 2016; Ferreira e Lopes,

2016; Pizzol et al., 2016; Moreira de Barros et al., 2019). Also, dipyrrone is marketed as a prescription drug in Germany and other European countries, and its use has increased in the past few years (Hoffmann et al., 2015; Hoffmann and Schmiemann, 2016; Hofmann et al., 2020b).

Studies in rats and humans have demonstrated that dipyrrone metabolites can be transferred from mother to fetuses as it is capable to cross the placental barrier (Giroux et al., 1990; Espiridião et al., 1996). As with most analgesics and NSAIDs, its use is not recommended during gestation since it is associated with an increased risk of adverse pregnancy outcomes. Systemic inhibition of prostaglandin synthesis during the third trimester has been associated with premature closure of the ductus arteriosus, impaired renal function in the fetus, oligohydramnios, and delayed labor (Rathmell et al., 1997; Ostensen & Skomsvoll, 2004).

Although contraindicated during pregnancy, it is known that many women use dipyrrone during the gestational period, including women that are unaware of their pregnancy status and may end up using this drug in early pregnancy, which is a critical period for reproductive development (Mengue et al., 2001; Fonseca et al., 2002; da Silva Dal Pizzol et al., 2009; Dathe et al., 2017). In order to investigate some endocrine disrupting mechanisms that are relevant to the gestational period, we previously assessed *in vivo* and *in vitro* (anti)androgenic (Passoni et al., 2018) and (anti)estrogenic (Passoni et al., 2021) activities of dipyrrone, as well as its potential effects on steroidogenesis. Our results indicated no significant agonistic or antagonistic activities of this drug or its main metabolites on androgen or estrogen receptors, but a potential for inhibition of *in vitro* conversion of progestins into androgens at high concentrations (Passoni et al., 2018; Passoni et al., 2021).

Considering the extension of dipyrrone use by human populations and the mounting evidence of endocrine disruption by commonly used analgesics and NSAIDs, such as paracetamol and ibuprofen, the assessment of dipyrrone endocrine disruptive properties is of pivotal importance. Therefore, for a broader assessment of the dipyrrone safety during pregnancy and offspring development, this study aimed to investigate reproductive effects of therapeutically relevant doses of this analgesic in female and male rats exposed *in utero* between gestation days 10-21, with emphasis on postnatal development from birth until adulthood.

2. Material and methods

2.1. Animals

Wistar rats were obtained from the animal facility of the Federal University of Parana (UFPR). During the experimental period, animals were maintained under standard housing conditions: 12h light/dark cycle, controlled humidity, and temperature (22 ± 2 °C) at the Reproductive Toxicology Laboratory (UFPR). Standard pellet food and filtered tap water were available *ad libitum*. All experimental protocols were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the UFPR (Protocol Number 1163) following national and international guidelines of animal welfare.

2.2. Selection of dipyron doses

The dipyron doses were based on human therapeutic use (maximum daily dose = 4 g) – (ANVISA, 2017) and allometric scaling. Based on the maximum human therapeutic dipyron dose for a 70 kg adult (57 mg/kg/day), we calculated the estimated therapeutic dose for rats as 223 mg/kg/day, following allometric extrapolation with rat body weight set at 0.3 kg and exponent scaling at 0.75 (Nevill, 1994). Based on these data, the highest dipyron dose was set at 225 mg/kg/day and two lower doses (75 and 25 mg/kg/day) were selected using a space factor of three. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) was used as a positive control in a high dose (750 mg/kg/day) because it is a known antiandrogenic phthalate capable to induce changes in several endocrine and reproductive endpoints selected in our study without causing overt signs of maternal toxicity, as demonstrated previously in developmental rat studies (Gray et al., 2000; Moore et al., 2001; Jarfelt et al., 2005).

2.4. Mating, treatment, and maternal data

Adult female and male rats (90 days) were mated during the last three hours of the dark phase of the light cycle at the proportion of three females to each male. Vaginal smears were collected and examined microscopically for the presence of sperm to confirm copulation. The day of sperm detection in the vaginal smears was considered as gestation day zero (GD 0) and mated females were randomly divided into the five experimental groups. Pregnant rats were treated with distilled water (2 ml/kg/day) as vehicle control, sodium dipyron (CAS 5907-38-0) at 25, 75 and 225 mg/kg/day or DEHP (CAS 117-81-7) at 750 mg/kg/day as a positive control for disruption of reproductive development.

Sodium dipyrone was supplied by Shandong Xinhua Pharmaceutical (Zibo, China). DEHP and canola oil were obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Dipyrone doses were dissolved in distilled water and DEHP was dissolved in canola oil. All treatments were given from GD 10 to GD 21 by oral gavage at an administration volume of 2 ml/kg/day. For sedation induction before euthanasia, we used isoflurane (CAS 26675-46-7) from Cristália (São Paulo, Brazil).

The selected treatment period (GD 10-21) includes critical windows of gonadal and phenotypic sexual differentiation. In rats, gonadal differentiation occurs between gestation days 10–15, while hormone-dependent genital differentiation occurs in late pregnancy, approximately from GD 15 to the end of gestation (Ross and Capel, 2005; Sharpe, 2006; Hay-Schmidt et al., 2017).

Maternal weight was recorded on GDs 0 and 7, daily during the treatment period, and weekly during the lactation period until weaning (postnatal day 21). Data on body weight gain during the whole pregnancy and during the treatment and lactation periods were recorded. From GD 21 onwards, cages were checked twice daily (09:00 AM and 05:00 PM) for detection of birth, and the pregnancy length was recorded accordingly. After weaning, all dams were euthanized by isoflurane inhalation in a closed chamber followed by decapitation. The maternal organs (uterus, ovaries, liver, spleen, kidneys, and adrenal glands) were removed and weighed, and the number of implantation sites in the uterus was counted to determine post-implantation losses (number of implantation sites - number of live offspring / number of implantation sites).

2.5. Offspring data

For measurements from birth to puberty, all animals were used. After the assessment of landmarks of pubertal development, we randomly selected two male and two female rats from each litter for further assessment up to adulthood. The day of birth was considered as postnatal day 1 (PND 1) and the offspring weaning occurred on PND 21. Litter size, pup's birthweight, birth index (% of live pups in relation to total pups born), and sex ratio were recorded on PND 1. The viability index was calculated on PND 4 and corresponds to the number of live offspring on PND 4 in relation to the total number of live offspring at birth. During lactation, the litters were weighed on PNDs 1, 4, 7, 14, and 21, without distinction between female and male pups. After weaning, animals were weighed individually on a weekly basis. All

animals from each litter were individually weighed between PNDs 28 and 42. From PNDs 49 to 77 for females or from PNDs 49 to 91 for males, only two females and two males per litter, which were randomly selected to remain in the study until termination, were evaluated for body weight gain and further evaluations.

On PND 4, the anogenital distance (AGD), a biomarker of prenatal androgenic exposure, was measured in all female and male pups. This measure was performed using a digital caliper from the center of the anus to the base of the genital papilla. Two measurements were taken for each pup and the average was used. The individual body weights of each pup on PND 4 were used to calculate the anogenital index (AGI), which corresponds to the mean AGD value divided by the cubic root of body weight ($AGD / [body\ weight]^{1/3}$) (Gallavan et al. 1999). On PND 13, female and male pups were also evaluated for the number of nipples, defined as dark focal areas, with or without nipple bud, located along the milk line. A single investigator, who was unaware of the animals treatment group, performed all AGD measurements and counted the number of nipples.

The female offspring were evaluated daily for vaginal opening (VO) from PND 33 until the day of complete opening. The day of complete VO and body weight on that day were recorded. Vaginal smears were collected daily after VO until the first estrus (FE) detection, which is characterized by the predominance of cornified epithelial cells, and body weights on that day were also recorded. After the FE detection, two females per litter were randomly selected for further evaluations. In one female, vaginal smears were collected daily from PND 70 to assess the regularity of the estrous cycle during three complete estrus. The other female was selected for behavioral assessments in a separate study.

For the cycle regularity, the evaluation of vaginal smears was based on the following cytological criteria for estrous cycle staging: predominance of nucleated epithelial cells (pro-estrus), predominance of cornified epithelial cells (estrus), presence of both nucleated and cornified epithelial cells and leucocytes (metaestrus) and predominance of leucocytes (diestrus) (Marcondes et al., 2002). The mean cycle length (days) and number of animals with prolonged estrus (> 1 day) were evaluated.

Male offspring were evaluated daily for preputial separation (PPS) from PND 35 by manual retraction of the prepuce. This procedure was performed until all males presented complete separation, with the full exposure of the mature glans penis. The

day PPS was complete, body weight was recorded. After the PPS detection, two males per litter were randomly selected for further evaluations.

2.6. Euthanasia and sample collection

Animals were euthanized by isoflurane inhalation in a closed chamber, followed by decapitation. The females and males of each litter were euthanized immediately after the FE and PPS detection, respectively, except for two females and two males per litter that were randomly selected for assessments up to adulthood. One selected female was examined for estrous cycle regularity from PND 70 and euthanized at the third estrous detection, approximately between PNDs 85 to 90, for assessment of organs weights, ovarian and uterus histopathology, ovarian gene expression, and serum progesterone concentrations, while the second littermate was euthanized after behavioral testing in a separate study. The two males of each litter that were retained in the study were euthanized between PNDs 91 and 110 for assessment of organs weights, testicular and epididymal histopathology, daily sperm production, gene expression in testes and seminal vesicles, and serum testosterone concentrations.

For the hormonal analyses, trunk blood was collected in female and male adult rats following decapitation. Reproductive organs from female (uterus, ovaries) and male adult rats (testes, epididymides, ventral prostate, seminal vesicle without fluid, levator ani muscle/bulbocavernous muscle (LABC), bulbourethral glands, glans penis) and non-reproductive organs (liver, spleen, kidneys, and adrenal glands) were removed, dissected to remove the surrounding connective tissue, and weighed. Organs weights were recorded and expressed as absolute (g) and relative (absolute organ weight \times 100 / body weight) weights.

The uterus and the left ovaries of 5 females per group, from different litters, were used for histopathological evaluation, and the right ovaries of 8 females per group were used for gene expression analysis. In males, the right testes were used for daily sperm production, and the left testes of 5 males per group, were used for histopathological evaluation. Also, the seminal vesicle and the left testes from 8 males per group were used for gene expression analysis.

2.8. Daily sperm production

After removal of the tunica albuginea, the right testes were homogenized in 10 ml of saline (0.9% NaCl) containing 0.05% Triton X-100 for 1 min. The homogenate was diluted ten times in saline for the microscopic count of the number of homogenization-resistant spermatids in a hemocytometer (Bürker, Wertheim, Germany). The number of spermatids per animal was divided by 6.1 (corresponding to the number of days when spermatids in stages 17–19 are present in the seminiferous epithelium) for conversion to daily sperm production (Robb et al., 1978).

2.9. Hormonal analyses

Serum progesterone was quantified by automated chemiluminescent immunoassay (Access, Beckman-Coulter Inc., USA), using rabbit anti-progesterone antibody, progesterone-alkaline phosphatase conjugate, and paramagnetic particles coated with goat anti-rabbit capture antibody. The results were expressed as ng/mL and the assay sensitivity was 0.10 ng/mL. All samples were evaluated in a single replicate and in a single run. Serum testosterone was quantified by enzyme immunoassay according to the protocol described by Brown et al. (2004). The assay procedure was performed using polyclonal anti-testosterone antibody (R156/7; 1:7500 dilution) and horseradish peroxidase-testosterone conjugate obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA). We used a substrate buffer containing 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) and hydrogen peroxide from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Absorbance measurements were performed at 405 nm in a microplate reader (Infinity 200 PRO, TECAN Life Sciences, Mannedorf, Switzerland). The results were expressed as ng/mL and the assay sensitivity was 4.6 ng/mL. All testosterone samples were evaluated in duplicate, and intra and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 15%, respectively.

2.10. Histopathological evaluation of reproductive organs

The uterus, ovaries, testes, and epididymides were fixed by immersion in modified Davidson's solution – 30% of formaldehyde solution, 15% of absolute ethanol, 5% of glacial acetic acid, 50% of distilled water – (Latendresse et al., 2002). After fixation, tissues were kept in 70% ethanol and then dehydrated with increasing absolute ethanol concentrations, diaphanized in xylol, paraffin-embedded, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic analysis. The

organs sections (n = 5 animals/group) were examined by a certified veterinary pathologist (A.C.S). Histopathological evaluation consisted of investigating general morphological aspects of the tissues and verifying parameters such as reversible and/or irreversible cellular lesions.

2.11. Gene expression analysis

After being removed, ovaries, testes, and seminal vesicles were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further evaluation of the transcript expression (mRNA content) of selected genes by reverse transcription followed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The following genes were evaluated in the ovaries: (1) proteins involved in the steroidogenesis: steroidogenic acute regulatory protein (*Star*), cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp11a1*), and cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (*Cyp19a1*) – aromatase; (2) steroid hormone receptors: progesterone receptor (*Pgr*) and estrogen receptor 2 (*Esr2*); (3) gonadotropins receptors: luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (*Lhcgr*) and follicle-stimulating hormone receptor (*Fshr*); (4) inhibin beta B subunit (*Inhbb*), and (5) regulator of folliculogenesis and ovulation: growth differentiation factor 9 (*Gdf9*). In males, *Lhcgr* and *Star* were evaluated in the testes, and androgen receptor (*Ar*) was evaluated in the seminal vesicle. For gene expression analyses we used one littermate per sex and the final sample size ranged from 4 to 8 litters in each group.

Each sample was homogenized with 500 µl of TRIzol® Reagent (Life Technologies, Carlsbad, California) in Polytron® for 1 minute, and total RNA was then extracted according to the manufacturer's instructions. During precipitation, samples were kept in a bucket with ice at -20°C during 24h to improve RNA recovery with addition of 1 µl of glycogen (Ultrapure glycogen, Life Technologies, Carlsbad, California). Total RNA concentration was estimated with a nanospectrophotometer (Kasvi, Brazil) by measuring the absorbance at 260 and 280 nm. The A260/A280 ratio was used for the evaluation of RNA purity, which was considered adequate in the range 1.9-2.1. The integrity of the total RNA samples was verified using 1.2% agarose gel electrophoresis in TAE buffer, by visualization of ribosomal bands 18S and 28S stained by ethidium bromide. Then, 2.5 µg of total RNA were reverse transcribed for 60 minutes at 42°C with an oligo (dT) primer using the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA), according to

manufacturer's instructions. Real-time PCR was carried out with Power Up Sybr Green Master Mix (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. The amplification was performed using the Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), with the cycle conditions: 50°C (2 minutes), 95°C (2 minutes), and 40 cycles of 95°C (15 seconds) and 60°C (1 minute). The reaction volume was 10 µl, containing 12.5 ng of cDNA, 1 µmol L⁻¹ primers, 0.5 µmol L⁻¹ ROX (rhodamine X aka R101) dye and 5 µl of Power Up Sybr Green Master Mix (Life Technologies). At the end of the reaction, a melting curve was generated and analyzed to confirm the specificity of the amplification. The average cycle threshold (Ct) was automatically determined using StepOne™ Software version 2.3 (Applied Biosystems), and quantification of relative expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described by Livak and Schmittgen, 2001. Ribosomal protein L19 (Rpl19) was used as internal control because its variation was not affected by the treatment (Schmittgen and Zakrajsek, 2000). The primer sequences used for RT-qPCR analyses and GenBank access number of target genes are shown in **Supplementary Table 1**. The primer amplification efficiencies were tested using a standard curve for cDNA and primer dilution. The amplification efficiencies were calculated with resources of equipment and varied between 0.9 and 1.1 (Livak and Schmittgen, 2001).

2.12. Statistical analyses

Normality and homogeneity of variances were evaluated before statistical analysis. Parametric data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between treatment groups and vehicle control group were assessed using the Dunnett's test. Non-parametric data were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Data on the parturition day (proportion of animals with parturition before and after GD 22) and proportion of male rats with nipple retention were analyzed by 2x2 Fisher's exact test with Bonferroni adjustment for multiple comparisons. Dams body weight gain during pregnancy and lactation period, and offspring body weight gain from birth until weaning, and from weaning until adulthood were analyzed by mixed ANOVA with time as repeated measure and treatment as fixed factor.

In all analyses, litters were used as the statistical unit, i.e. whenever more than one littermate was used we calculated the mean litter values. Results are

presented as means \pm standard error of the mean (SEM), median (Q1, Q3), proportions or %. Differences were considered statistically significant at a probability level of 5% ($p \leq 0.05$). All the statistical analyses and graphs were performed using Graph-Pad Prism[®] software version 8.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Dipyrone increases post-implantation losses and gestation length

Data on maternal and pregnancy outcomes are shown in **Table 1**. At the dose levels tested, dipyrone had no significant effects on dams body weight gain during pregnancy, treatment, and lactation periods. However, the post-implantation losses and the pregnancy length were significantly affected by treatment with the highest dipyrone dose (**Figure 1**). Exposure to D225 induced a higher rate of post-implantation loss as well as a delay in delivery (births after GD 22) in 40% of the dams. The data on parturition days for each treatment group is also presented in **Supplementary Table 2**.

In addition to the delayed delivery, we observed partial or complete blocking of parturition at the two highest dipyrone doses. In the D75 group, one dam died at gestation day 23, probably due to parturition complications, as she gave birth to three pups while retaining eight pups *in utero*. In the 225 group, one dam died on gestation day 23, retaining all thirteen pups *in utero*. Two other D225 dams, which delivered on gestation days 22 and 24, had all their pups dead on the day of parturition. However, most dams with delayed parturition in dipyrone-treated groups did not have complications, such as blocked parturition or increased rate of dead pups at birth. DEHP treatment did not change any maternal parameters. Maternal organ weights were also unaffected in any treatment group (**Supplementary Table 3**).

Data on birth outcomes are shown in **Table 2**. None of the dipyrone doses was able to change litter size, sex ratio, viability index, birth and weaning weights, or body weight gain from birth until weaning. However, exposure to D225 induced an increase ($p = 0.055$) of dead pups at birth (22.5%) when compared to the control group (0%). DEHP treatment significantly reduced pup birthweight and the viability index (% live pups on PND 4). There were no significant differences for body weight gain of rat offspring in the weaning and post-weaning periods in any treatment group (**Supplementary Figures 1 and 2**).

Table 1. Pregnancy outcomes following maternal exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Parameters	Experimental groups				
	Vehicle	D25	D75	D225	DEHP
Number of sperm positive females	17	19	18	19	16
Number of pregnant dams	12	14	13 ^a	16 ^a	11 ^a
Number of pregnant dams delivering live offspring	12	14	12	13	10
Dams that exhibited cannibalism behavior ^b	0	1	0	0	1
Final number of litters	12	13	12	13	9
Parturition on GD 22/after GD 22	12/0	12/2	12/1	9/6 [#]	10/0
Number of implantation sites	9.83 ± 0.81	10.86 ± 0.80	10.69 ± 0.75	11.38 ± 0.71	10.36 ± 1.27
Body weight gain during pregnancy GD 0-21 (g) ^c	117.40 ± 5.70	120.23 ± 5.67	106.92 ± 4.59	107.63 ± 4.06	121.03 ± 4.10
Body weight gain during treatment GD 10-21 (g) ^c	84.02 ± 4.96	85.62 ± 4.85	76.78 ± 4.95	73.14 ± 3.42	82.28 ± 3.76
Body weight gain during lactation PND 1-21 (g) ^d	55.34 ± 5.42	55.74 ± 4.96	54.68 ± 4.45	68.93 ± 4.83	68.12 ± 12.30

Data are shown as sample size, litter means ± SEM or proportions. ^aD75: one dam died at parturition; D225: one dam died at parturition and two dams delivered all their pups dead; DEHP: one dam had implantation sites but delivered no pups. ^bDams that killed all their pups by cannibalism. Data on the parturition day were analyzed by Fisher's exact test (pairwise Veh x treated): [#]p = 0.08 for Veh x D225 after Bonferroni adjustment. ^cSample size = number of pregnant dams, except for DEHP (n = 10). ^dSample size = final number of litters. Data on the body weight gain during pregnancy, treatment and lactation periods were analyzed by ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; GD = gestation day; PND = postnatal day.

Table 2. Birth and weaning outcomes of offspring exposed *in utero* to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Parameters	Experimental groups			
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 13)	D75 (n = 12)	DEHP (n = 9)
Litter size PND 1	9.42 ± 0.86	9.36 ± 0.99	8.77 ± 0.98	8.40 ± 1.12
Pup birthweight (g) PND 1	6.56 ± 0.13	6.69 ± 0.18	6.62 ± 0.11	6.31 ± 0.16
Birth index (%) PND 1	100.00 ± 0.00	92.00 ± 5.99	89.26 ± 7.66	77.52 ± 9.32 [#]
Sex ratio (% females) PND 1	60.45 ± 4.04	51.43 ± 5.36	53.05 ± 4.87	47.73 ± 5.17
Viability index (%) PND 4	99.24 ± 0.76	98.64 ± 0.93	97.98 ± 1.39	90.97 ± 4.47
Pup weaning body weight (g)	41.50 ± 1.64	40.23 ± 1.75	42.26 ± 1.43	42.56 ± 1.53
Pup body weight gain PND 1-21 (g)	34.95 ± 1.57	33.48 ± 1.70	35.64 ± 1.39	36.25 ± 1.56

All data are shown as litter means ± SEM. Pup birthweight: *(p < 0.05) ANOVA/Dunnett. The birth index corresponds to the % of live pups on PND 1 and it was analyzed by Kruskal-Wallis (p = 0.10), followed by Dunn's multiple comparisons: [#](p = 0.055) Veh x D225. Viability index corresponds to % of live offspring on PND 4: ^{**}(p < 0.01) Kruskal-Wallis/Dunn's. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of litters; PND = postnatal day.

3.2. Dipyronne changes early life markers of endocrine disruption but does not affect puberty onset

Data on developmental landmarks of female offspring, including AGD and AGI (PND 4), number of nipples (PND 13), VO and FE are shown in **Table 3**. No effects were observed on the number of nipples in the female pups exposed *in utero* to dipyronne or DEHP. However, at the highest dose, dipyronne induced an increase of 10% and 12% in the female AGD and AGI, respectively, reaching statistical significance for AGI (**Figure 2**), indicating a possible proandrogenic effect. There were no significant effects on the median ages at VO and FE, indicating that the puberty onset occurred within the expected period and with all parameters within normal limits. Also, no differences were seen in the body weight at the VO or FE ages.

