

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

MARCELLA TAPIAS PASSONI



**EFEITOS DA DIPIRONA NA ESTEROIDOGÊNESE E NAS ATIVIDADES
(ANTI)ANDROGÊNICAS MEDIADAS POR RECEPTORES *IN VITRO* E *IN VIVO***

CURITIBA

2017

MARCELLA TAPIAS PASSONI

**EFEITOS DA DAPIRONA NA ESTEROIDOGÊNESE E NAS ATIVIDADES
(ANTI)ANDROGÊNICAS MEDIADAS POR RECEPTORES *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia, no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de concentração Toxicologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Dalsenter

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Passoni, Marcella Tapias
Efeitos da dipirona na esteroidogênese e nas atividades
(anti)androgênicas mediadas por receptores *in vitro* e *in vivo*./ Marcella
Tapias Passoni. – Curitiba, 2017.
83 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Anderson Joel Martino Andrade
Co-orientador: Paulo Roberto Dalsenter
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Desreguladores endócrinos. 2. Analgésicos. 3. Dipirona. I. Título II.
Andrade, Anderson Joel Martino. III. Dalsenter, Paulo Roberto. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

ATA Nº

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia trinta de Agosto de dois mil e dezessete às 09:00 horas, na sala 107 - Anfiteatro, Farmacologia - Anexo I do Setor de Ciências Biológicas, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA** para a Defesa Pública de sua dissertação intitulada **EFEITOS DA DIPIRONA NA ESTEROIDOGÊNESE E NAS ATIVIDADES (ANTI)ANDROGÊNICAS MEDIADAS POR RECEPTORES *IN VITRO* E *IN VIVO***. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE (UFPR), JULIANE CENTENO MULLER (FPP), ALEXANDRA ACCO (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre 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 membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Agosto de 2017.

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JULIANE CENTENO MULLER
Avaliador Externo (FPP)

ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARCELLA TAPIAS PASSONI PEREIRA DA SILVA** intitulada: **EFEITOS DA DIPIRONA NA ESTEROIDOGÊNESE E NAS ATIVIDADES (ANTI)ANDROGÊNICAS MEDIADAS POR RECEPTORES *IN VITRO* E *IN VIVO***, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre 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, 30 de Agosto de 2017.

ANDERSON JOEL MARTINO ANDRADE
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JULIANE CENTENO MULLER
Avaliador Externo (FPP)

ALEXANDRA ACCO
Avaliador Interno (UFPR)

NOTA EXPLICATIVA

Esta dissertação é apresentada em formato alternativo – artigo 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, objetivos do trabalho e um artigo científico abordando os experimentos realizados, com resultados e discussão, bem como conclusão. O artigo foi formatado conforme as normas propostas pelo periódico “Archives of Toxicology” ao qual foi submetido em Agosto de 2017.

Dedico este trabalho às pessoas que tenho como exemplo de vida, minha mãe e meus avós, que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu concluísse mais uma importante etapa da minha vida, por me ensinarem que nada se consegue sem esforço e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, por guiar meu caminho, pelas bênçãos e graças, pela força, coragem e ânimo mesmo diante às dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Anderson Joel Martino Andrade**, primeiramente por ter me concedido a oportunidade de ser sua aluna de mestrado; agradeço imensamente pelo apoio, paciência, e por ter despertado em mim o encanto pela pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos que me fizeram progredir, e serão exemplos por toda minha vida pessoal e profissional. É uma verdadeira honra trabalhar com você.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Paulo Roberto Dalsenter**, pela parceria, ajuda, apoio e contribuições; pelo espaço cedido para a realização de todos os meus experimentos e pelos ensinamentos. Agradeço também pela amizade e conversas no café.

À Prof^a. Dra. **Rosana Nogueira de Moraes**, pelo auxílio na realização das dosagens hormonais, pelo aprendizado, pelas contribuições, e por ter se tornado uma referência na minha vida profissional. Minha eterna admiração e carinho!

Às professoras Dra. **Maria Fernanda de Paula Werner**, Dra. **Helena Cristina da Silva de Assis**, Dra. **Alexandra Acco**, Dra. **Juliane Müller** e Dra. **Claudia Feijó Ortolani-Machado**, que aceitaram o convite para compor a banca da qualificação e da defesa de mestrado. Muito obrigada pelas contribuições tão valiosas para o complemento deste trabalho!