No significant differences were seen for AGD, AGI, PPS, and body weight at PPS in male pups treated with dipyronne *in utero* (**Table 3**). However, the percent of males with nipples was significantly increased in the groups exposed to dipyronne 225 (70%) and DEHP (100%) in relation to control (24%) (**Figure 2**), indicating a possible antiandrogenic effect. On the other hand, the median number of nipples expressed per litter basis was not significantly different between control and treated groups, except for a significant increase in the group exposed to DEHP.

As expected, AGD and AGI were significantly reduced, and an increased number of retained nipples were observed in males exposed *in utero* to the highest DEHP dose used in this study. Also, the median age at PPS was significantly increased in DEHP exposed rats when compared to control group, indicating a delay in the onset of puberty. The body weight at PPS was also significantly increased, probably due to the later age of PPS acquisition in the DEHP group. Cases of unilateral cryptorchidism were seen in two males, one exposed to D75 and one exposed to DEHP. Unilateral absent testis and epididymis was seen in one DEHP exposed animal.

Table 3. Developmental landmarks outcomes of female and male offspring exposed *in utero* to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Parameters	Experimental groups				
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 12/13)	D75 (n = 12)	D225 (n = 13)	DEHP (n = 9)
<u>FEMALE</u>					
AGD on PND 4	2.05 ± 0.06	1.95 ± 0.06	1.95 ± 0.06	2.26 ± 0.13	2.15 ± 0.09
AGI on PND 4	0.98 ± 0.03	0.93 ± 0.03	0.94 ± 0.03	1.10 ± 0.05*	1.03 ± 0.03
Body weight on PND 4 (g)	9.37 ± 0.19	9.20 ± 0.21	9.13 ± 0.21	8.64 ± 0.39	8.75 ± 0.28
Number of nipples on PND 13	12.23 (12.00, 12.37)	12.27 (12.04, 12.50)	12.23 (12.00, 12.50)	12.17 (12.00, 12.47)	12.50 (12.10, 13.20)
Age at vaginal opening (days)	47.39 (42.50, 54.92)	46.47 (44.78, 49.71)	46.37 (43.37, 50.88)	44.00 (41.63, 48.92)	43.33 (42.07, 56.10)
Body weight at vaginal opening (g)	162.08 ± 9.49	153.06 ± 5.90	160.17 ± 6.76	149.82 ± 5.58	163.68 ± 8.91
Age at first estrus (days)	50.40 (43.72, 56.11)	48.38 (46.03, 51.81)	48.30 (45.69, 53.30)	46.00 (42.50, 50.17)	45.67 (44.15, 58.20)
Body weight at first estrus (g)	167.51 ± 9.10	158.95 ± 5.75	168.82 ± 6.30	152.90 ± 5.53	170.36 ± 9.20
<u>MALE</u>					
AGD on PND 4	4.50 ± 0.06	4.48 ± 0.06	4.51 ± 0.10	4.56 ± 0.10	3.63 ± 0.15****
AGI on PND 4	2.12 ± 0.03	2.11 ± 0.02	2.12 ± 0.04	2.17 ± 0.03	1.73 ± 0.05****
Body weight on PND 4 (g)	9.55 ± 0.17	9.68 ± 0.23	9.63 ± 0.21	9.29 ± 0.32	8.89 ± 0.31
Number of nipples on PND 13	0.20 (0.00, 0.95)	0.50 (0.07, 1.10)	0.47 (0.06, 1.16)	1.33 (0.52, 2.20)	7.60 (6.25, 11.10)****
Age at preputial separation (days)	46.09 (45.50, 47.90)	47.00 (45.90, 47.64)	46.33 (46.06, 46.75)	46.00 (44.83, 47.21)	47.67 (47.00, 49.15)*
Body weight at preputial separation (g)	180.25 ± 7.49	192.98 ± 3.52	187.67 ± 3.29	189.06 ± 3.08	201.91 ± 5.59*

Data on AGD, AGI, and body weights at AGD, vaginal opening, first estrus and preputial separation were analyzed by ANOVA/Dunnnett and are shown as litter means ± SEM. Data on number of nipples, age at vaginal opening, age at first estrus and age at preputial separation were analyzed by Kruskal-Wallis/Dunn and are shown as median (Q1, Q3). Significantly different from control group: *(p ≤ 0.05), ****(p ≤ 0.0001).

D25 group: n = 12 for females and n = 13 for males, as one litter had only male offspring. Offspring age at assessment: AGD = PND4; Nipples = PND13; Vaginal opening and first estrus = from PND33; Preputial separation = from PND 35. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of litters; AGD: anogenital distance; AGI: anogenital distance index; PND = postnatal day.

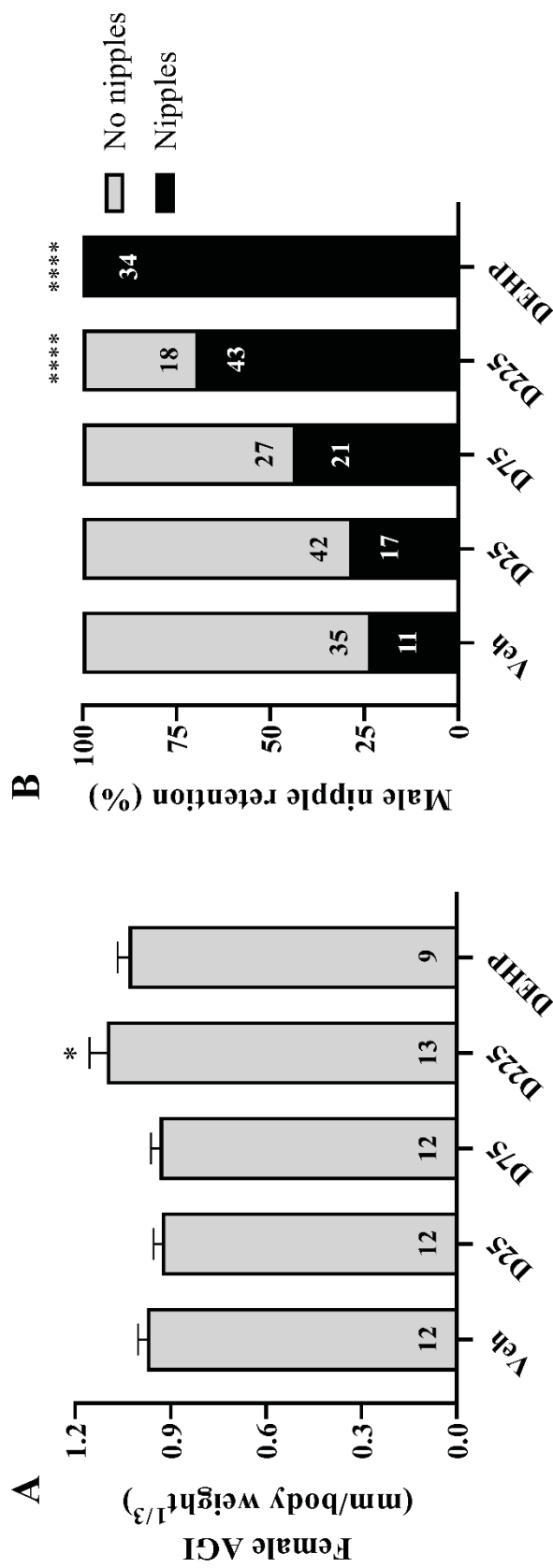


Figure 2. Female anogenital index (A) on PND4 and percentage of males with nipple retention (B) on PND13 following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21. (A) Data on female AGI were analyzed by ANOVA/Dunnett and are shown as litter means \pm SEM. Sample size is indicated inside bars. (B) Data on male nipple retention were analyzed by Fisher's exact test after Bonferroni adjustment and are shown as percent of males with and without nipples. The percent of males with nipples was significantly increased in the groups exposed to dipyrone 225 (70%) and DEHP (100%), in relation to control (24%). Numbers inside bars represent the total number of males with (black) and without (gray) nipples in each group. Significantly different from control group:

*($p \leq 0.05$), ***($p \leq 0.0001$). Veh = vehicle; D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; AGI = anogenital index.

3.4. Dipyrrone does not affect reproductive parameters in adult female and male rats

Data on estrous cycle regularity, hormonal levels, and daily sperm production are shown in **Table 4**. No effects were observed on the cycle length in the females exposed *in utero* to dipyrrone or DEHP. Also, there was no significant differences between groups in relation to the percentage of females with prolonged estrus. No significant differences were seen for daily sperm production in adult males treated with dipyrrone *in utero*. However, animals exposed to DEHP presented a significant reduction in daily sperm production when compared to the vehicle control group. Serum progesterone and testosterone levels did not present significant differences in any treatment group.

Data on the absolute reproductive organs weights are shown in **Table 4**. Female and male reproductive organs were unaffected in any dipyrrone treated group. On the other hand, *in utero* exposure to DEHP resulted in significant reductions in most male androgen-dependent organs and tissues, including epididymides, seminal vesicle, LABC, bulbourethral glands, and glans penis. The same profile of responses was observed for the analysis of relative reproductive organs weights of female and male offspring (**Supplementary Table 4**). There were no significant differences between groups on absolute and relative non-reproductive organ weights of female and male rats when compared to the vehicle control group (**Supplementary Table 5**).

Table 4. Absolute weight (g) of reproductive organs and reproductive endpoints of adult female and male rats following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Organs	Experimental groups				
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 12/13)	D75 (n = 12)	D225 (n = 13)	DEHP (n = 9)
FEMALE					
Body weight (g)	240.82 ± 6.65	238.85 ± 4.78	239.44 ± 3.09	246.31 ± 5.69	235.97 ± 7.12
Uterus (g)	0.503 ± 0.013	0.522 ± 0.018	0.504 ± 0.014	0.519 ± 0.017	0.539 ± 0.021
Ovaries (g)	0.064 ± 0.003	0.072 ± 0.002	0.071 ± 0.003	0.076 ± 0.004	0.070 ± 0.004
Mean cycle length (days)	4.38 ± 0.30	4.13 ± 0.19	4.29 ± 0.27	4.19 ± 0.17	4.83 ± 0.35
Animals with prolonged estrus ^a	3/12 (25%)	3/12 (25%)	1/12 (8%)	0/13 (0%)	1/9 (11%)
Serum progesterone levels (ng/mL)	30.08 ± 3.11	26.29 ± 2.86	22.43 ± 3.06	27.89 ± 3.12	24.13 ± 3.86
MALE					
Body weight (g)	416.63 ± 9.85	411.87 ± 8.00	420.31 ± 7.71	407.88 ± 5.69	419.66 ± 13.60
Testes (g)	1.881 ± 0.029	1.819 ± 0.031	1.875 ± 0.037	1.789 ± 0.028	1.779 ± 0.106
Epididymides (g)	0.560 ± 0.008	0.538 ± 0.009	0.549 ± 0.009	0.539 ± 0.010	0.486 ± 0.032**
Ventral prostate (g)	0.290 ± 0.017	0.283 ± 0.012	0.315 ± 0.015	0.326 ± 0.013	0.265 ± 0.013
Seminal vesicle (g)	0.602 ± 0.014	0.584 ± 0.015	0.593 ± 0.016	0.591 ± 0.023	0.489 ± 0.019***
LABC (g)	1.147 ± 0.020	1.114 ± 0.024	1.166 ± 0.029	1.141 ± 0.025	0.874 ± 0.039****
Bulbourethral glands (g)	0.113 ± 0.006	0.105 ± 0.006	0.115 ± 0.006	0.110 ± 0.007	0.081 ± 0.005**
Glans penis (g)	0.088 ± 0.001	0.085 ± 0.002	0.087 ± 0.001	0.085 ± 0.001	0.069 ± 0.004****
Daily sperm production	30.50 x 10 ⁶ ± 0.66	28.77 x 10 ⁶ ± 0.44	29.17 x 10 ⁶ ± 0.75	29.00 x 10 ⁶ ± 0.87	24.29 x 10 ⁶ ± 1.15****
Serum testosterone levels (ng/mL)	0.771 ± 0.166	0.585 ± 0.174	0.812 ± 0.244	0.760 ± 0.201	0.403 ± 0.073

All data are shown as litter means ± SEM. Adult females were euthanized in the 3rd estrus of the cycle regularity assessment, approximately between PNDs 85-90. Adult males were euthanized between PNDs 91-110. ^aEstrus duration > 1 day; data are shown as proportions or %.

Significantly different from control group: **($p \leq 0.01$), ***($p \leq 0.001$), ****($p \leq 0.0001$); ANOVA/Dunnnett. Paired organs (ovaries, testes, epididymides, and bulbourethral glands) are the average of right and left sides. D25 group: $n = 12$ for females and $n = 13$ for males, as one litter had only male offspring. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of litters.

3.5. Dipyrone does not induce histopathological changes in female and male reproductive organs

In the histopathological analyses of uterus and ovaries, no changes were observed for any dipyrone doses or DEHP treatment (**Supplementary Figure 4**). It is noteworthy that in this analysis all females were in the same estrous cycle phase. No significant differences were observed in the histopathological analyses of testes and epididymides in any dipyrone group. However, 4 out of 5 animals exposed to DEHP presented severe morphological abnormalities, including absence and/or degeneration of germ cells in seminiferous tubules and vacuolization of Sertoli cells cytoplasm. In some areas we observed interstitial fibrosis, seminiferous epithelium degeneration, and inflammatory mononuclear cell infiltration (**Supplementary Figure 5**).

3.6. Dipyrone does not change gene expression profiles in reproductive organs of adult female and male rats

Gene expression (mRNA levels) of selected markers of steroidogenesis, follicle development, and hormone receptors in the adult ovaries were not significantly affected by *in utero* exposure to dipyrone (**Supplementary Figure 6**), but a higher variability of response was seen for some of these targets in dipyrone treated groups, in particular for the group exposed to 75 mg/kg/day. In the DEHP exposed group, the transcript expression of *Star* and *Esr2* was reduced, while *Cyp11a1* expression showed an increase when compared to the vehicle control group. In males exposed *in utero* to dipyrone, the mRNA levels of selected genes in the testis (*Lhcgr* and *Star*) and in the seminal vesicle (*Ar*) were not significantly changed in relation to vehicle control group (**Supplementary Figure 7**), although a somewhat larger variability of response was also observed.

4. Discussion

In the present study, we investigated the endocrine and reproductive effects of therapeutically relevant doses (25, 75 and 225 mg/kg/day) of dipyrone in female and male offspring rats exposed *in utero*. Maternal treatment (GD10 - GD21) resulted in developmental toxicity at the highest dose, as demonstrated by increased rate of post-implantation loss/fetal death and delayed parturition (increased gestation length). Female pups exposed to the highest dose also displayed increased AGI on

PND 4, indicating a possible proandrogenic effect. In contrast, in male offspring dipyrone treatment resulted in a dose-dependent increase in nipple retention, reaching statistical significance at 225 mg/kg/day, and suggesting an antiandrogenic response. No changes were observed in the timing of puberty or reproductive endpoints at adulthood, including no effects on estrous cyclicity, ovarian and testicular histology, sperm production, reproductive organs weights, hormonal analyses, and gene expression of selected markers of reproductive function.

Increased gestation length is a commonly observed effect following NSAIDs exposure during late gestation, which is mainly related to inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme activity and consequent suppression of prostaglandin E2 (PGE2) synthesis, involved in the process of parturition (Waltman et al., 1973; Powell & Cochrane, 1982). However, dipyrone has only limited potential for COX-2 inhibition and, hence, weak anti-inflammatory activity. Although dipyrone may also act as a spasmolytic drug, apparently via inhibition of intracellular Ca^{2+} release by reduced inositol phosphate (IP) synthesis (Gulmez et al., 2006), studies with isolated rat (Vallina et al., 1995) and swine (Künzel et al., 2011) uterus indicate no or only mild inhibition of uterine contractility, being far less potent than classical NSAIDs, such as diclofenac and indomethacin.

Another potential mechanism for the parturition delay in rats exposed to the highest dipyrone dose may be related to a possible increase in maternal progesterone production. In rodents, a pronounced decline in progesterone levels at late gestation is critical for parturition induction and the prevention of progesterone withdrawal may increase the gestation length and, as a consequence, reduce fetal viability (Fang et al., 1996; Melching-Kollmuss et al., 2017). In our previous dipyrone study, we reported increased progesterone and 17-OH-progesterone, and reduced androgen levels in human H295R adenocarcinoma cells exposed *in vitro* to high concentrations of dipyrone and its main metabolites (Passoni et al., 2018), indicating inhibition of CYP17-lyase, the enzyme responsible for the conversion of progestins into androgens. In agreement with these results, Jaroszewski et al. (2009) reported increased progesterone production in cultured bovine luteal cells exposed *in vitro* to dipyrone. Thus, it is possible that the delayed parturition in dams exposed to the highest dipyrone dose in the current study may be related to persistent elevated progesterone levels, but further studies are needed to confirm this effect. It is also important to mention that the abrupt drop in maternal progesterone levels,

considered critical for parturition in rodents, seems to be less important for humans, who rather display a state of reduced responsiveness to progesterone at parturition (Menon et al., 2016).

In the exposed offspring, changes in early life markers of endocrine disruption may also point to a possible disruption of maternal and/or fetal steroidogenesis with unbalances in the production of progestins and androgens. In female pups, dipyrone 225 mg/kg/day induced a significant increase in the AGI on PND 4, suggesting a masculinizing/proandrogenic effect. It is known that increased progestin levels may induce masculinizing effects in the female rat offspring, including increased anogenital distance (Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007). Such masculinizing effects may be related to direct actions of progestins on the progesterone receptor and/or off-target activation of the androgen receptor (Willingham et al., 2006; Schwartz et al., 2019). In contrast, in the male offspring dipyrone induced a dose-response increase in nipple retention, a marker of prenatal antiandrogenic activity, with a significant higher rate of pups with nipple retention at 225 mg/kg/day. Despite the increased percentage of males displaying nipples on PND 13, dipyrone did not affect the AGI or the median number of nipples, indicating that the antiandrogenic effect was mild, especially when compared to the results of the high DEHP dose used as positive control. Results from studies with other endocrine disrupting chemicals also suggest that nipple retention may be a more sensitive indicator of antiandrogenic activity in comparison with other endpoints (Taxvig et al., 2007; Christiansen et al., 2012).

The overall profile of effects induced by maternal exposure to the highest dipyrone dose suggests a possible unbalance between progestins and androgens, with accumulation of progestins and reduced levels of androgens in maternal and/or fetal tissues, a hormonal unbalance that was also observed *in vitro* in our prior dipyrone study (Passoni et al., 2018). However, additional studies are needed to confirm the *in vivo* effects of dipyrone on the production of progestins and androgens in rat dams and also in female and male fetuses. Though, it is interesting to note that a very similar profile of effects, including reduced fetal viability, prolonged gestation length, increased anogenital index in females, and antiandrogenic effects in males has been reported in developmental toxicity studies with triazole and imidazole fungicides (Laier et al., 2006; Taxvig et al., 2007). These effects were at least in part associated with increased levels of progesterone and 17-OH-progesterone, and

decreased testosterone production in dams and exposed offspring (Laier et al., 2006). The lower availability of androgens in rats exposed to azole fungicides might also reduce the production of estrogens needed for parturition, an effect that may be further amplified by the ability of certain azole compounds to inhibit aromatase (CYP19) enzyme activity (Kragie et al., 2002). The potential for aromatase inhibition of dipyrone should also be investigated in future studies. It is interesting to note that dipyrone is a pyrazolone compound that shares some structural similarity with triazole and imidazole fungicides.

No changes were observed in puberty onset landmarks in both females and males exposed *in utero* to dipyrone. Vaginal opening, first estrus, and preputial separation were not affected by dipyrone treatment, indicating no effects in pubertal development. Furthermore, reproductive parameters at adulthood were also unaffected at any dipyrone dose tested. In adult female offspring, estrous cyclicity, progesterone concentration, reproductive organs weights, histopathological evaluation of uterus and ovaries, and gene expression of steroidogenesis markers (*Star*, *Cyp11a1*, and *Cyp19a1*), steroid hormone receptors (*Pgr* and *Esr2*), gonadotropins receptors (*Lhcgr* and *Fshr*), and markers of follicular development (*Inhbb* and *Gdf9*) were not affected by *in utero* exposure to dipyrone. These negative results are somewhat in contrast with data of recent animal studies indicating adverse consequences of prenatal exposure to certain analgesics and NSAIDs on postnatal ovarian development and other female reproductive endpoints (Dean et al., 2016; Holm et al., 2016; Rossitto et al., 2019b). In the adult male offspring exposed *in utero* to dipyrone, no effects were observed on sperm production and in histopathological evaluation of testes and epididymides. Unaffected testosterone production and the lack of effects on *Lh* receptor and *Star* gene expression in the testes, also indicate normal Leydig cell function. The reproductive organs weights and *Ar* expression in the seminal vesicle were also not altered, indicating normal responsiveness to androgenic hormones.

Although most analgesics and NSAIDs act by similar pharmacological mechanisms, mainly by inhibiting prostaglandins via COX inhibition, these drugs do not exhibit the same endocrine and reproductive toxicity profile. Many studies have shown that there is a significant response variability in different studies and model systems, due to the different analgesic-induced biological signatures (Kristensen et al., 2011; Kristensen et al., 2012; Dean et al., 2013; Axelstad et al., 2014; Ben

Maamar et al., 2017). These observations suggest that each drug may act through one or more alternative endocrine disruption mechanisms of action, which may include direct interactions with components of the hypothalamic-pituitary-gonads axis, changes in prostaglandin levels in the central nervous system, modulation of the endocannabinoid system, and possibly other unknown mechanisms (Ben Maamar et al., 2017; Bauer et al., 2021). The variability of responses may also be influenced by dose, treatment duration, and timing of exposure in different experimental models, which will determine the spectrum of the effects.