Aos colaboradores da Universidade de Copenhagen e da BASF, pela parceria e pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Aos amigos do laboratório de Toxicologia Reprodutiva, **Caroline**, **Ana Cláudia**, **Bruna**, **Nicole**, **Jonas**, **Eliana** e **Evana** pela companhia, ajuda e apoio desde o meu primeiro dia, durante a realização dos experimentos, até a finalização deste trabalho, e principalmente, pelo carinho e amizade que foram construídos ao longo desse período. Minha eterna gratidão, admiração e amor!

Aos amigos que foram os melhores presentes ao longo do mestrado, **Natália**, **Maiara**, **Camila** e **Carlos**, para sempre amor!

Às colegas do laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal, **Katlyn, Amanda, Gabriele e Giulia** pela ajuda, experimentos em conjunto e momentos compartilhados.

Às novas amigas e companheiras de trabalho, **Tatiana, Sara e Gabriela**, obrigada por tornarem os meus dias mais agradáveis e minha vida mais feliz! Que venham muitos anos juntas pela frente!

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Farmacologia da UFPR.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, especialmente às queridas **Gilmara e Luana**, muito obrigada por tanta ajuda e colaboração!

À minha mãe **Lucilene** e aos meus avós **Maria Antônia e Ouolder** por todo apoio, incentivo e amor incondicionais. Nenhuma conquista seria possível sem vocês ao meu lado. Meus amores eternos!

A toda a minha família, especialmente aos meus tios **Nilza e Rogério**, e à minha prima **Regiane** por terem me incentivado e acreditado nas minhas realizações profissionais.

Ao meu namorado **Diego**, por tentar estar presente mesmo distante, pela ajuda, apoio, paciência, companheirismo, cumplicidade, amor, e principalmente, por acreditar na minha capacidade, me fazer acreditar e não me deixar desistir nunca.

Às minhas amigas **Caroline, Rafaela, Rahiza, Isabella e Angelina**, que entenderam as minhas ausências e tanto me deram apoio e amor durante esses dois anos!

Às melhores amigas de infância que alguém poderia ter, **Isadora e Giovana**, obrigada por caminharmos juntas durante esses 20 anos.

Às amigas que são a minha saudade, **Helena e Giuliana**. Nossa amizade demonstra por si só sua essência. Distantes e ao mesmo tão perto em amor e pensamento.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos animais, que têm sua vida sacrificada em favor da ciência, meu respeito e gratidão!

E a todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. ”

Charles Chaplin

RESUMO

Muitas substâncias químicas podem perturbar o funcionamento do sistema endócrino e causar efeitos adversos à saúde de indivíduos expostos. A exposição a essas substâncias, conhecidas como desreguladores endócrinos, é preocupante especialmente para organismos em desenvolvimento. Analgésicos de uso comum como paracetamol, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno, estão entre os medicamentos mais utilizados em todo o mundo e recentemente têm sido associados a efeitos antiandrogênicos, por inibição da produção de testosterona pelo testículo fetal. Devido à alta prevalência do uso de analgésicos durante a gestação, existe uma preocupação com os possíveis riscos associados à exposição pré-natal a esses medicamentos. No Brasil, o analgésico mais utilizado é a dipirona (metamizol) e, embora seu uso não seja recomendado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres utilizam esse fármaco ao longo desse período. Contudo, não existem dados sobre os seus possíveis efeitos desreguladores endócrinos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da dipirona e seus principais metabólitos, 4-Metilaminoantipirina (MAA) e 4-Aminoantipirina (AA), na esteroidogênese e nas atividades (anti)androgênicas mediadas por receptores *in vitro* e *in vivo* por meio de diferentes ensaios. Para avaliar os efeitos da dipirona na esteroidogênese foram mensuradas as concentrações de hormônios esteroides em células H295R de adenocarcinoma humano após exposição à dipirona, MAA e AA, bem como a produção de testosterona testicular fetal em ratos após exposição intrauterina à dipirona entre os dias gestacionais 14 e 18, período crítico para a diferenciação sexual andrógeno-dependente. Os efeitos androgênicos agonistas e antagonistas foram avaliados *in vitro* para a dipirona e seus dois metabólitos em um ensaio baseado na ativação transcricional de um gene repórter (Yeast Androgen Screen - YAS), e *in vivo* para a dipirona por meio do teste de Hershberger, que utiliza órgãos-andrógeno dependentes como biomarcadores da ação androgênica em ratos castrados. *In vitro*, foi testada uma ampla faixa de concentrações de dipirona, MAA e AA (0,1-1000 μM), enquanto nos ensaios *in vivo* foram utilizadas três doses de dipirona relevantes para humanos (50, 100, 200 mg/kg/dia). No teste de esteroidogênese *in vitro*, a dipirona, MAA e AA, reduziram a produção de androgênios e corticosteroides. A menor concentração (314 μM) de MAA e AA que foi capaz de reduzir a produção de testosterona foi aproximadamente 4 e 13 vezes maior do que as concentrações plasmáticas máximas relatadas em humanos (75,9 e 24,1 μM), respectivamente. No entanto, não foram observados efeitos no teste de produção de testosterona testicular fetal em nenhuma das doses testadas. Nos testes YAS e Hershberger não foram observadas atividades androgênicas agonistas ou antagonistas. Nas condições experimentais testadas, a dipirona e seus metabólitos inibiram a esteroidogênese *in vitro*, mas não *in vivo*. Os efeitos (anti)androgênicos mediados por receptores não foram observados *in vitro* ou *in vivo*. Sendo assim, a dipirona demonstrou potencial para inibir a esteroidogênese, porém somente em concentrações não relevantes terapêuticamente. Estudos futuros devem investigar os efeitos da exposição *in utero* e lactacional à dipirona sobre o desenvolvimento pós-natal da prole, com ênfase em parâmetros endócrinos e reprodutivos.