Taken together, our data suggest that maternal rat exposure to therapeutically relevant doses of dipyron may delay parturition, alter late fetal development, and induce changes in early life biomarkers of endocrine disruption that indicate proandrogenic (masculinizing) effects in female and antiandrogenic effects in male offspring. These alterations resemble the spectrum of effects previously reported for other compounds (e.g., azole fungicides) and are also in agreement with our own *in vitro* data that indicates a potential for dipyron and its metabolites to inhibit critical steps in the steroidogenic pathway. However, the effects on endocrine-sensitive landmarks were usually mild, especially when compared to the responses of the high DEHP dose used as a positive control and occurred mainly at the highest dose tested. Also, no significant effects were seen in pubertal development or in female and male reproductive endpoints examined at adulthood. On the other hand, it is important to recognize that although dipyron is generally not indicated during pregnancy, there are reports of gestational use, particularly in countries where dipyron is largely used as an over-the-counter analgesic by the general population. From the standpoint of endocrine disruption, our results raise concerns since the tested doses reflect the pharmacological use of dipyron in humans, but also considering potential intentional and nonintentional co-exposures with other pharmaceutical and environmental endocrine disruptors that impact common biological signaling pathways.

5. Funding

This study was financed by Fundação Araucária PPSUS 2015 – Grant number 052/2017 and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

6. Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

7. Acknowledgments

Marcella Tapias Passoni is a scholarship recipient from CAPES – PhD Student. Anderson Joel Martino-Andrade is fellowship recipient from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil).

8. References

- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejucq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(7), 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Andrade, S., Bartels, D. B., Lange, R., Sandford, L., & Gurwitz, J. (2016). Safety of metamizole: a systematic review of the literature. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 41(5), 459–477. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12422>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Novalgina® – Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda.
- Arrais, P. S., Fernandes, M. E., Pizzol, T. D., Ramos, L. R., Mengue, S. S., Luiza, V. L., Tavares, N. U., Farias, M. R., Oliveira, M. A., & Bertoldi, A. D. (2016). Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. *Revista de saude publica*, 50(suppl 2), 13s. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006117>
- Axelstad, M., Christiansen, S., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P. R., Isling, L. K., Kortenkamp, A., & Hass, U. (2014). Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* (Cambridge, England), 147(4), 489–501. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>
- Bauer, A. Z., Swan, S. H., Kriebel, D., Liew, Z., Taylor, H. S., Bornehag, C. G., Andrade, A. M., Olsen, J., Jensen, R. H., Mitchell, R. T., Skakkebaek, N. E., Jégou, B., & Kristensen, D. M. (2021). Paracetamol use during pregnancy - a call for precautionary action. *Nature reviews. Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00553-7>
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K. R., Coiffec, I., Rolland, A. D., Chevrier, C., Kristensen, D. M., Lavoué, V., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Dejucq-Rainsford, N., Mitchell, R. T., Mazaud-Guittot, S., & Jégou, B. (2017). Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Scientific reports*, 7, 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>

Christiansen, S., Kortenkamp, A., Axelstad, M., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P. R., Faust, M., Lichtensteiger, W., Schlumpf, M., Burdorf, A., & Hass, U. (2012). Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *International journal of andrology*, 35(3), 303–316. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01242.x>

Crunfli, F., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2015). Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyron. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 42(3), 246–255. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12347>

Da Silva Dal Pizzol, T., Schüler-Faccini, L., Mengue, S. S., & Fischer, M. I. (2009). Dipyron use during pregnancy and adverse perinatal events. *Archives of gynecology and obstetrics*, 279(3), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s00404-008-0707-3>

Dathe, K., Padberg, S., Hultsch, S., Meixner, K., Tissen-Diabaté, T., Meister, R., Beck, E., & Schaefer, C. (2017). Metamizole use during first trimester-A prospective observational cohort study on pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 26(10), 1197–1204. <https://doi.org/10.1002/pds.4277>

Dean, A., Mungall, W., McKinnell, C., & Sharpe, R. M. (2013). Prostaglandins, masculinization and its disorders: effects of fetal exposure of the rat to the cyclooxygenase inhibitor- indomethacin. *PloS one*, 8(5), e62556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062556>

Dean, A., van den Driesche, S., Wang, Y., McKinnell, C., Macpherson, S., Eddie, S. L., Kinnell, H., Hurtado-Gonzalez, P., Chambers, T. J., Stevenson, K., Wolfinger, E., Hrabalkova, L., Calarrao, A., Bayne, R. A., Hagen, C. P., Mitchell, R. T., Anderson, R. A., & Sharpe, R. M. (2016). Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific reports*, 6, 19789. <https://doi.org/10.1038/srep19789>

Espiridião, S., Oliveira-Filho, R. M., Doine, A., Simões, M. J., Focchi, G. R., Evêncio Neto, J., Kopelman, B. I., & Kulay Júnior, L. (1996). Morphological and biochemical action of dipyron on rat placenta. *General pharmacology*, 27(3), 505–507. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02066-7](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02066-7)

Fang, X., Wong, S., & Mitchell, B. F. (1996). Relationships among sex steroids, oxytocin, and their receptors in the rat uterus during late gestation and at parturition. *Endocrinology*, 137(8), 3213–3219. <https://doi.org/10.1210/endo.137.8.8754742>

Ferreira, T. R., & Lopes, L. C. (2016). Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions. *Jornal de pediatria*, 92(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jpmed.2015.04.007>

Fonseca, M. R., Fonseca, E. d., & Bergsten-Mendes, G. (2002). Prevalência do uso de medicamentos na gravidez: uma abordagem farmacoepidemiológica [Prevalence of drug use during pregnancy: a pharmacoepidemiological approach]. *Revista de saude publica*, 36(2), 205–212. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102002000200013>

Gallavan, R. H., Jr, Holson, J. F., Stump, D. G., Knapp, J. F., & Reynolds, V. L. (1999). Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reproductive toxicology*, 13(5), 383–390. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(99\)00036-2](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(99)00036-2)

Giroux, M., Campistron, G., Faure, F., Dumas, J. C., Coulais, Y., Desprats, R., Grandjean, H., Houin, G., & Pontonnier, G. (1990). Effects of pH on antipyrine transfer across the human placenta ex vivo. *Developmental pharmacology and therapeutics*, 14(3), 153–160.

Gray, L. E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D. N. R., & Parks, L. (2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological Sciences*, 58(2), 350–365. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350>

Gulmez, S. E., Gurdal, H., & Tulunay, F. C. (2006). Airway smooth muscle relaxations induced by dipyrone. *Pharmacology*, 78(4), 202–208. <https://doi.org/10.1159/000096688>

Hay-Schmidt, A., Finkielman, O., Jensen, B., Høgsbro, C. F., Bak Holm, J., Johansen, K. H., Jensen, T. K., Andrade, A. M., Swan, S. H., Bornehag, C. G., Brunak, S., Jegou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2017). Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. *Reproduction*, 154(2), 145–152. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0165>

Hedenmalm, K., & Spigset, O. (2002). Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole). *European journal of clinical pharmacology*, 58(4), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s00228-002-0465-2>

Hoffmann, F., & Schmiemann, G. (2016). Pain medication in German nursing homes: a whole lot of metamizole. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 25(6), 646–651. <https://doi.org/10.1002/pds.3954>

Hoffmann, F., Bantel, C., & Jobski, K. (2020a). Agranulocytosis attributed to metamizole: An analysis of spontaneous reports in EudraVigilance 1985-2017. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 126(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13310>

Hoffmann, F., Bantel, C., von Rosen, F. T., & Jobski, K. (2020b). Regional Differences in Prescribing Patterns of Metamizole in Germany Based on Data from 70 Million Persons. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3892. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113892>

Hoffmann, F., Meinecke, P., Freitag, M. H., Glaeske, G., Schulze, J., & Schmiemann, G. (2015). Who gets dipyrone (metamizole) in Germany? Prescribing by age, sex and region. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 40(3), 285–288. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12261>

Holm, J. B., Chalmey, C., Modick, H., Jensen, L. S., Dierkes, G., Weiss, T., Jensen, B. A., Nørregård, M. M., Borkowski, K., Styrihave, B., Martin Koch, H., Mazaud-Guittot, S., Jegou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2015). Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 148(1), 288–298. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv179>

Holm, J. B., Mazaud-Guittot, S., Danneskiold-Samsøe, N. B., Chalmey, C., Jensen, B., Nørregård, M. M., Hansen, C. H., Styrihave, B., Svingen, T., Vinggaard, A. M., Koch, H. M., Bowles, J., Koopman, P., Jégou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2016). Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 150(1), 178–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv332>

J.L. Brown, D. Ph, S. Walker, K. Steinman, F. Royal (2004). Endocrine Manual for Reproductive Non-Domestic species. Smithsonian's National Zoological Park Conservation and Research Center, p. 69-89. Endocrine Workbook.

Jarfelt, K., Dalgaard, M., Hass, U., Borch, J., Jacobsen, H., & Ladefoged, O. (2005). Antiandrogenic effects in male rats perinatally exposed to a mixture of di(2-ethylhexyl) phthalate and di(2-ethylhexyl) adipate. *Reproductive Toxicology*, 19(4), 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.11.005>

Jaroszewski, J. J., Markiewicz, W., Maślanka, T. S., & Skarzyński, D. J. (2009). Influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on progesterone production by cultured bovine luteal cells. *Polish journal of veterinary sciences*, 12(3), 305–310.

Jasiecka, A., Maślanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 207–214. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030>

Kragie, L., Turner, S. D., Patten, C. J., Crespi, C. L., & Stresser, D. M. (2002). Assessing pregnancy risks of azole antifungals using a high throughput aromatase inhibition assay. *Endocrine research*, 28(3), 129–140. <https://doi.org/10.1081/erc-120015045>

Krebs Ribeiro, D. C., Passoni, M. T., Meldola, H., Curi, T. Z., da Silva, G. N., Tolouei, S., Hey, G. S., Grechi, N., Dos Santos, A. C., Souza, R., Spencoski, K. M., Ramos, A., & Martino-Andrade, A. J. (2020). Prenatal diclofenac exposure delays pubertal development and induces behavioral changes in rats. *Reproductive toxicology*, 96, 380–389. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.001>

Kristensen, D. M., Hass, U., Lesné, L., Lottrup, G., Jacobsen, P. R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J. H., Toppari, J., Jensen, T. K., Brunak, S., Skakkebaek, N. E., Nellemann, C., Main, K. M., Jégou, B., & Leffers, H. (2011). Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(1), 235–244. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq323>

Kristensen, D. M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejuq-Rainsford, N., Leffers, H., & Jégou, B. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International journal of andrology*, 35(3), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x>

Kristensen, D. M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K. M., & Jégou, B. (2016). Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(7), 381–393. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.55>

Künzel, J., Geisler, K., Hoffmann, I., Müller, A., Beckmann, M. W., & Dittrich, R. (2011). Myometrial response to neurotropic and musculotropic spasmolytic drugs in an extracorporeal perfusion model of swine uteri. *Reproductive biomedicine online*, 23(1), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.03.026>

Laier, P., Metzdorff, S. B., Borch, J., Hagen, M. L., Hass, U., Christiansen, S., Axelstad, M., Kledal, T., Dalgaard, M., McKinnell, C., Brokken, L. J., & Vinggaard, A. M. (2006). Mechanisms of action underlying the antiandrogenic effects of the fungicide prochloraz. *Toxicology and applied pharmacology*, 213(2), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.10.013>

Latendresse, J. R., Warbritton, A. R., Jonassen, H., & Creasy, D. M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicologic pathology*, 30(4), 524–533. <https://doi.org/10.1080/01926230290105721>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian journal of biology*, 62(4A), 609–614. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>

Mazaud-Guittot, S., Nicolas Nicolaz, C., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Ben Maamar, M., Balaguer, P., Kristensen, D. M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejuq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(11), E1757–E1767. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>

McKenna, L., & McIntyre, M. (2006). What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. *Journal of advanced nursing*, 56(6), 636–645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2006.04037.x>

Melching-Kollmuss, S., Fussell, K. C., Schneider, S., Buesen, R., Groeters, S., Strauss, V., & van Ravenzwaay, B. (2017). Comparing effect levels of regulatory studies with endpoints derived in targeted anti-androgenic studies: example

prochloraz. *Archives of toxicology*, 91(1), 143–162. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1678-y>

Mengue, S. S., Schenkel, E. P., Duncan, B. B., & Schmidt, M. I. (2001). Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras [Drug use by pregnant women in six Brazilian cities]. *Revista de saude publica*, 35(5), 415–420. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102001000500002>

Menon, R., Bonney, E. A., Condon, J., Mesiano, S., & Taylor, R. N. (2016). Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: redundancy and synergy in human parturition. *Human reproduction update*, 22(5), 535–560. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw022>

Moore, R. W., Rudy, T. A., Lin, T. M., Ko, K., & Peterson, R. E. (2001). Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environmental Health Perspectives*, 109(3), 229–237. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109229>

Moreira de Barros, G. A., Calonego, M., Mendes, R. F., Castro, R., Faria, J., Trivellato, S. A., Cavalcante, R. S., Fukushima, F. B., & Dias, A. (2019). Uso de analgésicos e o risco da automedicação em amostra de população urbana: estudo transversal [The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study]. *Brazilian journal of anesthesiology (Elsevier)*, 69(6), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.bjan.2019.09.005>

Nevill, A. M., 1994. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. *Journal of Applied Physiology*, 77(6), 2870–2873. <https://doi.org/10.1152/jappl.1994.77.6.2870>

Ostensen, M. E., & Skomsvoll, J. F. (2004). Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(3), 571–580. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.3.571>

Passoni, M. T., Kristensen, M. N., Morais, R. N., Woitkowiak, C., Boareto, A. C., da Silva Amaral, B. A., Grechi, N., Dalsenter, P. R., Munkboel, C. H., Styrihave, B., Kristensen, D. M., Gomes, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2018). Assessment of the analgesic dipyron as a possible (anti)androgenic endocrine disruptor. *Toxicology Letters*, 285, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.021>

Passoni, M. T., Palu, G., Grechi, N., da Silva Amaral, B. A., Gomes, C., Rülker, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2021). Uterotrophic and in vitro screening for (anti)estrogenic activity of dipyron. *Toxicology letters*, 352, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.09.004>

Pérez Vallina, J. R., Cantabrana, B., & Hidalgo, A. (1995). Calcium-and G-protein-related spasmolytic effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on rat uterus contractions in vitro. *Pharmacology*, 50(5), 324–332. <https://doi.org/10.1159/000139298>

Pizzol, T. D., Tavares, N. U., Bertoldi, A. D., Farias, M. R., Arrais, P. S., Ramos, L. R., Oliveira, M. A., Luiza, V. L., & Mengue, S. S. (2016). Use of medicines and other products for therapeutic purposes among children in Brazil. *Revista de saude publica*, 50(suppl 2), 12s. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006115>

Powell, J. G., Jr, & Cochrane, R. L. (1982). The effects of a number of non-steroidal anti-inflammatory compounds on parturition in the rat. *Prostaglandins*, 23(4), 469–488. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(82\)90110-1](https://doi.org/10.1016/0090-6980(82)90110-1)

Rathmell, J. P., Viscomi, C. M., & Ashburn, M. A. (1997). Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. *Anesthesia and analgesia*, 85(5), 1074–1087. <https://doi.org/10.1097/00000539-199711000-00021>

Robb, G. W., Amann, R. P., & Killian, G. J. (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *Journal of reproduction and fertility*, 54(1), 103–107. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0540103>

Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzer, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., Cascio, M. G., Bisogno, T., Di Marzo, V., Nüsing, R., & Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.028>

Ross, A. J., & Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends in endocrinology and metabolism*, 16(1), 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2004.11.004>

Rossitto, M., Marchive, C., Pruvost, A., Sellem, E., Ghetas, A., Badiou, S., Sutra, T., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019a). Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(1), 339–357. <https://doi.org/10.1096/fj.201800488RRR>

Rossitto, M., Ollivier, M., Déjardin, S., Pruvost, A., Brun, C., Marchive, C., Nguyen, A. L., Ghetas, A., Keime, C., de Massy, B., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019b). In utero exposure to acetaminophen and ibuprofen leads to intergenerational accelerated reproductive aging in female mice. *Communications biology*, 2, 310. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0552-x>

Sabir, S., Akhtar, M. F., & Saleem, A. (2019). Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environmental science and pollution research international*, 26(2), 1277–1286. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3774-4>

Schmittgen, T. D., & Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 46(1-2), 69–81. [https://doi.org/10.1016/s0165-022x\(00\)00129-9](https://doi.org/10.1016/s0165-022x(00)00129-9)

Schwartz, C. L., Christiansen, S., Vinggaard, A. M., Axelstad, M., Hass, U., & Svingen, T. (2019). Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. *Archives of toxicology*, 93(2), 253–272. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2350-5>

Sharpe R. M. (2006). Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 20(1), 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2005.09.005>

Taxvig, C., Hass, U., Axelstad, M., Dalgaard, M., Boberg, J., Andeasen, H. R., & Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting activities in vivo of the fungicides tebuconazole and epoxiconazole. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 100(2), 464–473. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm227>

Thorpe, P. G., Gilboa, S. M., Hernandez-Diaz, S., Lind, J., Cragan, J. D., Briggs, G., Kweder, S., Friedman, J. M., Mitchell, A. A., Honein, M. A., & National Birth Defects Prevention Study (2013). Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 22(9), 1013–1018. <https://doi.org/10.1002/pds.3495>

Topuz, R. D., Gündüz, Ö., Karadağ, Ç. H., & Ulugöl, A. (2020). Non-opioid Analgesics and the Endocannabinoid System. *Balkan medical journal*, 37(6), 309–315. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.6.66>

Waltman, R., Tricomi, V., Shabanah, E. H., & Arenas, R. (1973). The effect of anti-inflammatory drugs on parturition parameters in the rat. *Prostaglandins*, 4(1), 93–106. [https://doi.org/10.1016/0090-6980\(73\)90059-2](https://doi.org/10.1016/0090-6980(73)90059-2)

Willingham, E., Agras, K., de Souza, A. E., Jr, Konijeti, R., Yucel, S., Rickie, W., Cunha, G. R., & Baskin, L. S. (2006). Steroid receptors and mammalian penile development: an unexpected role for progesterone receptor?. *The Journal of urology*, 176(2), 728–733. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.03.078>

9. Supplementary material

Supplementary Table 1. Primer sequences used for RT-qPCR analyses and GenBank access number of target genes

Gene	NCBI Reference Sequence	Primer sequence (5' – 3')
Ar (Androgen receptor)	NM_012502.1	F: GCCATGGGTTGGCGGTCCTT R: AGGTGCCTCATCCTCACGCACT
Cyp11a1 (Cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1)	NM_017286	F: GGAGCTGGTATCTCCTCTACCA R: TTGCCAGCTTCTCCCTGTAA
Cyp19a1 (Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1)	NM_080771.1	F: CGTCATGTTGCTTCTCATCG R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT
Esr2 (Estrogen receptor 2)	NM_012754.1	F: CTCACGTCAGGCACATCAGT R: TGTGAGCATTACAGCATCTCC
Fshr (Follicle stimulating hormone receptor)	NM_199237.1	F: TCACTGGCTGTGTCATTGCTC R: GAGATCTCTATTTTCTCCAGGTCTC
Gdf9 (Growth differentiation factor 9)	NM_021672.1	F: CAACCAGATGACAGGACCCC R: CACAGTGGAGGAGGAAGCAG
Inhbb (Inhibin beta B subunit)	NM_080771.1	F: GAGCGCGTCTCTGAGATCAT R: GAAGAAGTACAGGCGGACCC
Lhcgr (Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor)	NM_012978.1	F: AGTGGAGCCTTCCAGGGGGC R: AGGAAGACAGGGCGATGAGCGT
Pgr (Progesterone receptor)	NM_022847.2	F: GGGCATGACAACACAAAGCC R: GTAAGTCCGAAACCTGGC
Rpl19 (Ribosomal protein L19)	NM_031103.1	F: CAATGAAACCAACGAAATCG R: TCAGGCCATCTTTGATCAGCT
Star (Steroidogenic acute regulatory protein)	NM_031558	F: ACCAAGCGTAGAGGTTCCAC R: TTCAGCTCTGATGACACCGC

Supplementary Table 2. Data on parturition day following maternal exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Day of parturition	Experimental groups				
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 14)	D75 (n = 13)	D225 (n = 15)	DEHP (n = 10)
22	12 (100%)	12 (85.7%)	12 (92.3%)	9 (60%)	10 (100%)
23	0 (0%)	2 (14.3%)	1 (7.7%)	5 (33.3%)	0 (0%)
24	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6.7%)	0 (0%)

Data are shown as sample size or %. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of dams.

Supplementary Table 3. Absolute organs weights (g) of dams exposed to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Organs	Experimental groups			
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 13)	D75 (n = 12)	DEHP (n = 9)
Body weight (g)	308.87 ± 8.66	312.45 ± 9.03	314.83 ± 7.60	318.27 ± 13.99
Uterus (g)	0.394 ± 0.034	0.377 ± 0.039	0.418 ± 0.046	0.404 ± 0.043
Ovaries (g)	0.059 ± 0.004	0.058 ± 0.004	0.051 ± 0.002	0.063 ± 0.002
Liver (g)	17.540 ± 0.798	17.564 ± 0.931	18.626 ± 0.784	18.642 ± 1.070
Spleen (g)	0.732 ± 0.022	0.713 ± 0.034	0.736 ± 0.030	0.673 ± 0.020
Kidneys (g)	1.256 ± 0.030	1.256 ± 0.033	1.269 ± 0.032	1.283 ± 0.037
Adrenal glands (g)	0.050 ± 0.003	0.052 ± 0.002	0.050 ± 0.002	0.053 ± 0.003

All data are shown as means ± SEM. Organs weights were analyzed by ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons. All dams were euthanized after weaning. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of dams. Note: The same profile of responses was observed for the analysis of relative organs weights (data not shown).

Supplementary Table 4. Relative weight (g) of reproductive organs of adult female and male rats following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

Organs	Experimental groups				
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 12)	D75 (n = 12)	D225 (n = 13)	DEHP (n = 9)
<u>FEMALE</u>					
Body weight (g)	240.82 ± 6.65	238.85 ± 4.78	239.44 ± 3.09	246.31 ± 5.69	235.97 ± 7.12
Uterus (mg %)	210.21 ± 7.67	219.18 ± 7.82	210.63 ± 5.00	211.35 ± 7.35	229.60 ± 9.81
Ovaries (mg %)	26.71 ± 1.08	30.07 ± 0.76	29.58 ± 0.87	30.62 ± 1.12	29.69 ± 1.62
<u>MALE</u>					
Body weight (g)	416.63 ± 9.85	411.87 ± 8.00	420.31 ± 7.71	407.88 ± 5.69	419.66 ± 13.60
Testes (mg %)	453.55 ± 10.67	442.71 ± 7.73	446.41 ± 5.17	438.99 ± 6.06	426.63 ± 18.49
Epididymides (mg %)	134.88 ± 2.69	131.10 ± 2.35	130.78 ± 1.50	132.12 ± 2.01	116.13 ± 6.00***
Ventral prostate (mg %)	69.88 ± 4.24	68.98 ± 3.06	74.81 ± 3.38	79.88 ± 2.86	63.38 ± 3.15
Seminal vesicle (mg %)	145.19 ± 4.50	142.55 ± 5.22	141.21 ± 3.55	144.90 ± 5.21	116.98 ± 4.44***
LABC (mg %)	276.97 ± 8.01	271.09 ± 5.77	277.79 ± 6.71	279.56 ± 3.62	208.41 ± 6.69****
Bulbourethral glands (mg %)	27.09 ± 1.25	25.55 ± 1.37	27.43 ± 1.54	26.80 ± 1.46	19.43 ± 1.17**
Glans penis (mg %)	21.28 ± 0.40	20.64 ± 0.31	20.65 ± 0.35	20.77 ± 0.25	16.54 ± 0.85****

All data are shown as litter means ± SEM. Adult females were euthanized in the 3rd estrus of the cycle regularity, between PND 75-90. Adult males were euthanized between PND 91-110. Significant values are shown in bold: **($p \leq 0.01$), ***($p \leq 0.001$), ****($p \leq 0.0001$); ANOVA/Dunnnett. Paired organs (ovaries, testes, epididymides, and bulbourethral glands) are the average of right and left sides. D25 group (n

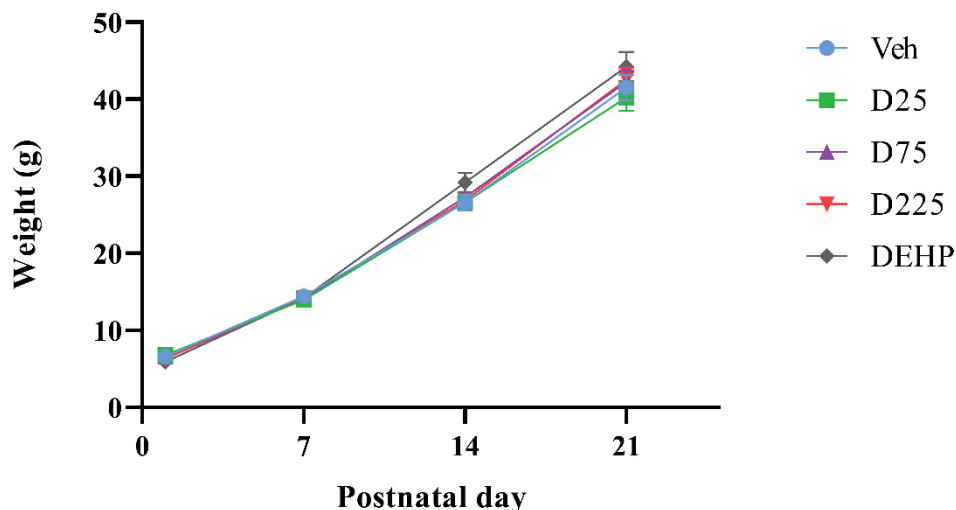
= 12/13): one dam had male offspring only. D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of litters.

Supplementary Table 5. Absolute weight (g) of non-reproductive organs of adult female and male rats following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21

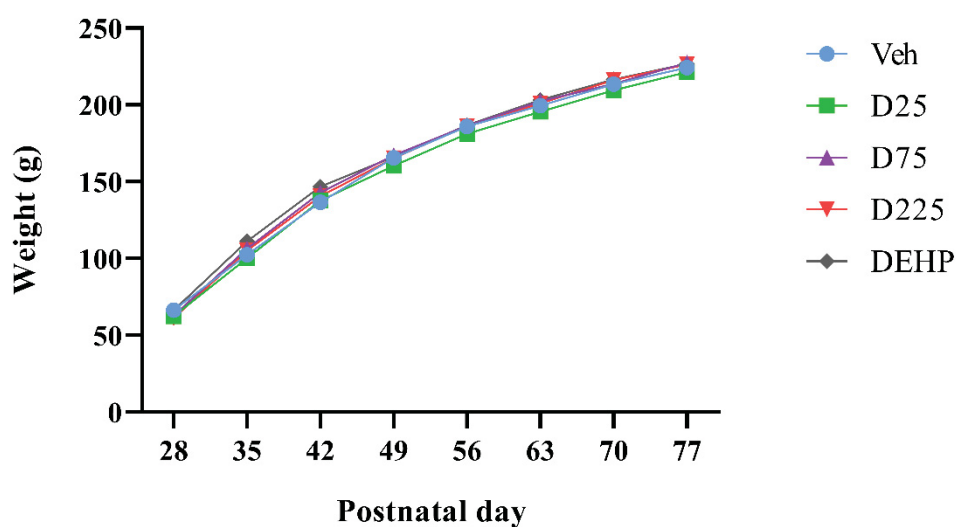
Organs	Experimental groups				
	Vehicle (n = 12)	D25 (n = 12)	D75 (n = 12)	D225 (n = 13)	DEHP (n = 9)
<u>FEMALE</u>					
Body weight (g)	240.82 ± 6.65	238.85 ± 4.78	239.44 ± 3.09	246.31 ± 5.69	235.97 ± 7.12
Liver (g)	9.109 ± 0.334	9.461 ± 0.252	9.627 ± 0.338	9.988 ± 0.353	8.924 ± 0.369
Spleen (g)	0.662 ± 0.026	0.660 ± 0.024	0.699 ± 0.034	0.738 ± 0.031	0.627 ± 0.029
Kidneys (g)	0.905 ± 0.024	0.905 ± 0.017	0.929 ± 0.031	0.955 ± 0.026	0.891 ± 0.029
Adrenal glands (g)	0.040 ± 0.001	0.041 ± 0.002	0.044 ± 0.002	0.044 ± 0.001	0.044 ± 0.002
<u>MALE</u>					
Body weight (g)	416.63 ± 9.85	411.87 ± 8.00	420.31 ± 7.71	407.88 ± 5.69	419.66 ± 13.60
Liver (g)	14.359 ± 0.520	14.353 ± 0.356	14.308 ± 0.244	14.466 ± 0.310	14.898 ± 0.417
Spleen (g)	0.851 ± 0.026	0.885 ± 0.023	0.884 ± 0.019	0.880 ± 0.021	0.867 ± 0.031
Kidneys (g)	1.444 ± 0.050	1.415 ± 0.028	1.434 ± 0.029	1.418 ± 0.027	1.438 ± 0.040
Adrenal glands (g)	0.029 ± 0.001	0.029 ± 0.001	0.030 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.028 ± 0.002

All data are shown as litter means ± SEM. Organs weights were analyzed by ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons. Adult females were euthanized in the 3rd estrus of the cycle regularity, between PND 75-90. Adult males were euthanized between PND 91-110.

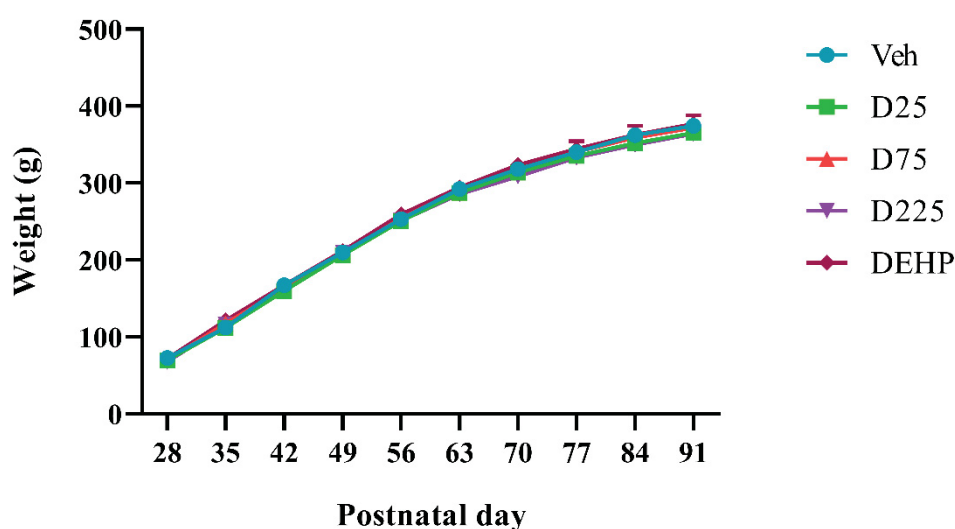
Paired organs (kidneys and adrenal glands) are the average of right and left sides. D25 group (n = 12/13): one dam had male offspring only. D = dipyrene (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; n = number of litters. The same profile of responses was observed for the analysis of relative organs weights (data not shown).



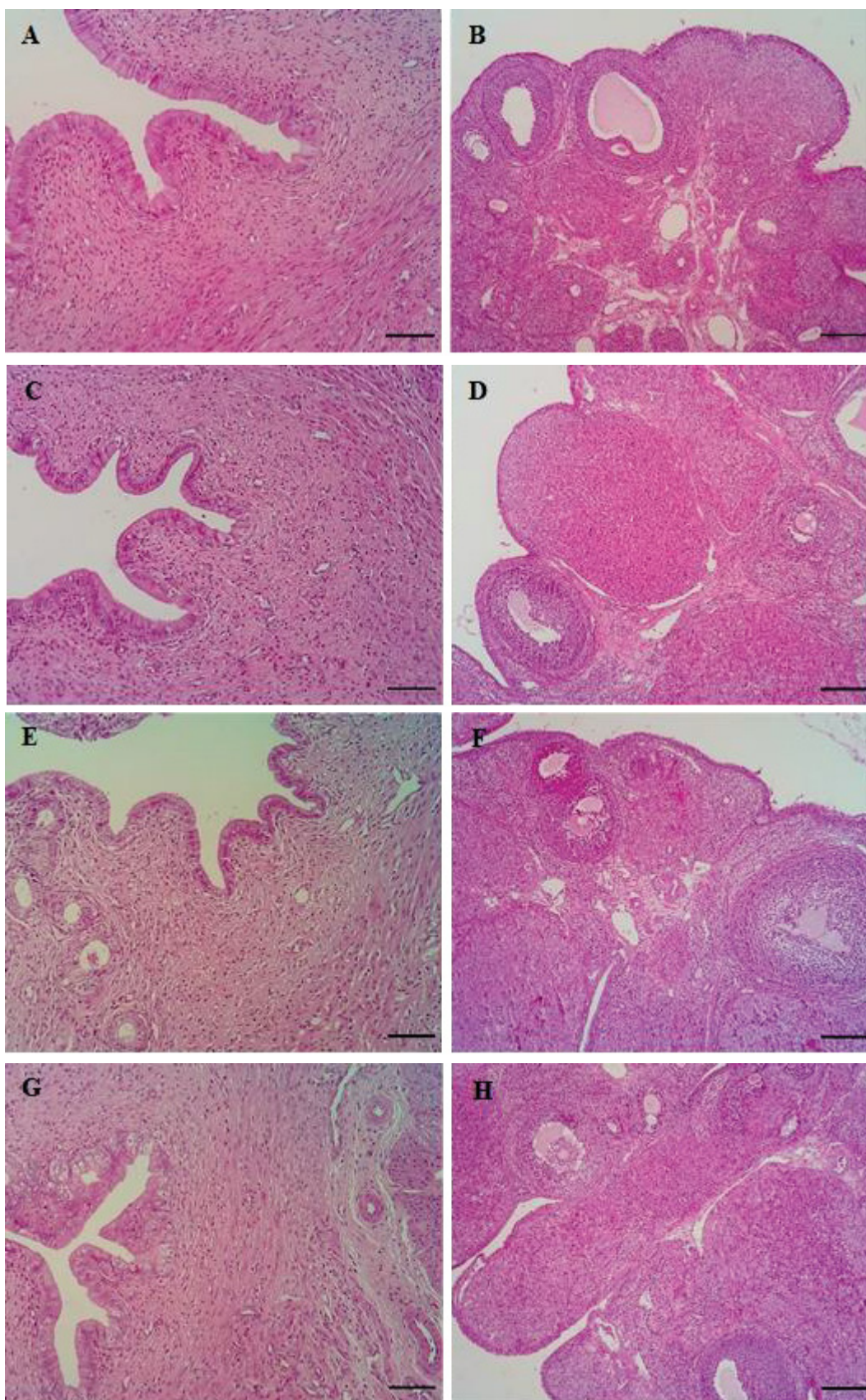
Supplementary Figure 1. Body weight of rat offspring in the lactation period following *in utero* exposure to dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21. All data are shown as litter means \pm SEM. Data were analyzed by mixed ANOVA. Veh = vehicle control; D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; PND = postnatal day; number of litters (9-13 litters/group). There was a significant effect of time, but no significant treatment effects or interaction.

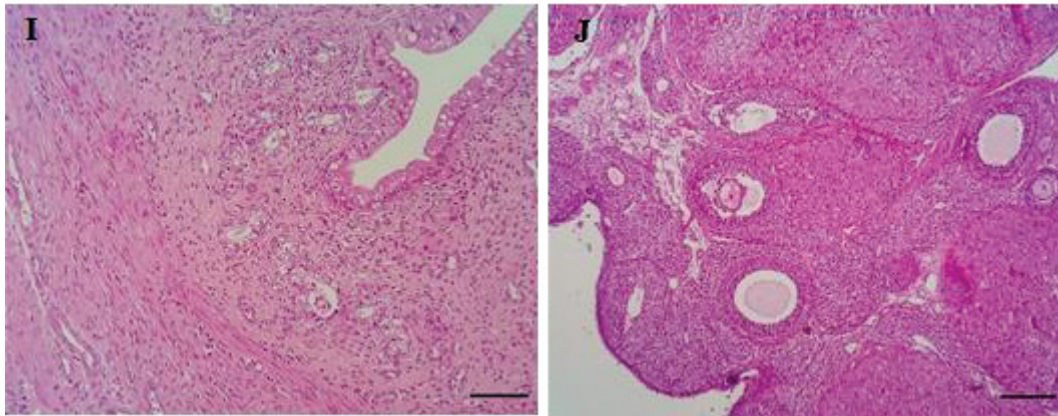


Supplementary Figure 2. Body weight of female offspring from postnatal day 28 to 77. All data are shown as litter means \pm SEM. Data were analyzed by mixed ANOVA. Veh = vehicle control; D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; PND = postnatal day; number of litters (9-13 litters/group). For days 28, 35, and 42, all females from each litter were. After day 42, only two females per litter were weighed. There was a significant effect of time, but no significant treatment effects or interaction.



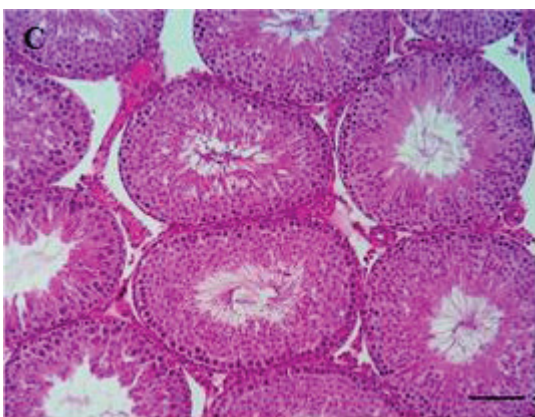
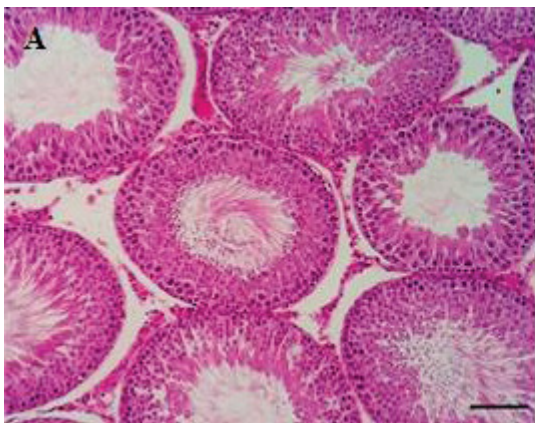
Supplementary Figure 3. Body weight of male offspring from postnatal day 28 to 91. All data are shown as litter means \pm SEM. Data were analyzed by mixed ANOVA. Veh = vehicle control; D = dipyrone (25, 75 or 225 mg/kg/day); DEHP = di-(2-ethylhexyl) phthalate 750 mg/kg/day; PND = postnatal day; number of litters (9-13 litters/group). For days 28, 35, and 42, all males from each litter were weighed. After day 42, only two males per litter were weighed. There was a significant effect of time, but no significant treatment effects or interaction.

UterusOvaries

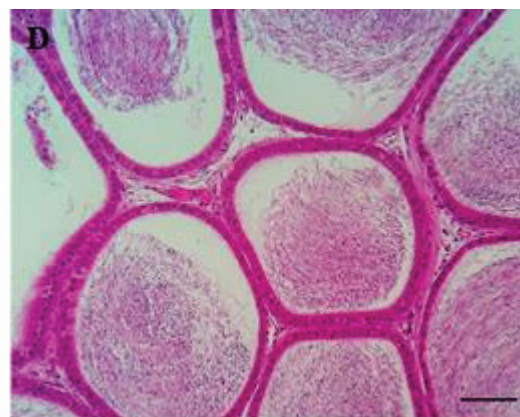
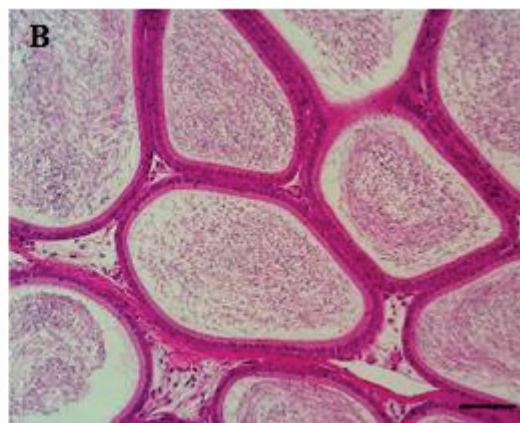


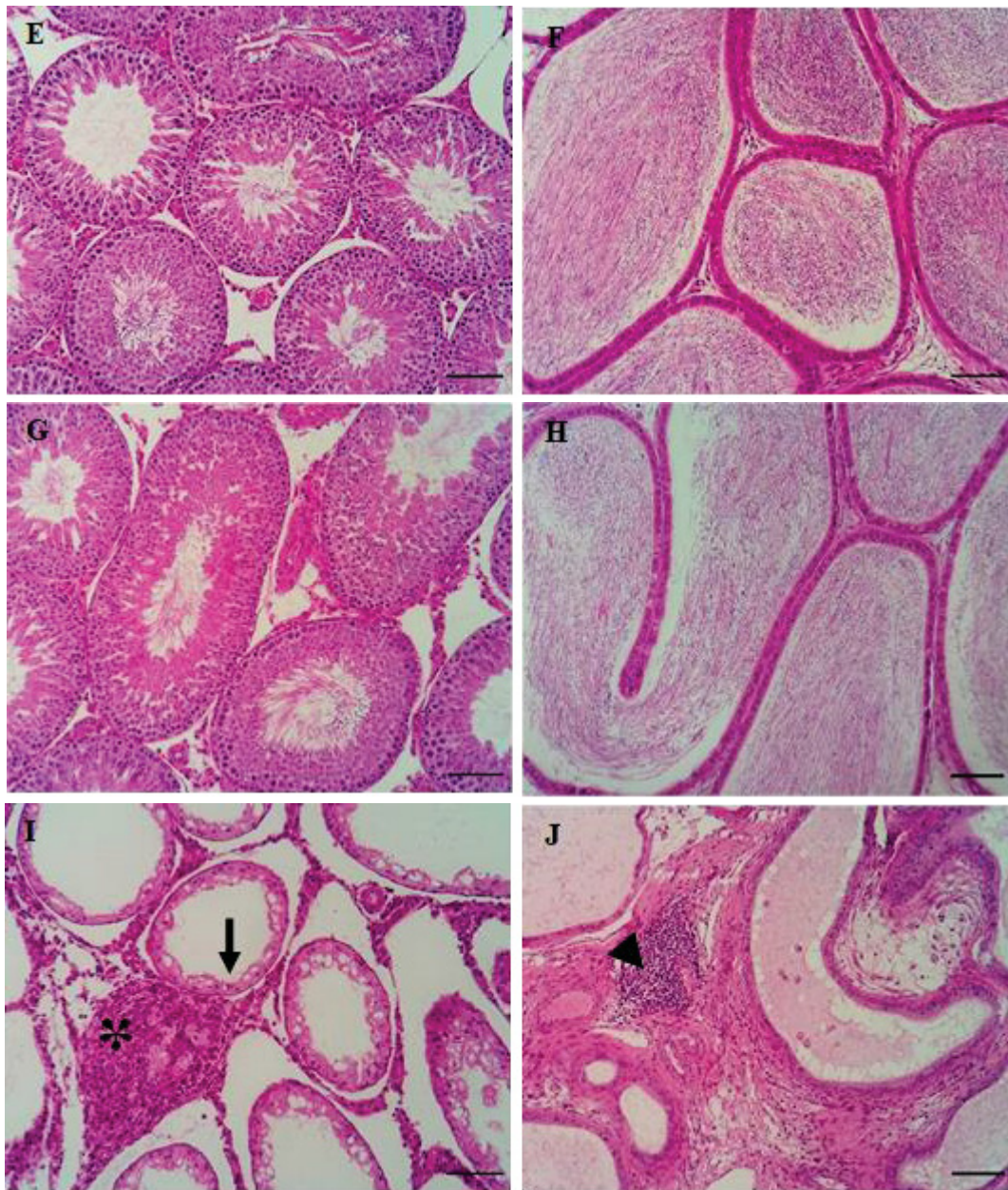
Supplementary Figure 4. Representative histological sections of uterus and ovaries from adult rats exposed *in utero* to vehicle control (A, B), dipyrone 25 mg/kg/day (C, D), dipyrone 75 mg/kg/day (E, F), dipyrone 225 mg/kg/day (G, H), and DEHP 750 mg/kg/day (I, J). Hematoxylin and eosin staining at 200 x (uterus) and 100 x (ovaries) magnification. Scale bars = 100 μ m.