Palavras-chave: Desreguladores endócrinos. Analgésicos. Dipirona. Metamizol. Esteroidogênese *in vitro* H295R. Esteroidogênese testicular fetal. Yeast androgen screen. Teste de Hershberger.

ABSTRACT

Many chemicals can disrupt the endocrine system and cause adverse health effects on exposed individuals. The exposure to these substances, known as endocrine disruptors, is particularly concerning to developing organisms. Mild analgesics such as paracetamol, acetylsalicylic acid and ibuprofen, are among the most used drugs worldwide and have been recently associated with antiandrogenic effects, inhibiting testosterone production by the fetal testis. Due the high prevalence of analgesic use during pregnancy, there is a concern about the possible risks associated with prenatal exposure to these drugs. In Brazil, dipyrone (metamizole) is the most commonly used analgesic, and although its use is not recommended during pregnancy, it is known that many women use this drug over this period. However, its potential endocrine disrupting effects have not yet been investigated. The aim of this study was examine the effects of dipyrone and its two major metabolites, 4-Methylaminoantipyrine (MAA) and 4-Aminoantipyrine (AA), on steroidogenesis and receptor-mediated (anti)androgenic activities *in vitro* and *in vivo* through different assays. For assessment of dipyrone effects on steroidogenesis, were measured the production of steroid hormones in human adrenocarcinoma H295R cells after exposure to dipyrone, MAA and AA, as well as fetal testicular testosterone production in rats following maternal dipyrone exposure between gestational days 14 and 18, a critical period for androgen-dependent sexual differentiation. Androgen agonistic and antagonistic effects were examined *in vitro* for dipyrone and its two metabolites in a yeast-based transcriptional activation reporter gene assay (Yeast Androgen Screen – YAS), and *in vivo* for dipyrone through the Hershberger assay, a screening test that uses androgen-dependent tissues as biomarkers of androgenic action in castrated rats. *In vitro*, were tested a wide range of concentrations of dipyrone, MAA and AA (0.1-1000 μM) while in the *in vivo* assays were used three human relevant dipyrone doses (50, 100, 200 mg/kg/day). In the H295R steroidogenesis assay, dipyrone, MAA and AA reduced the production of androgens and corticosteroids. For MAA and AA, the lowest concentration to reduce testosterone production (314 μM) was approximately 4 and 13 times higher than the maximum plasma concentrations reported in humans (75.9 and 24.1 μM), respectively. However, no effects were observed in the fetal testicular testosterone production assay at any dose. In the YAS and Hershberger assays, no androgen agonistic or antagonistic activities were observed. In the tested experimental conditions, dipyrone and its metabolites inhibited steroidogenesis *in vitro*, but appear not to do so *in vivo*. Receptor-mediated androgenic or antiandrogenic effects were not observed *in vitro* or *in vivo*. Thus, dipyrone has the potential to inhibit steroidogenesis, however only at concentrations that are not relevant under normal medical use. Future studies should examine the effects