Testis

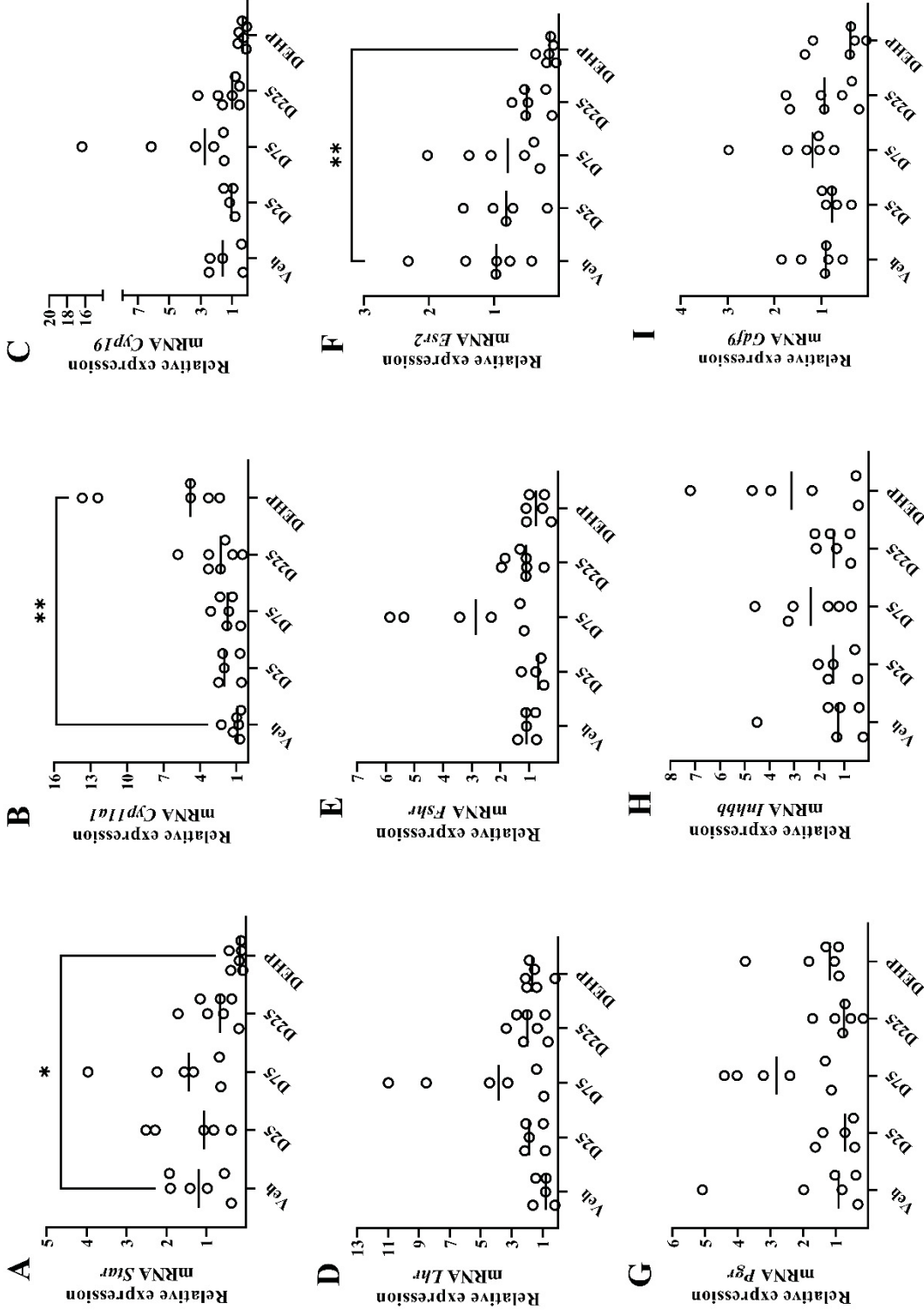


Epididymis

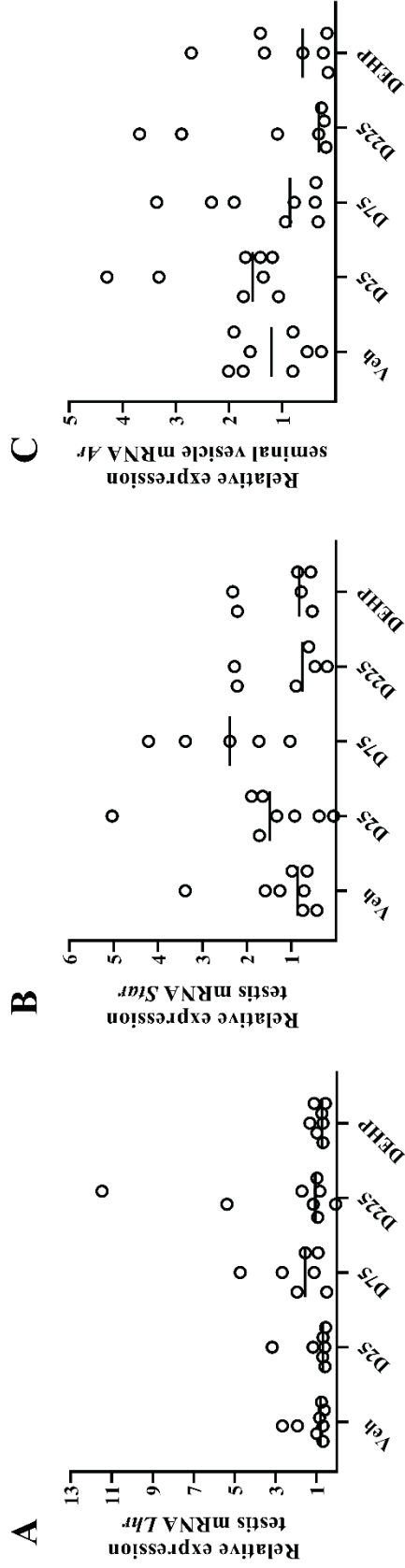




Supplementary Figure 5. Representative histological sections of testis and epididymis from adult rats exposed *in utero* to vehicle control (A, B), dipyrone 25 mg/kg/day (C, D), dipyrone 75 mg/kg/day (E, F), dipyrone 225 mg/kg/day (G, H), and DEHP 750 mg/kg/day (I, J). In the DEHP exposed rat, seminiferous tubules with absence and/or degeneration of germ cells and vacuolization of Sertoli cells are observed. Asterisk, arrow, and arrowhead indicate testis interstitial fibrosis area, seminiferous epithelium degeneration, and epididymal mononuclear inflammatory infiltrate area, respectively. Hematoxylin and eosin staining at 200 x magnification. Scale bars = 100 μ m.



Supplementary Figure 6. Gene expression analyses for *Star* (A), *Cyp11a1* (B), *Cyp19a1* (C), *Lhcgr* (D), *Fshr* (E), *Esr2* (F), *Pgr* (G), *Inhbb* (H), *Gdf9* (I) were evaluated in the ovaries of adult females exposed *in utero* to vehicle control (Veh), dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21. All data were analyzed by Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparisons and are shown as individual values for 4 to 7 litters per group (one female per litter). Horizontal lines represent the median values in each group. Significantly different from control group: * ($p \leq 0.05$); ** ($p \leq 0.01$).



Supplementary Figure 7. Gene expression analyses for *Lhcgr* (A) and *Star* (B) were evaluated in the testes and *Ar* (C) was evaluated in the seminal vesicle of adult males exposed *in utero* to vehicle control (Veh), dipyrone (D) 25, 75, 225 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 10 to 21. Data are shown as individual values for 5 to 8 litters per group (one male per litter) and horizontal lines represent the median values in each group.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar, de forma inédita e por meio de uma abordagem translacional, a prevalência e preditores do uso de analgésicos e AINEs em gestantes de Curitiba-PR no início da gestação, além da avaliação dos efeitos reprodutivos da dipirona em modelo animal com ênfase nos efeitos durante a gestação e no desenvolvimento da prole exposta *in utero* desde o nascimento até a idade adulta.

Os dados obtidos do estudo epidemiológico demonstraram alta prevalência de uso de analgésicos por mulheres grávidas, sendo que o paracetamol foi o mais utilizado seguido pela dipirona. Além disso, muitas gestantes reportaram o uso de mais de um analgésico e, ainda, grandes quantidades dos mesmos. Estes dados são preocupantes uma vez que a exposição pré-natal a analgésicos e AINEs está associada a uma série de efeitos adversos na gestação e distúrbios reprodutivos nos descendentes. Os resultados obtidos do estudo em modelo animal sugerem que a exposição a doses terapeuticamente relevantes de dipirona pode induzir efeitos desreguladores endócrinos observados no final da gestação e no início da vida da prole exposta *in utero*. O conjunto de dados e efeitos observados no presente trabalho é de grande relevância considerando o uso de dipirona por mulheres grávidas e a possibilidade de coexposição com outros analgésicos e substâncias capazes de afetar o desenvolvimento reprodutivo.

Estudos epidemiológicos de avaliação da prevalência de uso de analgésicos e AINEs em gestantes são escassos no Brasil, porém sabe-se que são medicamentos amplamente utilizados durante a gestação para o manejo da dor, muitas vezes por automedicação e sem orientação profissional. O uso indiscriminado destes medicamentos é de grande preocupação dadas as evidências epidemiológicas e experimentais demonstrando que analgésicos e AINEs, como paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, indometacina, diclofenaco e dipirona, podem atuar como desreguladores endócrinos alterando a função reprodutiva humana e animal em diferentes estágios de desenvolvimento, além dos efeitos adversos bem estabelecidos sobre a gravidez e o parto.

Considerando a crescente evidência de efeitos adversos à saúde associados à exposição pré-natal a analgésicos e AINEs, avaliações atualizadas da prevalência

de uso de analgésicos no período gestacional são essenciais para direcionar e priorizar os estudos experimentais e epidemiológicos em diferentes regiões, de acordo com o seu perfil de consumo. Além disso, a consciência médica e pública sobre a alta prevalência do uso de analgésicos pela população em geral deve ser ampliada, particularmente quando trata-se de populações mais susceptíveis como mulheres em idade fértil, gestantes e crianças. Para tanto, medidas de conscientização e monitoramento devem ser tomadas, como, por exemplo, controle mais rigoroso de vendas, tornar mais acessíveis para a população as informações sobre os potenciais efeitos de perturbação endócrina e outros efeitos adversos dos analgésicos, além da promoção de educação continuada dos profissionais de saúde.

Estudos adicionais devem ser realizados para elucidar os mecanismos pelos quais os analgésicos podem, individualmente ou em combinação, interromper a homeostase hormonal e causar distúrbios reprodutivos. E, finalmente, as investigações devem exceder o período de gestação para todos os estágios de crescimento e desenvolvimento, com especial atenção para bebês prematuros e neonatos, desenvolvimento puberal e subgrupos da população identificados como consumidores de grandes quantidades de analgésicos.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Lista de artigos publicados durante o período de doutorado (2017-2021):

1. **Passoni, M. T.**, Palu, G., Grechi, N., da Silva Amaral, B. A., Gomes, C., Rülker, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2021). Uterotrophic and in vitro screening for (anti)estrogenic activity of dipyrone. *Toxicology letters*, 352, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.09.004>
2. de Araújo-Ramos, A. T., Basso, C. G., **Passoni, M. T.**, Ribeiro, D., Sperscoski, K. M., de Oliveira, J. M., Romano, R. M., Merino, C., Sandri, J., de Almeida, M. F., Predes, F. S., & Martino-Andrade, A. J. (2021). The endocrine disrupting effects of sodium arsenite in the rat testis is not mediated through macrophage activation. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 102, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.03.005>
3. de Araújo-Ramos, A. T., **Passoni, M. T.**, Romano, M. A., Romano, R. M., & Martino-Andrade, A. J. (2021). Controversies on Endocrine and Reproductive Effects of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides: A Mini-Review. *Frontiers in endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.627210>
4. Tolouei, S., da Silva, G. N., Curi, T. Z., **Passoni, M. T.**, Ribeiro, D., Meldola, H. G., Grechi, N., Hey, G. S., Souza, R., Dos Santos, A. C., Beltrame, O. C., Dalsenter, P. R., Martino-Andrade, A. J., & Gasparotto Junior, A. (2021). Effects of *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. leaf extract on general toxicity and pubertal development of rats. *Human & experimental toxicology*, 40(1), 124–135. <https://doi.org/10.1177/0960327120945756>
5. Krebs Ribeiro, D. C.*, **Passoni, M. T.***, Meldola, H., Curi, T. Z., da Silva, G. N., Tolouei, S., Hey, G. S., Grechi, N., Dos Santos, A. C., Souza, R., Sperscoski, K. M., Ramos, A., & Martino-Andrade, A. J. (2020). Prenatal diclofenac exposure delays pubertal development and induces behavioral changes in

rats. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 96, 380–389. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.001>

*These authors contributed equally to this work.

6. Palozi, R., Lorençone, B. R., Guarnier, L. P., Romão, P., Marques, A., Hulsmeyer, A., Lourenço, E., Tolouei, S., da Silva, G. N., Curi, T. Z., **Passoni, M. T.**, Dalsenter, P. R., de Araújo, F., Oesterreich, S. A., Souza, R., Dos Santos, A. C., de Castilho, P. F., de Oliveira, K., Nocchi, S. R., Silva, D. B., ... Gasparotto Junior, A. (2020). From general toxicology to DNA disruption: A safety assessment of *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel. *Journal of ethnopharmacology*, 258, 112916. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112916>
7. Neubert da Silva, G., Zauer Curi, T., Lima Tolouei, S. E., **Tapias Passoni, M.**, Sari Hey, G. B., Marino Romano, R., Martino-Andrade, A. J., & Dalsenter, P. R. (2019). Effects of diisopentyl phthalate exposure during gestation and lactation on hormone-dependent behaviours and hormone receptor expression in rats. *Journal of neuroendocrinology*, 31(12), e12816. <https://doi.org/10.1111/jne.12816>
8. Curi, T. Z., da Silva, G. N., **Passoni, M. T.**, Lima Tolouei, S. E., Meldola, H., Romano, R. M., Grechi, N., Dalsenter, P. R., & Martino-Andrade, A. J. (2019). In utero and lactational exposure to diisopentyl phthalate (DiPeP) induces fetal toxicity and antiandrogenic effects in rats. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, kfz159. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz159>
9. Bertencello Souza, M.*, **Passoni, M. T.***, Pälmeke, C., Meyer, K. B., Venturelli, A. C., Araújo, G., de Castilhos, B. S., Morais, R. N., Dalsenter, P. R., Swan, S. H., Koch, H. M., & Martino-Andrade, A. J. (2018). Unexpected, ubiquitous exposure of pregnant Brazilian women to diisopentyl phthalate, one of the most potent antiandrogenic phthalates. *Environment international*, 119, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.042>

*These authors contributed equally to this work.

9 REFERÊNCIAS

- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalah, K., Dejucq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human reproduction* (Oxford, England), 28(7), 1890–1898. <https://doi.org/10.1093/humrep/det112>
- Aleixo, J. F., Pereira, M., Montagnini, B. G., Pereira, M., Forcato, S., Moreira, E. G., Ceravolo, G. S., Vieira, M. L., Kiss, A., & Gerardin, D. (2020). Effect of paracetamol treatment on maternal care and reproductive outcomes in female rat offspring. *Reproduction, fertility, and development*, 32(18), 1311–1325. <https://doi.org/10.1071/RD20007>
- Aminoshariae, A., & Khan, A. (2015). Acetaminophen: old drug, new issues. *Journal of endodontics*, 41(5), 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.024>
- Amundsen, S., Nordeng, H., Nezvalová-Henriksen, K., Stovner, L. J., & Spigset, O. (2015). Pharmacological treatment of migraine during pregnancy and breastfeeding. *Nature reviews. Neurology*, 11(4), 209–219. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.29>
- Andrade, S., Bartels, D. B., Lange, R., Sandford, L., & Gurwitz, J. (2016). Safety of metamizole: a systematic review of the literature. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 41(5), 459–477. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12422>
- Antonucci, R., Zaffanello, M., Puxeddu, E., Porcella, A., Cuzzolin, L., Piloni, M. D., & Fanos, V. (2012). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. *Current drug metabolism*, 13(4), 474–490. <https://doi.org/10.2174/138920012800166607>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017). Novalgina® – Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda. Acesso em 20 set. 2021. Disponível em: <https://www.novalgina.com.br/bulas/comprimido-simples500mg-1g.pdf>
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2001). Painel Internacional de Avaliação da segurança da dipirona. *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Acesso em 27 set. 2021. Disponível em: <http://www.pharmanet.com.br/pdf/relatoriodipirona2.pdf>
- Aragão, F. F. (2019). Dor lombossacral relacionada à gestação. *Brazilian Journal of Pain*, 2(2), 374-80. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20190031>
- Aragão, F. F., & Tobias, A. F. (2019). Pharmacological treatment of pain in pregnancy. *Brazilian Journal of Pain*, 2(4), 374-80. <https://doi.org/10.5935/2595-0118.20190068>
- Arendrup, F. S., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., & Kristensen, D. M. (2018). EDC IMPACT: Is exposure during pregnancy to acetaminophen/paracetamol disrupting

female reproductive development?. *Endocrine connections*, 7(1), 149–158. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0298>

Arrais, P. S., Fernandes, M. E., Pizzol, T. D., Ramos, L. R., Mengue, S. S., Luiza, V. L., Tavares, N. U., Farias, M. R., Oliveira, M. A., & Bertoldi, A. D. (2016). Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. *Revista de saude publica*, 50(suppl 2), 13s. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006117>

Arruza Gómez, L., Corredera Sánchez, A., Montalvo Montes, J., de Marco Guilarte, E., & Moro Serrano, M. (2008). Cierre intrauterino del conducto arterial en probable relación con la ingesta materna de metamizol durante el tercer trimestre de gestación [Intrauterine closure of the ductus arteriosus probably associated with the taking of metamizole during the third trimester]. *Anales de pediatria (Barcelona, Spain : 2003)*, 68(6), 626–627. <https://doi.org/10.1157/13123300>

Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *The Science of the total environment*, 333(1-3), 167–184. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.04.062>

Axelstad, M., Christiansen, S., Boberg, J., Scholze, M., Jacobsen, P. R., Isling, L. K., Kortenkamp, A., & Hass, U. (2014). Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction (Cambridge, England)*, 147(4), 489–501. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0447>

Bacchi, S., Palumbo, P., Sponta, A., & Coppolino, M. F. (2012). Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: a review. *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry*, 11(1), 52–64. <https://doi.org/10.2174/187152312803476255>

Baker V. A. (2001). Endocrine disrupters--testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 15(4-5), 413–419. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(01\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(01)00045-5)

Bánhidý, F., Acs, N., Puhó, E., & Czeizel, A. E. (2007). A population-based case-control teratologic study of oral dipyron treatment during pregnancy. *Drug safety*, 30(1), 59–70. <https://doi.org/10.2165/00002018-200730010-00006>

Barouki, R., Gluckman, P. D., Grandjean, P., Hanson, M., & Heindel, J. J. (2012). Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environmental health : a global access science source*, 11, 42. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-42>

Bar-Oz, B., Clementi, M., Di Gianonio, E., Greenberg, R., Beer, M., Merlob, P., Arnon, J., Ornoy, A., Zimmerman, D. M., & Berkovitch, M. (2005). Metamizol (dipyron, optalgin) in pregnancy, is it safe? A prospective comparative study. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 119(2), 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2004.07.004>

Bauer, A. Z., Swan, S. H., Kriebel, D., Liew, Z., Taylor, H. S., Bornehag, C. G., Andrade, A. M., Olsen, J., Jensen, R. H., Mitchell, R. T., Skakkebaek, N. E., Jégou, B., & Kristensen, D. M. (2021). Paracetamol use during pregnancy - a call for precautionary action. *Nature reviews. Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00553-7>

Bayne, R. A., Eddie, S. L., Collins, C. S., Childs, A. J., Jabbour, H. N., & Anderson, R. A. (2009). Prostaglandin E2 as a regulator of germ cells during ovarian development. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(10), 4053–4060. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0755>

Beckhauser, G. C., de Souza, J. M., Valgas, C., Piovezan, A. P., & Galato, D. (2010). Utilização de medicamentos na pediatria: A prática de automedicação em crianças por seus responsáveis. *Revista Paulista de Pediatria*, v. 28, n. 3, p. 262-268. <https://doi.org/10.1590/S0103-05822010000300002>

Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K. R., Coiffec, I., Rolland, A. D., Chevrier, C., Kristensen, D. M., Lavoué, V., Antignac, J. P., Le Bizec, B., Dejucq-Rainsford, N., Mitchell, R. T., Mazaud-Guittot, S., & Jégou, B. (2017). Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Scientific reports*, 7, 44184. <https://doi.org/10.1038/srep44184>

Benseñor I. M. (2005). Dipyron and blood dyscrasia revisited: "non-evidence based medicine". *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*, 123(3), 99–100. <https://doi.org/10.1590/s1516-31802005000300001>

Bertoldi, A. D., Rifas-Shiman, S. L., Boing, A. C., da Silva Dal Pizzol, T., Miranda, V., Silveira, M., Freitas Silveira, M., Domingues, M. R., Santos, I. S., Bassani, D. G., Tovo-Rodrigues, L., & Oken, E. (2020). Associations of acetaminophen use during pregnancy and the first year of life with neurodevelopment in early childhood. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 34(3), 267–277. <https://doi.org/10.1111/ppe.12632>

Bertoncello Souza, M., Passoni, M. T., Pálmke, C., Meyer, K. B., Venturelli, A. C., Araújo, G., de Castilhos, B. S., Morais, R. N., Dalsenter, P. R., Swan, S. H., Koch, H. M., & Martino-Andrade, A. J. (2018). Unexpected, ubiquitous exposure of pregnant Brazilian women to diisopentyl phthalate, one of the most potent antiandrogenic phthalates. *Environment international*, 119, 447–454. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.06.042>

Bila, D. M., & Dezotti, M. (2003). Pharmaceutical drugs in the environment. *Química Nova* 26(4), 523-530. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000400015>

Black, E., Khor, K. E., Kennedy, D., Chutatape, A., Sharma, S., Vancaillie, T., & Demirkol, A. (2019). Medication Use and Pain Management in Pregnancy: A Critical Review. *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain*, 19(8), 875–899. <https://doi.org/10.1111/papr.12814>

Blieden, M., Paramore, L. C., Shah, D., & Ben-Joseph, R. (2014). A perspective on the epidemiology of acetaminophen exposure and toxicity in the United

States. *Expert review of clinical pharmacology*, 7(3), 341–348. <https://doi.org/10.1586/17512433.2014.904744>

Bouissou-Schurtz, C., Houeto, P., Guerbet, M., Bachelot, M., Casellas, C., Mauclair, A. C., Panetier, P., Delval, C., & Masset, D. (2014). Ecological risk assessment of the presence of pharmaceutical residues in a French national water survey. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 69(3), 296–303. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.04.006>

Buser, H. R., Poiger, T., & D. Müller, M. D. (1999). Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33(15), 2529-2535. <https://doi.org/10.1021/es981014w>

Cahill, J. D., Furlong, E. T., Burkhardt, M. R., Kolpin, D., & Anderson, L. G. (2004). Determination of pharmaceutical compounds in surface- and ground-water samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1041(1-2), 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.005>

Calhoun A. H. (2017). Migraine Treatment in Pregnancy and Lactation. *Current pain and headache reports*, 21(11), 46. <https://doi.org/10.1007/s11916-017-0646-4>

Casagrande, D., Gugala, Z., Clark, S. M., & Lindsey, R. W. (2015). Low Back Pain and Pelvic Girdle Pain in Pregnancy. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 23(9), 539–549. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-D-14-00248>

Castel, P., Barbier, M., Pומרol, E., Mandon-Pépin, B., Tassistro, V., Lepidi, H., Pelissier-Alicot, A. L., Manzoni, O. J., & Courbiere, B. (2020). Prenatal cannabinoid exposure alters the ovarian reserve in adult offspring of rats. *Archives of toxicology*, 94(12), 4131–4141. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02877-1>

Catalán, J. L., Santonja, J., Martínze, L., & Jiménez, N. V. (1995). Oligoamnios asociado al uso de dipirona magnésica [Oligoamnios associated with the use of magnesium dipyron]. *Medicina clinica*, 104(14), 541–543.

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., & Simmons, D. L. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>

Chetley, A. (1993). Dipyron: A drug no one needs. *Health Action International-Europe and BUKO Pharma-Campaign*.

CMED/ANVISA - Câmara de Regulação do Mercado de Medicamentos e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2021). Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico. Edição 2019-2020. Acesso em 04 fev. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/cmcd/informes/anuario-estatistico-2019-versao-final.pdf>

Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental health perspectives*, 101(5), 378–384. <https://doi.org/10.1289/ehp.93101378>

Couto, A. C., Ferreira, J. D., Pombo-de-Oliveira, M. S., & Koifman, S. (2015). Pregnancy, maternal exposure to analgesic medicines, and leukemia in Brazilian children below 2 years of age. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, 24(3), 245–252. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000070>

Crunfli, F., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2015). Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyron. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 42(3), 246–255. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12347>

Da Silva Dal Pizzol, T., Schüler-Faccini, L., Mengue, S. S., & Fischer, M. I. (2009). Dipyron use during pregnancy and adverse perinatal events. *Archives of gynecology and obstetrics*, 279(3), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s00404-008-0707-3>

da Silva Dal Pizzol, T., Turmina Fontanella, A., Cardoso Ferreira, M. B., Bertoldi, A. D., Boff Borges, R., & Serrate Mengue, S. (2019). Analgesic use among the Brazilian population: Results from the National Survey on Access, Use and Promotion of Rational Use of Medicines (PNAUM). *PLoS one*, 14(3), e0214329. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214329>

Daston, G. P., Gooch, J. W., Breslin, W. J., Shuey, D. L., Nikiforov, A. I., Fico, T. A., & Gorsuch, J. W. (1997). Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 11(4), 465–481. [https://doi.org/10.1016/s0890-6238\(97\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(97)00014-2)

Dathe, K., Padberg, S., Hultsch, S., Meixner, K., Tissen-Diabaté, T., Meister, R., Beck, E., & Schaefer, C. (2017). Metamizole use during first trimester-A prospective observational cohort study on pregnancy outcome. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 26(10), 1197–1204. <https://doi.org/10.1002/pds.4277>

Davis, J. S., Lee, H. Y., Kim, J., Advani, S. M., Peng, H. L., Banfield, E., Hawk, E. T., Chang, S., & Frazier-Wood, A. C. (2017). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in US adults: changes over time and by demographic. *Open heart*, 4(1), e000550. <https://doi.org/10.1136/openhrt-2016-000550>

Dean, A., Mungall, W., McKinnell, C., & Sharpe, R. M. (2013). Prostaglandins, masculinization and its disorders: effects of fetal exposure of the rat to the cyclooxygenase inhibitor- indomethacin. *PLoS one*, 8(5), e62556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062556>

Dean, A., van den Driesche, S., Wang, Y., McKinnell, C., Macpherson, S., Eddie, S. L., Kinnell, H., Hurtado-Gonzalez, P., Chambers, T. J., Stevenson, K., Wolfinger, E., Hrabalkova, L., Calarrao, A., Bayne, R. A., Hagen, C. P., Mitchell, R. T., Anderson, R. A., & Sharpe, R. M. (2016). Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ

cell development with inter-generational reproductive consequences. *Scientific reports*, 6, 19789. <https://doi.org/10.1038/srep19789>

Duarte, V. M., Meucci, R. D., & Cesar, J. A. (2018). Dor lombar intensa em gestantes do extremo Sul do Brasil [Severe low back pain among pregnant women in Southern Brazil]. *Ciencia & saude coletiva*, 23(8), 2487–2494. <https://doi.org/10.1590/1413-81232018238.22562016>

Ebele, A. J., Abdallah, M. A. E., & Harrad, S. (2017). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.004>

Espiridião, S., Oliveira-Filho, R. M., Doine, A., Simões, M. J., Focchi, G. R., Evêncio Neto, J., Kopelman, B. I., & Kulay Júnior, L. (1996). Morphological and biochemical action of dipyron on rat placenta. *General pharmacology*, 27(3), 505–507. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(95\)02066-7](https://doi.org/10.1016/0306-3623(95)02066-7)

FDA – Food and Drug Administration (2015). Pregnancy and Lactation Labeling (Drugs) Final Rule. Content and Format of Labeling for Human Prescription Drug and Biological Products; Requirements for Pregnancy and Lactation Labeling. Acesso em 27 set. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/labeling/pregnancy-and-lactation-labeling-drugs-final-rule> e <https://www.drugs.com/pregnancy-categories.html>

Ferreira, T. R., & Lopes, L. C. (2016). Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions. *Jornal de pediatria*, 92(1), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2015.04.007>

Figueiró-Filho, E. A., Coelho, L. R., Breda, I., Carvalho, M. H. B., Zugaib, M., Melo Jr. E. F., Simões, R. (2011). Diretrizes Clínicas na Saúde Complementar. Gestação e Analgesia. Associação Médica Brasileira e Agência Nacional de Saúde Complementar. *Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia*.

Fisher, B. G., Thankamony, A., Hughes, I. A., Ong, K. K., Dunger, D. B., & Acerini, C. L. (2016). Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. *Human reproduction (Oxford, England)*, 31(11), 2642–2650. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew196>

Fonseca, M. R., Fonseca, E. d., & Bergsten-Mendes, G. (2002). Prevalência do uso de medicamentos na gravidez: uma abordagem farmacoepidemiológica [Prevalence of drug use during pregnancy: a pharmacoepidemiological approach]. *Revista de saude publica*, 36(2), 205–212. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102002000200013>

Gaytán, M., Bellido, C., Morales, C., Sánchez-Criado, J. E., & Gaytán, F. (2006). Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipooxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. *Reproduction (Cambridge, England)*, 132(4), 571–577. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01236>

Giroux, M., Campistron, G., Faure, F., Dumas, J. C., Coulais, Y., Desprats, R., Grandjean, H., Houin, G., & Pontonnier, G. (1990). Effects of pH on antipyrine

transfer across the human placenta ex vivo. *Developmental pharmacology and therapeutics*, 14(3), 153–160.

Godoi, F., Muñoz-Peñuela, M., Gomes, A., Tolussi, C. E., Brambila-Souza, G., Branco, G. S., Lo Nostro, F. L., & Moreira, R. G. (2020). Endocrine disruptive action of diclofenac and caffeine on *Astyanax altiparanae* males (Teleostei: Characiformes: Characidae). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 231, 108720. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108720>

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews*, 36(6), E1–E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>

Greenspan, L. C., & Lee, M. M. (2018). Endocrine disruptors and pubertal timing. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 25(1), 49–54. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000377>

Guerra, G. C., da Silva, A. Q., França, L. B., Assunção, P. M., Cabral, R. X., & Ferreira, A. A. (2008). Utilização de medicamentos durante a gravidez na cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil [Drug use during pregnancy in Natal, Brazil]. *Revista brasileira de ginecologia e obstetricia : revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia*, 30(1), 12–18. <https://doi.org/10.1590/s0100-72032008000100003>

Guiloski, I. C., Ribas, J. L., Pereira, L., Neves, A. P., & Silva de Assis, H. C. (2015). Effects of trophic exposure to dexamethasone and diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and environmental safety*, 114, 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.020>

Gye, M. C., Kang, H. H., & Kang, H. J. (2005). Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Archives of andrology*, 51(3), 247–255. <https://doi.org/10.1080/014850190898845>

Hamerschlak, N., Maluf, E., Biasi Cavalcanti, A., Avezum Júnior, A., Eluf-Neto, J., Passeto Falcão, R., Lorand-Metze, I. G., Goldenberg, D., Leite Santana, C., de Oliveira Werneck Rodrigues, D., Nascimento da Motta Passos, L., Oliveira de Miranda Coelho, E., Tostes Pintão, M. C., Moraes de Souza, H., Borbolla, J. R., & Pasquini, R. (2008). Incidence and risk factors for agranulocytosis in Latin American countries--the Latin Study: a multicenter study. *European journal of clinical pharmacology*, 64(9), 921–929. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0513-7>

Han, S., Choi, K., Kim, J., Ji, K., Kim, S., Ahn, B., Yun, J., Choi, K., Khim, J. S., Zhang, X., & Giesy, J. P. (2010). Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 98(3), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.013>

Harris, G. E., Wood, M., Eberhard-Gran, M., Lundqvist, C., & Nordeng, H. (2017). Patterns and predictors of analgesic use in pregnancy: a longitudinal drug utilization

study with special focus on women with migraine. *BMC pregnancy and childbirth*, 17(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12884-017-1399-0>

Hay-Schmidt, A., Finkielman, O., Jensen, B., Høgsbro, C. F., Bak Holm, J., Johansen, K. H., Jensen, T. K., Andrade, A. M., Swan, S. H., Bornehag, C. G., Brunak, S., Jegou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2017). Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. *Reproduction (Cambridge, England)*, 154(2), 145–152. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0165>

Hedenmalm, K., & Spigset, O. (2002). Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyron (metamizole). *European journal of clinical pharmacology*, 58(4), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s00228-002-0465-2>

Hoffmann, F., & Schmiemann, G. (2016). Pain medication in German nursing homes: a whole lot of metamizole. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 25(6), 646–651. <https://doi.org/10.1002/pds.3954>

Hoffmann, F., Bantel, C., & Jobski, K. (2020a). Agranulocytosis attributed to metamizole: An analysis of spontaneous reports in EudraVigilance 1985-2017. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 126(2), 116–125. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13310>

Hoffmann, F., Bantel, C., von Rosen, F. T., & Jobski, K. (2020b). Regional Differences in Prescribing Patterns of Metamizole in Germany Based on Data from 70 Million Persons. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3892. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113892>

Hoffmann, F., Meinecke, P., Freitag, M. H., Glaeske, G., Schulze, J., & Schmiemann, G. (2015). Who gets dipyron (metamizole) in Germany? Prescribing by age, sex and region. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 40(3), 285–288. <https://doi.org/10.1111/jcpt.12261>

Holm, J. B., Chalmey, C., Modick, H., Jensen, L. S., Dierkes, G., Weiss, T., Jensen, B. A., Nørregård, M. M., Borkowski, K., Styrihave, B., Martin Koch, H., Mazaud-Guittot, S., Jegou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2015). Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 148(1), 288–298. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv179>

Holm, J. B., Mazaud-Guittot, S., Danneskiold-Samsøe, N. B., Chalmey, C., Jensen, B., Nørregård, M. M., Hansen, C. H., Styrihave, B., Svingen, T., Vinggaard, A. M., Koch, H. M., Bowles, J., Koopman, P., Jégou, B., Kristiansen, K., & Kristensen, D. M. (2016). Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 150(1), 178–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv332>

Jasiecka, A., Maślanka, T., & Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(1), 207–214. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030>

Jensen, M. S., Rebordosa, C., Thulstrup, A. M., Toft, G., Sørensen, H. T., Bonde, J. P., Henriksen, T. B., & Olsen, J. (2010). Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 21(6), 779–785. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181f20bed>

Kamali, Y., Khaksar, Z., & Pourhashemi, S. (2016). Developmental changes in the gubernaculum and anogenital distance of male rat offspring exposed in utero to WIN 55,212-2 as a candidate of the endocannabinoid system. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 9(2), 70-77.

Kassaw, C., & Wabe, N. T. (2012). Pregnant women and non-steroidal anti-inflammatory drugs: knowledge, perception and drug consumption pattern during pregnancy in ethiopia. *North American journal of medical sciences*, 4(2), 72–76. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.93377>

Kim, H. J., Lee, J. H., Park, H. J., Kim, J. Y., Cho, S., & Kim, W. S. (2014). Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 31(6), 973–978. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.908262>

Knappmann, A. L., & de Melo, E. B. (2010). Qualidade de medicamentos isentos de prescrição: um estudo com marcas de dipirona comercializadas em uma drogaria de Cascavel (PR, Brasil) [Quality of over-the-counter medicines: a study with dipyrone brands commercialized in a drugstore in Cascavel city (Paraná, Brazil)]. *Ciencia & saude coletiva*, 15 Suppl 3, 3467–3476. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232010000900021>

Kolle, S. N., Ramirez, T., Kamp, H. G., Buesen, R., Flick, B., Strauss, V., & van Ravenzwaay, B. (2012). A testing strategy for the identification of mammalian, systemic endocrine disruptors with particular focus on steroids. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 63(2), 259–278. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.04.004>

Krebs Ribeiro, D. C., Passoni, M. T., Meldola, H., Curi, T. Z., da Silva, G. N., Tolouei, S., Hey, G. S., Grechi, N., Dos Santos, A. C., Souza, R., Spencoski, K. M., Ramos, A., & Martino-Andrade, A. J. (2020). Prenatal diclofenac exposure delays pubertal development and induces behavioral changes in rats. *Reproductive toxicology*, 96, 380–389. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2020.08.001>

Kristensen, D. M., Hass, U., Lesné, L., Lottrup, G., Jacobsen, P. R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J. H., Toppari, J., Jensen, T. K., Brunak, S., Skakkebaek, N. E., Nellemann, C., Main, K. M., Jégou, B., & Leffers, H. (2011). Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(1), 235–244. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq323>

Kristensen, D. M., Lesné, L., Le Fol, V., Desdoits-Lethimonier, C., Dejucq-Rainsford, N., Leffers, H., & Jégou, B. (2012). Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *International journal of andrology*, 35(3), 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x>

Kristensen, D. M., Mazaud-Guittot, S., Gaudriault, P., Lesné, L., Serrano, T., Main, K. M., & Jégou, B. (2016). Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(7), 381–393. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.55>

Leverrier-Penna, S., Mitchell, R. T., Becker, E., Lecante, L., Ben Maamar, M., Homer, N., Lavoué, V., Kristensen, D. M., Dejucq-Rainsford, N., Jégou, B., & Mazaud-Guittot, S. (2018). Ibuprofen is deleterious for the development of first trimester human fetal ovary ex vivo. *Human reproduction (Oxford, England)*, 33(3), 482–493. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex383>

Levy, M., Zylber-Katz, E., & Rosenkranz, B. (1995). Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clinical pharmacokinetics*, 28(3), 216–234. <https://doi.org/10.2165/00003088-199528030-00004>

Li, D. K., Ferber, J. R., Odouli, R., & Quesenberry, C. (2018). Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs during pregnancy and the risk of miscarriage. *American journal of obstetrics and gynecology*, 219(3), 275.e1–275.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.06.002>

Liddle, S. D., & Pennick, V. (2015). Interventions for preventing and treating low-back and pelvic pain during pregnancy. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2015(9), CD001139. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001139.pub4>

Liew, Z., Ritz, B., Rebordosa, C., Lee, P. C., & Olsen, J. (2014). Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. *JAMA pediatrics*, 168(4), 313–320. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2013.4914>

Lind, D. V., Main, K. M., Kyhl, H. B., Kristensen, D. M., Toppari, J., Andersen, H. R., Andersen, M. S., Skakkebaek, N. E., & Jensen, T. K. (2017). Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(1), 223–231. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew285>

Lorenzetti, B. B., & Ferreira, S. H. (1996). Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 45(6), 308–311. <https://doi.org/10.1007/BF02280997>

Lutz, B. H., Miranda, V., Silveira, M., Dal Pizzol, T., Mengue, S. S., da Silveira, M. F., Domingues, M. R., & Bertoldi, A. D. (2020). Medication Use among Pregnant Women from the 2015 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. *International journal of*

environmental research and public health, 17(3), 989.
<https://doi.org/10.3390/ijerph17030989>

Martino-Andrare, A. J.; Swan, S.H. Interaction of Pharmaceuticals with Environmental Chemicals. In: Cohen, A.; vom Saal, F.S. Integrative Environmental Medicine. *Oxford University Press. cap. 7*, p. 141-174. 2017.

Masarwa, R., Levine, H., Gorelik, E., Reif, S., Perlman, A., & Matok, I. (2018). 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*, 187(8), 1817–1827. <https://doi.org/10.1093/aje/kwy086>

Mashayekhi, S. O., Dilmaghanizadeh, M., Fardiazar, Z., Bamdad-Moghadam, R., & Ghandforoush-Sattari, F. (2009). Study of awareness among pregnant women of the effects of drugs on the fetus and mother in Iran. *Health policy (Amsterdam, Netherlands)*, 91(1), 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2008.11.011>

Mazaud-Guittot, S., Nicolas Nicolaz, C., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Ben Maamar, M., Balaguer, P., Kristensen, D. M., Chevrier, C., Lavoué, V., Poulain, P., Dejuçq-Rainsford, N., & Jégou, B. (2013). Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(11), E1757–E1767. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-2531>

McKenna, L., & McIntyre, M. (2006). What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. *Journal of advanced nursing*, 56(6), 636–645. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2006.04037.x>

Meccariello, R., Battista, N., Bradshaw, H. B., & Wang, H. (2014). Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. *International journal of endocrinology*, 2014, 412354. <https://doi.org/10.1155/2014/412354>

Mello, F. V., Cunha, S. C., Fogaça, F., Alonso, M. B., Torres, J., & Fernandes, J. O. (2021). Occurrence of pharmaceuticals in seafood from two Brazilian coastal areas: Implication for human risk assessment. *The Science of the total environment*, 803, 149744. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149744>

Mengue, S. S., Schenkel, E. P., Duncan, B. B., & Schmidt, M. I. (2001). Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras [Drug use by pregnant women in six Brazilian cities]. *Revista de saude publica*, 35(5), 415–420. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102001000500002>

Meucci, R. D., Perceval, A. H., Lima, D. R., Cousin, E., Marmitt, L. P., Pizzato, P., Silva, P., Jesien, S., & Cesar, J. A. (2020). Occurrence of combined pain in the lumbar spine, pelvic girdle and pubic symphysis among pregnant women in the extreme south of Brazil. Ocorrência de dor combinada na coluna lombar, cintura pélvica e sínfise púbica entre gestantes do extremo sul do Brasil. *Revista brasileira de epidemiologia = Brazilian journal of epidemiology*, 23, e200037. <https://doi.org/10.1590/1980-549720200037>

Mohd Hanafiah, Z., Wan Mohtar, W., Abd Manan, T., Bachi', N. A., Abdullah, N. A., Abd Hamid, H. H., Beddu, S., Mohd Kamal, N. L., Ahmad, A., & Wan Rasdi, N. (2021). The occurrence of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Malaysian urban domestic wastewater. *Chemosphere*, 287(Pt 2), 132134. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132134>

Moreira de Barros, G. A., Calonego, M., Mendes, R. F., Castro, R., Faria, J., Trivellato, S. A., Cavalcante, R. S., Fukushima, F. B., & Dias, A. (2019). Uso de analgésicos e o risco da automedicação em amostra de população urbana: estudo transversal [The use of analgesics and risk of self-medication in an urban population sample: cross-sectional study]. *Brazilian journal of anesthesiology (Elsevier)*, 69(6), 529–536. <https://doi.org/10.1016/j.bjan.2019.09.005>

Navarro-Lafuente, F., Arense-Gonzalo, J. J., Adoamnei, E., Prieto-Sánchez, M. T., Sánchez-Ferrer, M. L., García-Marcos, L., Morales, E., Mendiola, J., Torres-Cantero, A. M., & The Nela Study Group (2021). Is Maternal Use of Paracetamol during Pregnancy Associated with Anogenital Distance in Male Newborns? The Results from the NELA Birth Cohort. *International journal of environmental research and public health*, 18(12), 6338. <https://doi.org/10.3390/ijerph18126338>

Ostensen, M. E., & Skomsvoll, J. F. (2004). Anti-inflammatory pharmacotherapy during pregnancy. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 5(3), 571–580. <https://doi.org/10.1517/14656566.5.3.571>

Passoni, M. T., Kristensen, M. N., Morais, R. N., Woitkowiak, C., Boareto, A. C., da Silva Amaral, B. A., Grechi, N., Dalsenter, P. R., Munkboel, C. H., Styrihave, B., Kristensen, D. M., Gomes, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2018). Assessment of the analgesic dipyron as a possible (anti)androgenic endocrine disruptor. *Toxicology Letters*, 285, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.021>

Passoni, M. T., Palu, G., Grechi, N., da Silva Amaral, B. A., Gomes, C., Rülker, C., van Ravenzwaay, B., & Martino-Andrade, A. J. (2021). Uterotrophic and in vitro screening for (anti)estrogenic activity of dipyron. *Toxicology letters*, 352, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.09.004>

Pereira, M., Aleixo, J. F., Cavalcanti, L. F., Costa, N. O., Vieira, M. L., Ceravolo, G. S., Moreira, E. G., & Gerardin, D. (2020). Can maternal exposure to paracetamol impair reproductive parameters of male rat offspring?. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 93, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.12.007>

Pernia, S., & DeMaagd, G. (2016). The New Pregnancy and Lactation Labeling Rule. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 41(11), 713–715.

Philippat, C., Giorgis-Allemand, L., Chevrier, C., Cordier, S., Jégou, B., Charles, M. A., & Slama, R. (2011). Analgesics during pregnancy and undescended testis. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 22(5), 747–749. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318225bf33>

Pizzol, T. D., Tavares, N. U., Bertoldi, A. D., Farias, M. R., Arrais, P. S., Ramos, L. R., Oliveira, M. A., Luiza, V. L., & Mengue, S. S. (2016). Use of medicines and other products for therapeutic purposes among children in Brazil. *Revista de saude publica*, 50(suppl 2), 12s. <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2016050006115>

Pombo-de-Oliveira, M. S., Koifman, S., & Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia (2006). Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(12), 2336–2341. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0031>

Rathmell, J. P., Viscomi, C. M., & Ashburn, M. A. (1997). Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. *Anesthesia and analgesia*, 85(5), 1074–1087. <https://doi.org/10.1097/00000539-199711000-00021>

Rebordosa, C., Kogevinas, M., Sørensen, H. T., & Olsen, J. (2008). Pre-natal exposure to paracetamol and risk of wheezing and asthma in children: a birth cohort study. *International journal of epidemiology*, 37(3), 583–590. <https://doi.org/10.1093/ije/dyn070>

Rogosch, T., Sinning, C., Podlewski, A., Watzer, B., Schlosburg, J., Lichtman, A. H., Cascio, M. G., Bisogno, T., Di Marzo, V., Nüsing, R., & Imming, P. (2012). Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(1), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.11.028>

Rossitto, M., Marchive, C., Pruvost, A., Sellem, E., Ghetas, A., Badiou, S., Sutra, T., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019a). Intergenerational effects on mouse sperm quality after in utero exposure to acetaminophen and ibuprofen. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(1), 339–357. <https://doi.org/10.1096/fj.201800488RRR>

Rossitto, M., Ollivier, M., Déjardin, S., Pruvost, A., Brun, C., Marchive, C., Nguyen, A. L., Ghetas, A., Keime, C., de Massy, B., Poulat, F., Philibert, P., & Boizet-Bonhoure, B. (2019b). In utero exposure to acetaminophen and ibuprofen leads to intergenerational accelerated reproductive aging in female mice. *Communications biology*, 2, 310. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0552-x>

Sabir, S., Akhtar, M. F., & Saleem, A. (2019). Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environmental science and pollution research international*, 26(2), 1277–1286. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3774-4>

Sales, K. J., & Jabbour, H. N. (2003). Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 71(3-4), 97–117. [https://doi.org/10.1016/s1098-8823\(03\)00050-9](https://doi.org/10.1016/s1098-8823(03)00050-9)

Sánchez de la Nieta, M. D., Rivera, F., De la Torre, M., Alcázar, R., Caparrós, G., Paz Alcaide, M., Vozmediano, C., & Sánchez, A. (2003). Acute renal failure and

oligohydramnios induced by magnesium dypirone (metamizol) in a pregnant woman. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(8), 1679–1680. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfg240>

Santos, L. H., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., & Montenegro, M. C. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *The Science of the total environment*, 461-462, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>

Sarganas, G., BATTERY, A. K., Zhuang, W., Wolf, I. K., Grams, D., Rosario, A. S., Scheidt-Nave, C., & Knopf, H. (2015). Prevalence, trends, patterns and associations of analgesic use in Germany. *BMC pharmacology & toxicology*, 16, 28. <https://doi.org/10.1186/s40360-015-0028-7>

Schoenfeld, A., Bar, Y., Merlob, P., & Ovadia, Y. (1992). NSAIDs: maternal and fetal considerations. *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)*, 28(3-4), 141–147. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1992.tb00777.x>

Servey, J., & Chang, J. (2014). Over-the-Counter Medications in Pregnancy. *American family physician*, 90(8), 548–555.

Sharpe, C. R., & Franco, E. L. (1996). Use of dipyron during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 7(5), 533–535. <https://doi.org/10.1097/00001648-199609000-00014>

Siu, S. S., Yeung, J. H., & Lau, T. K. (2000). A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. *Human reproduction (Oxford, England)*, 15(11), 2423–2425. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.11.2423>

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(5), 972–978. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.972>

Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G. M., Toppari, J., Andersson, A. M., Eisenberg, M. L., Jensen, T. K., Jørgensen, N., Swan, S. H., Sapa, K. J., Ziebe, S., Priskorn, L., & Juul, A. (2016). Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. *Physiological reviews*, 96(1), 55–97. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015>

Snijder, C. A., Kortenkamp, A., Steegers, E. A., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Hass, U., & Burdorf, A. (2012). Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(4), 1191–1201. <https://doi.org/10.1093/humrep/der474>

Sordillo, J. E., Scirica, C. V., Rifas-Shiman, S. L., Gillman, M. W., Bunyavanich, S., Camargo, C. A., Jr, Weiss, S. T., Gold, D. R., & Litonjua, A. A. (2015). Prenatal and infant exposure to acetaminophen and ibuprofen and the risk for wheeze and asthma

in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 135(2), 441–448.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.065>

Stammschulte, T., Ludwig, W. D., Mühlbauer, B., Bronder, E., & Gundert-Remy, U. (2015). Metamizole (dipyrone)-associated agranulocytosis. An analysis of German spontaneous reports 1990-2012. *European journal of clinical pharmacology*, 71(9), 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s00228-015-1895-y>

Stumpf, M., Ternes, T. A., Wilken, R. D., Rodrigues, S. V., & Baumann, W. (1999). Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *The Science of the total environment*, 225(1-2), 135–141.
[https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(98\)00339-8](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(98)00339-8)

Sugimoto, Y., Inazumi, T., & Tsuchiya, S. (2015). Roles of prostaglandin receptors in female reproduction. *Journal of biochemistry*, 157(2), 73–80.
<https://doi.org/10.1093/jb/mvu081>

Swan, S. H., Main, K. M., Liu, F., Stewart, S. L., Kruse, R. L., Calafat, A. M., Mao, C. S., Redmon, J. B., Ternand, C. L., Sullivan, S., Teague, J. L., & Study for Future Families Research Team (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environmental health perspectives*, 113(8), 1056–1061. <https://doi.org/10.1289/ehp.8100>

Swan, S. H., Sathyanarayana, S., Barrett, E. S., Janssen, S., Liu, F., Nguyen, R. H., Redmon, J. B., & TIDES Study Team (2015). First trimester phthalate exposure and anogenital distance in newborns. *Human reproduction (Oxford, England)*, 30(4), 963–972. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu363>

Świacka, K., Maculewicz, J., Kowalska, D., Caban, M., Smolarz, K., & Świeżak, J. (2021). Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms - Current state of knowledge. *Journal of hazardous materials*, 424(Pt A), 127350. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127350>

Thorpe, P. G., Gilboa, S. M., Hernandez-Diaz, S., Lind, J., Cragan, J. D., Briggs, G., Kweder, S., Friedman, J. M., Mitchell, A. A., Honein, M. A., & National Birth Defects Prevention Study (2013). Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 22(9), 1013–1018.
<https://doi.org/10.1002/pds.3495>

Tinwell, H., Colombel, S., Blanck, O., & Bars, R. (2013). The screening of everyday life chemicals in validated assays targeting the pituitary-gonadal axis. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 66(2), 184–196.
<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.04.002>

Toppari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L. J., Jr, Jégou, B., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Leffers, H., McLachlan, J. A., Meyer, O., Müller, J., Rajpert-De Meyts, E., Scheike, T., Sharpe, R., Sumpter, J., & Skakkebaek, N. E. (1996). Male reproductive health and environmental

xenoestrogens. *Environmental health perspectives*, 104 Suppl 4(Suppl 4), 741–803. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104s4741>

Topuz, R. D., Gündüz, Ö., Karadağ, Ç. H., & Ulugöl, A. (2020). Non-opioid Analgesics and the Endocannabinoid System. *Balkan medical journal*, 37(6), 309–315. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.galenos.2020.2020.6.66>

Uzun, B., Atli, O., Perk, B. O., Burukoglu, D., & Ilgin, S. (2015). Evaluation of the reproductive toxicity of naproxen sodium and meloxicam in male rats. *Human & experimental toxicology*, 34(4), 415–429. <https://doi.org/10.1177/0960327114542886>

van den Driesche, S., Macdonald, J., Anderson, R. A., Johnston, Z. C., Chetty, T., Smith, L. B., Mckinnell, C., Dean, A., Homer, N. Z., Jorgensen, A., Camacho-Moll, M. E., Sharpe, R. M., & Mitchell, R. T. (2015). Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Science translational medicine*, 7(288), 288ra80. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4097>

Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998a). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 47 Suppl 2, S78–S87. <https://doi.org/10.1007/s000110050284>

Vane, J. R., & Botting, R. M. (1998b). Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *International journal of tissue reactions*, 20(1), 3–15.
Weintraub, A., & Mankuta, D. (2006). Dipyron-induced oligohydramnios and ductus arteriosus restriction. *The Israel Medical Association journal : IMAJ*, 8(10), 722–723.

Weithmann, K. U., & Alpermann, H. G. (1985). Biochemical and pharmacological effects of dipyron and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. *Arzneimittel-Forschung*, 35(6), 947–952.

Werler, M. M., Mitchell, A. A., Hernandez-Diaz, S., & Honein, M. A. (2005). Use of over-the-counter medications during pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 193(3 Pt 1), 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.02.100>

Wunsch, M. J., Stanard, V., & Schnoll, S. H. (2003). Treatment of pain in pregnancy. *The Clinical journal of pain*, 19(3), 148–155. <https://doi.org/10.1097/00002508-200305000-00002>

Ying, X. H., Bao, D. N., Jiang, H. Y., & Shi, Y. D. (2021). Maternal non-steroidal anti-inflammatory drug exposure during pregnancy and risk of miscarriage: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical pharmacology*, 10.1007/s00228-021-03222-w. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s00228-021-03222-w>

Zanrosso, C. W., Emerenciano, M., Gonçalves, B. A., Faro, A., Koifman, S., & Pombo-de-Oliveira, M. S. (2010). N-acetyltransferase 2 polymorphisms and susceptibility to infant leukemia with maternal exposure to dipyron during pregnancy. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the*

American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 19(12), 3037–3043. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0508>

APÊNDICE 1 – QUESTIONÁRIO DO ESTUDO CURITIBANO DE INVESTIGAÇÃO DO AMBIENTE E REPRODUÇÃO (CUIDAR)

1



**Projeto Curitibano de
Investigação do Ambiente e
Reprodução**

**Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
LABFERA - Laboratório de
Fisiologia Endócrina e
Reprodutiva**

QUESTIONÁRIO – 1º TRIMESTRE

1. Data de hoje (dd/mm/aaaa)
____/____/____
2. Código

3. Vamos começar perguntando alguns dados pessoais. Qual a sua data de nascimento?
(dd/mm/aaaa) ____/____/____
4. Qual a sua altura? (cm)

5. Qual seu peso atual? (Kg)

6. Qual seu peso logo antes de engravidar?
(Kg)

7. Qual é a sua autodeclaração de cor ou raça?
 - Branca Negra
 - Parda Indígena
 - Amarela Prefere não declarar
8. Qual seu estado civil?
 - Solteira Casada
 - União Estável Divorciada
 - Viúva
9. Qual seu nível de escolaridade?
 - Ensino fundamental incompleto
 - Ensino fundamental completo
 - Ensino médio incompleto
 - Ensino médio completo
10. Qual é, aproximadamente, a sua renda familiar mensal? (soma dos rendimentos de todas as pessoas que moram na casa)
 - até um salário mínimo (R\$937)
 - de um a três salários mínimos (R\$937 a R\$2811)
 - de três a seis salários mínimos (R\$2811 a R\$5622)
 - de seis a dez salários mínimos (R\$5622 a R\$9370)
 - acima de dez salários mínimos (acima de R\$9370)
 - Prefiro não responder
11. Qual a sua profissão?

12. Qual é a sua jornada de trabalho?
 - Mais que 40 horas por semana
 - Entre 20 e 40 horas por semana
 - 20 horas por semana
 - Menos que 20 horas por semana
 - Dona de casa
 - Desempregada
13. Desde que ficou grávida, você exerce ou exerceu alguma outra atividade profissional além da que você relatou anteriormente?
 - Sim Não

13.1. Qual? _____
14. Com relação ao nível de estresse, como você classificaria a sua rotina?
 - Muito estressante

- Estressante
- Não muito estressante
- Nada estressante
15. Agora vamos perguntar sobre alguns dados da sua gestação atual e hábitos de vida. Você sabe a data do primeiro dia da sua última menstruação?
- Sim Não
- 15.1. Qual? (dd/mm/aaaa) ___/___/___
16. Você sabe qual é o seu tempo de gestação?
- Sim Não
- 16.1. Quantas semanas? _____
17. Como você sabe o seu tempo de gestação?
- Menstruação
- US
- Médico
- Teste
- Exame de sangue
- Não sei
18. Antes da gestação você já teve excesso de pelos no buço, face, pescoço, peito ou abdome?
- Sim Não Não sei
19. Você alguma vez foi diagnosticada com Síndrome do Ovário Policístico?
- Sim Não Não sei
20. Você já esteve grávida, sem contar a gestação atual?
- Sim Não
- 20.1. Número de filhos nascidos vivos:
- _____
- 20.2. Número de abortos espontâneos / morte fetal não induzida:
- _____

- 20.3. Quantas vezes amamentou?
- _____
21. Você estava fazendo uso de contraceptivo hormonal quando descobriu que estava grávida? Se sim, por quanto tempo desde que estava grávida (dias, semanas, meses)?
- _____
22. Como você classificaria o seu estado de saúde atual?
- Excelente
- Bom
- Regular
- Ruim
23. A sua gestação é considerada de alto risco? Se sim, qual o motivo?
- _____
- _____
24. Você foi internada desde que ficou grávida?
- Sim Não
- 24.1. Qual o motivo da hospitalização?
- _____
- _____
25. Agora eu vou fazer algumas perguntas sobre o uso de medicamentos desde que você ficou grávida. Você em algum momento teve dores de cabeça, dores em geral (garganta, costas, pernas, barriga), gripe, resfriado, febre, cólicas, enjôo ou alguma outra doença ou sintoma?
- Sim Não Não sei
- Não quero responder
26. Você tomou paracetamol (Tylenol, Torsilax, Cimegripe, Infralax, Buscoduo) para tratar esses sintomas ou algum outro?

- Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
- 27. Qual(is) o(s) motivo(s) (doença ou sintoma)?**
 Dor de cabeça Dores – geral
 Gripe Resfriado
 Febre Cólica
 x
- 28. Teve outro sintoma que te levou a tomar esse(s) medicamento(s)?**
 Sim Não
- 28.1. Qual?**

- 29. Qual a dosagem (comprimidos, gotas, aplicações, etc. no total)? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)**

- 30. E dipirona (Dorflex, Neosaldina, Buscopan Composto, Benegrip, Anador, Lisador, Doralgina, Novalgina)?**
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
- 31. Qual(is) o(s) motivo(s) (doença ou sintoma)?**
 Dor de cabeça Dores – geral
 Gripe Resfriado
 Febre Cólica
 x
- 32. Teve outro sintoma que te levou a tomar esse(s) medicamento(s)?**
 Sim Não
- 32.1. Qual?**

- 33. Qual a dosagem (comprimidos, gotas, aplicações, etc. no total)? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)**

- 34. E ácido acetilsalicílico - AAS (Aspirina, Doril, Coristina D, Melhoral)?**
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
- 35. Qual(is) o(s) motivo(s) (doença ou sintoma)?**
 Dor de cabeça Dores – geral
 Gripe Resfriado
 Febre Cólica
 x
- 36. Teve outro sintoma que te levou a tomar esse(s) medicamento(s)?**
 Sim Não
- 36.1. Qual?**

- 37. Qual a dosagem (comprimidos, gotas, aplicações, etc. no total)? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)**

- 38. E ibuprofeno (Advil, Buprovil, Ibuflex, Ibupril, Buscofem, Spidufen)?**
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
- 39. Qual(is) o(s) motivo(s) (doença ou sintoma)?**
 Dor de cabeça Dores – geral
 Gripe Resfriado
 Febre Cólica
 x

40. Teve outro sintoma que te levou a tomar esse(s) medicamento(s)?
 Sim Não
 40.1. Qual?

41. Qual a dosagem (comprimidos, gotas, aplicações, etc. no total)? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)

42. E diclofenaco (Cataflam, Voltaren, Neotaflam, Fenaflam, Beserol)?
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
43. Qual(is) o(s) motivo(s) (doença ou sintoma)?
 Dor de cabeça Dores – geral
 Gripe Resfriado
 Febre Cólica
 x
44. Teve outro sintoma que te levou a tomar esse(s) medicamento(s)?
 Sim Não
 44.1. Qual?

45. Qual a dosagem (comprimidos, gotas, aplicações, etc. no total)? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)

46. Você toma algum medicamento de uso contínuo?
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
47. Qual medicamento de uso contínuo, motivo e dosagem? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)
48. Desde que você ficou grávida, você tomou algum outro medicamento?
 Sim Não Não sei
 Não quero responder Não se aplica
49. Qual medicamento, motivo e dosagem? (se não faz uso ou não quer responder, inserir -x-)

50. Agora eu vou fazer algumas perguntas sobre os seus hábitos alimentares (considere os seus hábitos desde o início da gestação). Quantas vezes você consome carne vermelha (boi, porco, carneiro, incluindo presunto, salsichas e embutidos em geral, etc.) por semana?
 Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
 Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
 Às vezes (1 dia por semana ou menos)
 Nunca
 Não sei
51. Quantas vezes você consome aves (frango, peru, etc.) por semana?
 Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
 Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
 Às vezes (1 dia por semana ou menos)
 Nunca
 Não sei

52. Quantas vezes você consome peixe ou frutos do mar por semana?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
53. Quantas vezes você consome queijo por semana?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
54. Quantas vezes você consome leite animal e derivados por semana (sem considerar os queijos)?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
55. Quantas vezes você consome frutas, vegetais e legumes frescos (não enlatados ou congelados) por semana?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
56. Quantas vezes você consome frutas, vegetais e legumes não frescos, isto é, enlatados ou congelados, por semana?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
57. Quantas vezes você consome soja ou produtos à base de soja, como tofu, leite de soja e proteína de soja, por semana?
- Sempre ou todos os dias (4 a 7 dias por semana)
- Quase sempre (2 a 3 dias por semana)
- Às vezes (1 dia por semana ou menos)
- Nunca
- Não sei
58. Você tem o hábito de consumir alimentos que são classificados como orgânicos ou livres de agrotóxicos, antibióticos e conservantes?
- Sim Não
59. Agora, vou perguntar sobre o uso de plásticos (considere os seus hábitos desde o último questionário). Você usa recipientes plásticos ou sacos plásticos para armazenamento ou consumo de alimentos?
- Sim Não
60. Usa plástico transparente flexível (filme plástico) para embalar alimentos?
- Sim Não
61. Com que frequência você consome bebidas (água, refrigerante, suco, leite, ou qualquer

- outra bebida) em copos ou garrafas de plástico?
- 5 ou mais vezes por dia
- 2 a 4 vezes por dia
- 1 vez por dia
- Menos de uma vez por dia
- Não consumo bebidas envasadas em garrafas de plástico
- Não sei
- 62.** Com que frequência você aquece ou consome bebidas ou alimentos quentes em recipientes plásticos?
- 5 ou mais vezes por dia
- 2 a 4 vezes por dia
- 1 vez por dia
- Menos de uma vez por dia
- Não consumo bebidas envasadas em garrafas de plástico
- Não sei
- 63.** Qual é a fonte mais comum de água que você bebe diariamente em casa?
- Água da torneira sem o uso de filtro
- Água da torneira filtrada
- Garrafa plástica
- Galão plástico
- Poço
- Outra
- 64.** Qual é a fonte mais comum de água que você bebe diariamente no seu trabalho?
- Água da torneira sem o uso de filtro
- Água da torneira filtrada
- Garrafa plástica
- Galão plástico
- Poço
- Não trabalho fora
- Não bebo água no trabalho
- Outra
- 65.** Você sabe o que significam os códigos de reciclagem de plásticos e leva isso em consideração na hora da compra?
- Sim Não
- 66.** Desde que você ficou grávida, você alguma vez fumou?
- Sim Não
- 66.1.** Qual a frequência e quantidade (cigarros(c) ou maços(m) por dia/semana/mês)? (Ex.: 4 cigarros/dia; 4c/d):
- _____
- 67.** Quantas horas por dia, em média, você tem ficado em torno de alguém que é fumante, perto o suficiente para que você possa sentir o cheiro da fumaça (horas, minutos/ dia)? (Não inclua a si mesma se você fuma) (se não fica perto de alguém que é fumante, digitar -x-):
- _____
- 68.** Desde que você ficou grávida você alguma vez ingeriu bebida alcoólica?
- Sim Não
- 68.1.** Qual a frequência? (quantas doses por dia/semana/mês ou ao total) - Tabela de doses no POP - Questionário-
- _____
- _____
- _____
- _____

69. Agora eu vou perguntar sobre o uso de cosméticos e produtos de higiene pessoal e limpeza. Você usa batom?

Sim Não

69.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

70. * Base líquida ou pó compacto facial

Sim Não

70.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

71. * Esmalte

Sim Não

71.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

72. * Loção hidratante NO CORPO

Sim Não

72.1. É perfumado? _____

72.2. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

73. * Loção hidratante NA FACE

Sim Não

73.1. É perfumado? _____

73.2. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

74. * Tintura para cabelo?

Sim Não

74.1. Frequência (vezes ao total):

75. * Produto para alisar o cabelo contendo substâncias químicas?

Sim Não

75.1. É perfumado? _____

75.2. Frequência (vezes ao total):

76. * Enxaguante bucal?

Sim Não

76.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

77. * Perfume, fragrância ou colônia?

Sim Não

77.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

78. * Protetor solar?

Sim Não

78.1. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

79. * Repelente?

Sim Não

79.1. Você sabe o nome do repelente (nome comercial ou princípio ativo)?

79.2. Frequência (vezes por dia/semana/mês):

80. Normalmente, você lava roupa a mão?

Sim Não

80.1. Frequência (vezes por semana):

81. Você verifica e leva em consideração a composição de cosméticos e produtos de higiene pessoal que você utiliza?

- Sempre
- Às vezes
- Nunca
- Não sei

82. Com relação a seguinte afirmação - Contaminantes (agrotóxicos, antibióticos e conservantes) presentes no ambiente apresentam riscos à saúde-, você:

- Concorda plenamente
- Concorda
- Não concorda nem discorda
- Discorda
- Discorda fortemente
- Não sei
- Não quero responder

83. Com relação a seguinte afirmação - É impossível reduzir o contato com contaminantes (agrotóxicos, antibióticos, conservantes)- você:

- Concorda plenamente
- Concorda
- Não concorda nem discorda
- Discorda
- Discorda fortemente
- Não sei
- Não quero responder

FIM DO QUESTIONÁRIO

APÊNDICE 2 – FOLDER DO PROGRAMA EDUCACIONAL

EDUCAÇÃO EM SAÚDE AMBIENTAL

Contaminantes químicos ambientais são substâncias presentes em diversos produtos e materiais utilizados no nosso dia-a-dia, como cosméticos, embalagens plásticas, produtos de higiene, água, alimentos industrializados, etc.

Entre os principais agentes contaminantes estão os agrotóxicos e alguns componentes de plásticos e cosméticos, como os Parabenos, os Ftalatos e o Bisfenol A (BPA).

Estudos mostram que a exposição constante a esses agentes pode desregular os hormônios no seu corpo, interferindo no desenvolvimento saudável de seu filho durante a gestação.

Com o intuito de auxiliar a reduzir sua exposição a esses contaminantes, apresentamos **orientações de algumas tarefas e hábitos** que você pode desenvolver durante a sua gestação.



Água

- Mantenha a caixa d'água limpa (<http://site.sanepar.com.br/informacoes/limpeza-de-caixa-de-agua>) para assim poder tomar água da torneira filtrada, evitando garrafas plásticas;
- Se utilizar garrafinhas, verifique se é feita de plásticos seguros de acordo com o **Código de Reciclagem de Plásticos** apresentado.

Medicamentos

Use medicamentos somente com indicação médica.
Evite a automedicação.



Não fume e não consuma bebidas alcoólicas durante a sua gestação.



EVITE o uso excessivo de produtos de limpeza durante este período.




LABFERA – Sala 111, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da UFPR – Centro Politécnico. Av. Francisco H. dos Santos, 100 – Jd. das Américas – Curitiba/PR CEP 81531-980
Fone para contato: (41) 3361 1719

Apoio:

PROGRAMA PESQUISA PARA O SUS
Gestão Compartilhada em Saúde - PPSUS

FUNDAÇÃO ARAUCÁRIA
Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná

Estudo Curitibano de Investigação do Ambiente e Reprodução




CUIDAR

Projeto Curitibano de Investigações Do Ambiente e Reprodução

Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Biológicas
LABFERA - Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva

Coordenador:
Prof. Dr. Anderson J. Martino Andrade



Cosméticos

PREFIRA

- Prefira produtos sem fragrância;
- Prefira sabonetes neutros;
- Verifique a presença de parabenos e ftalatos nos ingredientes dos cosméticos que você utiliza; Geralmente, os ingredientes estão em inglês, então procure pelas palavras: *paraben* e *phthalate*. Dê preferência a produtos livres de ftalatos e parabenos;
- Prefira produtos de higiene e cosméticos que tenham poucos ingredientes na sua composição;
- Procure utilizar esmaltes hipoalergênicos, que são livres de substâncias tóxicas (conhecidos como esmaltes *3free* ou *5free*);



EVITE

- Evite utilizar produtos com fragrância durante a gravidez;
- Evite utilizar esmaltes durante a gravidez;
- Evite utilizar maquiagens sempre que possível;
- Evite utilizar tinturas de cabelo e outros agentes químicos para cabelos durante a sua gravidez.



Embalagens

PREFIRA

Dê preferência ao uso de embalagens e recipientes de vidro ou porcelana. Prefira produtos livres de BPA.



REDUZA

o consumo de bebidas e comidas armazenadas em latas e/ou embalagens plásticas.



Códigos de reciclagem de plásticos:

USE E Recicle



EVITE Ou Reduza



Este código indica quais os tipos de plásticos utilizados são mais seguros. Você encontra essa informação nos rótulos de produtos com embalagem plástica.

Fique atenta!
Não aqueça e não leve ao micro-ondas alimentos ou bebidas em recipientes plásticos.



Alimentos

PREFIRA

- Alimentos frescos e da "época";
- Sempre que possível, consuma alimentos orgânicos ou de uma horta caseira que não use agrotóxicos.



EVITE

- Alimentos industrializados/processados;
- Alimentos embalados em plásticos.



E os AGROTÓXICOS, como posso diminuir o consumo dentro de casa?



- Lave a casca do alimento com água corrente e uma escovinha ou bucha.
- Retire a casca dos alimentos.
- Cultive condimentos e hortaliças na sua própria casa.
- Prefira comprar alimentos orgânicos.

**ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
EM SERES HUMANOS DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da associação entre fatores ambientais e a distância anogenital de recém-nascidos do sexo masculino em Curitiba: foco na exposição gestacional a ftalatos.

Pesquisador: ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 34820214.9.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 786.120

Data da Relatoria: 17/09/2014

Apresentação do Projeto:

Projeto de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia da UFPR, sob responsabilidade do professor Anderson Joel Martino de Andrade, em colaboração com a aluna Michele Bertonecello Souza (enfermeira) e Profa Rosana Nogueira de Moraes. O projeto foi aprovado na 41ª reunião do Colegiado do referido programa, em julho de 2014, após aprovação por banca avaliadora, conforme consta na ata da reunião anexada na PB. O contexto do projeto baseia-se nas evidências científicas de que o observado declínio na saúde reprodutiva masculina nas últimas décadas, com diminuição na contagem de espermatozoides, bem como o criptorquidismo, hipospádias e câncer testicular, alterações que conjuntamente constituem a Síndrome de Disgenesia Testicular (TDS), podem ser determinados por fatores ambientais, como a exposição a agentes químicos. Dados experimentais e epidemiológicos sugerem que exposições a algumas substâncias químicas durante o período pré-natal são particularmente críticas para a indução dos distúrbios reprodutivos que compõem a TDS,

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 786.120

particularmente substâncias que alteram o funcionamento do sistema endócrino, conhecidas genericamente como desreguladores endócrinos. Dentre estes destacam-se os agentes que bloqueiam a ação ou a produção de hormônios androgênicos (antiandrogênicos), como os ésteres de ftalato, substâncias usadas para conferir maleabilidade aos plásticos de policloreto de vinila, mas que também possuem outras aplicações, como na formulação de tintas, solventes e cosméticos. Nesse contexto, a distância anogenital (AGD), marcador anatômico sexualmente dimórfico em muitos mamíferos, tem sido utilizada como um indicador externo não invasivo do ambiente androgênico pré-natal em estudos toxicológicos com animais de laboratório e, mais recentemente, em estudos epidemiológicos com seres humanos. Evidências experimentais e clínicas sugerem associações entre reduções na AGD e a incidência e severidade de vários distúrbios reprodutivos, incluindo criptorquidismo, hipospádias e baixa contagem de espermatozoides. Além disso, estudos recentes demonstram associações inversas entre a exposição prénatal a ésteres de ftalato e a distância anogenital (AGD) em recém-nascidos do sexo masculino, corroborando dados obtidos em estudos toxicológicos.

O presente estudo pretende recrutar, por meio de cartazes, gestantes do Município de Curitiba e avaliar a exposição materna a dois dos principais ftalatos de preocupação toxicológica, o di-2-(etilhexil) ftalato (DEHP) e o di-butil ftalato (DBP), bem como investigar a possível associação entre a exposição a esses agentes e a distância anogenital dos descendentes do sexo masculino. O estudo será conduzido com gestantes recrutadas em diferentes Unidades Básicas de Saúde, representativas de cada um dos nove distritos sanitários de Curitiba, em parceria com o Programa Mãe Curitibana, Programa de Saúde Materno-Infantil da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba. Serão aplicados questionários de autorrelato sobre os hábitos de vida materno-familiar

nos três trimestres de gestação e ao nascimento e coletadas amostras de urina materna nos três trimestres de gestação para a quantificação de metabólitos urinários do DEHP e do DBP, bem como para a quantificação de metabólitos urinários de progestágenos, estrogênios e androgênios, a fim de avaliar o status hormonal materno. Após o parto, os recém-nascidos do sexo masculino serão submetidos a um exame físico para a avaliação da distância anogenital e outras medidas antropométricas gerais, como peso, comprimento e circunferência craniana. O estudo será conduzido a partir da aprovação pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD) e da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba (CEP/SMS) até 2019, totalizando 60 meses. Nesse período, será realizado um estudo piloto,

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 786.120

com recrutamento de gestantes durante seis meses em três unidades básicas de saúde do distrito Boa Vista, e um estudo principal com recrutamento de gestantes durante 24 meses em unidades representativas dos nove distritos sanitários de Curitiba.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar a distância anogenital em um grupo de recém-nascidos do sexo masculino do Município de Curitiba e investigar a possível associação entre esse parâmetro e as concentrações urinárias maternas dos metabólitos do di-2-(etilhexil) ftalato (DEHP) e do di-butil ftalato (DBP), separadamente ou em combinação, nos três trimestres de gestação.

Específicos:

- a) Recrutar mulheres no primeiro trimestre de gestação em unidades básicas de saúde vinculadas ao Programa Mãe Curitibana e aplicar questionários de autorrelato nos três trimestres de gestação e logo após o parto a fim de avaliar hábitos ligados ao estilo de vida materno-familiar.
- b) Coletar amostras de urina materna nos três trimestres de gestação e padronizar a metodologia de quantificação dos metabólitos do di-2-(etilhexil) ftalato (DEHP) e do di-butil ftalato (DBP) por cromatografia líquida de ultra/nano performance (NanoAdvance UHPLC, Bruker) acoplada à espectrometria de massa com analisadores quadrupolo e tempo de voo (MicroTOF-QII e fonte CaptiveSpray, Bruker).
- c) Mensurar metabólitos urinários de progestágenos, estrogênios e androgênios nas gestantes, a fim de avaliar o status hormonal materno nos três trimestres de gestação.
- d) Realizar medidas antropométricas e avaliação genital dos recém-nascidos do sexo masculino e investigar as possíveis associações entre a distância anogenital (AGD) e as concentrações urinárias maternas dos metabólitos do di-2-(etilhexil) ftalato (DEHP) e do di-butil ftalato (DBP), separadamente ou em combinação, em cada trimestre de gestação.
- e) Avaliar as possíveis associações entre AGD e as concentrações de metabólitos urinários de progestágenos, estrogênios e androgênios, bem como a relação entre esses hormônios e as concentrações dos metabólitos urinários de ftalatos.
- f) Colaborar com outros centros de investigação em epidemiologia reprodutiva a fim de confirmar o uso da AGD como um marcador externo não invasivo do ambiente androgênico pré-natal, bem como auxiliar na identificação de fatores ambientais associados a alterações reprodutivas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores descrevem de maneira adequada os riscos de constrangimento das participantes ao responderem os questionários e as medidas a serem adotadas para minimização dos mesmos.

Quanto aos benefícios descrevem a importância do conhecimento a respeito da exposição a

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 786.120

agentes ambientais potencialmente prejudiciais à saúde, com benefício indireto às participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores pretendem armazenar uma alíquota de urina congelada, para eventual uso em outro estudo, mas asseguram que, nesta eventualidade, novo TCLE será entregue às participantes da pesquisa, solicitando autorização para o uso destas amostras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram acrescentados à PB.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Por se tratar de pesquisa envolvendo Instituição da Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba, o pesquisador poderá iniciar a pesquisa somente após a análise de viabilidade emitida pelo CEP/SMS. Após análise do CEP da SMS, favor anexar o Parecer de Viabilidade no Sistema PB, modo:

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Continuação do Parecer: 786.120

notificação

CURITIBA, 10 de Setembro de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DA PREFEITURA MUNICIPAL DE CURITIBA

PREFEITURA MUNICIPAL DE
CURITIBA-SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da associação entre fatores ambientais e a distância anogenital de recém-nascidos do sexo masculino em Curitiba: foco na exposição gestacional a ftalatos.

Pesquisador: ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 34820214.9.3001.0101

Instituição Proponente: Programa de Pós-Graduação em Fisiologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 926.727

Data da Relatoria: 15/10/2014

Apresentação do Projeto:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Endereço: Rua Francisco Torres, 830

Bairro: Centro

CEP: 80.060-130

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3350-9450

Fax: (41)3350-9320

E-mail: etica@sms.curitiba.pr.gov.br

PREFEITURA MUNICIPAL DE
CURITIBA-SES



Continuação do Parecer: 926.727

Recomendações:

O projeto foi considerado aprovado condicionado à seguinte recomendação:

- A aplicação dos questionários e o exame físico deverá ser realizado pelo pesquisador e combinado com a Coordenação Local da Unidade, quanto ao espaço físico e horários.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com parecer de ética do CEP/SCS-UFPR.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP/SMS-Curitiba acompanha o parecer do relator.

CURITIBA, 24 de Dezembro de 2014

Assinado por:
SAMUEL JORGE MOYSÉS
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco Torres, 830

Bairro: Centro

CEP: 80.060-130

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3350-9450

Fax: (41)3350-9320

E-mail: etica@sms.curitiba.pr.gov.br

ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Prof. Anderson Joel Martino Andrade, Profa Rosana Nogueira de Moraes, Amanda Atuati Maltoni, Amanda Caroline Venturelli, Anderson Tadeu de Araújo Ramos, Bianca Manfroi da Silva, Carla Giovana Basso, Debora Salles da Silva Coutinho, Daniele Cristine Krebs Ribeiro, Daniele Dietrich da Moura Costa, Giulia Moreira Couto Araújo, Juliana Machado Franco, Juliane Centeno Müller, Karin Lucilda Schultz, Katlyn Barp Meyer, Marcella Tapias Passoni Pereira da Silva, Mariana Regina Rompkovski, Marianne Orlandini Klein, Michele Bertocello Souza, Nathalia Ferreira Camarço, Sara Emilia Lima Tolouei, Sofia Santos Lima Figueiredo e Vitória Aline Santana Rios, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar voluntariamente do estudo intitulado "Investigação da associação entre fatores ambientais e a distância anogenital de recém-nascidos do sexo masculino em Curitiba: foco na exposição gestacional a ftalatos".

- a) O objetivo principal desta pesquisa é investigar a exposição gestacional a substâncias químicas, incluindo substâncias presentes em plásticos, medicamentos, cosméticos, agrotóxicos e outros produtos industriais, e a distância anogenital de recém-nascidos. A distancia anogenital é um marcador anatômico da saúde reprodutiva masculina e feminina que pode servir como indicador de exposições a hormônios ou substâncias químicas que agem como hormônios, chamadas de desreguladores endócrinos.
- b) Para participar você deve ter, atualmente, entre 18 e 40 anos de idade, residir em Curitiba e ser gestante com até 16 semanas de gestação. Além disso, você também deve estar vinculada ao Programa Mãe Curitibana como gestante de baixo risco em uma unidade básica de saúde do Município de Curitiba.
- c) Caso você participe desta pesquisa, você responderá a três questionários sobre os seus hábitos de vida, sendo aproximadamente um questionário em cada trimestre de gestação, durante visitas de rotina à unidade de saúde do Programa Mãe Curitibana à qual você está vinculada ou, alternativamente, na sua residência. Para facilitar nosso encontro, poderemos enviar mensagens de texto ou telefonar para lembrá-la dessas visitas. Juntamente com cada questionário, você deverá coletar uma amostra de urina, totalizando três amostras ao longo da gestação. Os pesquisadores responsáveis por este estudo fornecerão os frascos necessários para a coleta, bem como todas as orientações sobre a coleta e entrega da urina. Essas amostras serão utilizadas para que possamos medir as concentrações urinárias de hormônios e de uma grande variedade de agentes químicos, incluindo substâncias presentes em plásticos, medicamentos, cosméticos, agrotóxicos e outros produtos industriais e contaminantes químicos ambientais. Além disso, entraremos em contato com você por mensagem de texto enviada ao seu celular a cada quinze dias, a fim de verificar o uso de medicamentos ao longo da gestação. Perguntaremos o nome do medicamento e também a quantidade e por qual motivo você usou. Após o nascimento do seu bebê será feito um exame físico no recém-nascido, na primeira consulta pós-natal do Programa Mãe Curitibana. Inicialmente serão obtidos o peso e medidas corporais gerais do bebê, como o comprimento e circunferência craniana. Em seguida, será realizado um breve e simples exame genital no bebê. Em meninos será avaliado o posicionamento dos testículos e da uretra, e realizadas as medidas da largura do pênis e da distância anogenital. Serão medidas duas variações da distancia anogenital: (1) a distância entre o centro do ânus e a base anterior do pênis e (2) a distância entre o centro do ânus e a base do escroto. Em meninas o exame genital consistirá basicamente na realização da medida da distância anogenital, que também apresenta duas variações: (1) a distância entre o centro do ânus e o clitoris e (2) a distância entre o centro do ânus e o início da vulva (comissura posterior ou fúrcula). Essas medidas serão feitas com um paquímetro digital, equipamento semelhante a uma régua. Esse exame será feito por um membro da equipe do nosso estudo e na sua presença.
- d) Essa pesquisa não oferece nenhum risco à sua saúde ou à saúde de seu(sua) filho(a), embora possa haver um pequeno desconforto para o bebê, como em qualquer exame físico.
- e) No início do estudo daremos orientações e material didático informativo sobre como reduzir a exposição a agentes químicos na gestação, constituindo um benefício da sua participação neste projeto. Além disso, embora não existam outros benefícios diretos à sua saúde ou à saúde de seu(sua) filho(a), este estudo servirá para que possamos investigar as possíveis relações entre fatores ambientais, especialmente a exposição gestacional a desreguladores endócrinos, e a distância anogenital, um marcador anatômico que está relacionado com algumas alterações endócrinas e reprodutivas que podem ter origem durante o período pré-natal.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
 Paracer CEP/SD-PB.nº 2398/10
 na data de 11/09/2018.

2018
 09/09

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | 1º andar | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

Rubricas:

Participante da Pesquisa _____

Pesquisador Responsável _____

- f) Os pesquisadores responsáveis pelo projeto são Anderson Joel Martino Andrade, Rosana Nogueira de Moraes, Amanda Atuati Maltoni, Amanda Caroline Venturelli, Anderson Tadeu de Araújo Ramos, Bianca Manfrói da Silva, Carla Giovana Basso, Debora Salles da Silva Coutinho, Daniele Cristine Krebs Ribeiro, Daniele Dietrich da Moura Costa, Giulia Moreira Couto Araújo, Juliana Machado Franco, Juliane Centeno Müller, Karin Lucilda Schultz, Katlyn Barp Meyer, Marcella Tapias Passoni Pereira da Silva, Mariana Regina Rompkovski, Marianne Orlandini Klein, Michele Bertocello Souza, Nathalia Ferreira Camarço, Sara Emilia Lima Tolouei, Sofia Santos Lima Figueiredo e Vitória Aline Santana Rios. Qualquer um deles poderá ser contactado para esclarecimentos ou problemas antes, durante e após o término da pesquisa pelos telefones (41) 3361-1719 e (41) 9 9804-9991, pelos e-mails Anderson Joel Martino Andrade (martino.andrade@gmail.com), Rosana Nogueira de Moraes (moraisrn@gmail.com), Amanda Atuati Maltoni (amandaatuati@gmail.com), Amanda Caroline Venturelli (amandaventurelli@hotmail.com), Anderson Tadeu de Araújo Ramos (andersontadeu9@hotmail.com), Bianca Manfrói da Silva (bianca.manfrois@gmail.com), Carla Giovana Basso (carla_basso@yahoo.com.br), Debora Salles da Silva Coutinho (debora_salles@ufpr.br), Daniele Cristine Krebs Ribeiro (danicris_krebs@hotmail.com), Daniele Dietrich da Moura Costa (danidmc87@gmail.com), Giulia Moreira Couto Araújo (giuliabio13@gmail.com), Juliana Machado Franco (jumfranco4@gmail.com), Juliane Centeno Müller (julimuller2@hotmail.com), Karin Lucilda Schultz (karinluschultz@gmail.com), Katlyn Barp Meyer (katlynb@gmail.com), Marcella Tapias Passoni Pereira da Silva (maapassoni@hotmail.com), Mariana Regina Rompkovski (mari_rompk@hotmail.com), Marianne Orlandini Klein (mah_klein@hotmail.com), Michele Bertocello Souza (michele_bertoncello@yahoo.com.br), Nathalia Ferreira Camarço (nat.nutrifisica@hotmail.com), Sara Emilia Lima Tolouei (saratolouei@gmail.com), Sofia Santos Lima Figueiredo (sofiaslf@outlook.com) e Vitória Aline Santana Rios (vitorialine_rios@hotmail.com), ou diretamente no seguinte local e horários: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva (Prof Anderson J M Andrade e Profa Rosana Moraes), Sala 111 do Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, Av. Francisco H dos Santos sem número, Centro Politécnico, CEP 81531-980, Curitiba/PR, de segunda a sexta-feira, das 8h30 às 17h30.
- g) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
A sua recusa em participar deste estudo não implicará na interrupção ou qualquer alteração no seu atendimento pré-natal no Programa Mãe Curitibana.
- h) A sua identificação e de seu(sua) filho(a) serão mantidas sob confidencialidade e anonimato. Se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade e de seu(sua) filho(a) sejam preservadas e seja mantida a confidencialidade.
- i) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar, permitindo também que seja feito um exame físico pós-natal no(a) meu(minha) filho(a). A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão me afete de qualquer maneira.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura da participante da pesquisa)

(Assinatura do Pesquisador)

Curitiba, ____ de _____ de _____.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 2798/410
na data de 17/09/2010. *qth*

ANEXO 4 – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (CEUA/BIO – UFPR)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1163

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.008134/2018-38

APROVADO/APPROVAL: 17/04/2018 – R.O. 03/2018

TÍTULO: Analgésicos na gestação: prevalência de uso em gestantes de Curitiba e investigação de efeitos desreguladores endócrinos em modelos animais.

TITLE: Analgesics in pregnancy: prevalence of use in pregnant women in Curitiba and investigation of endocrine disrupting effects in animal models.

AUTORES/AUTHORS: Anderson Joel Martino Andrade, Marcella Tapias Passoni Pereira da Silva, Paulo Roberto Dalsenter, Mariana Regina Rompkovski, Nicole Grechi.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Fisiologia

Prof.ª Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA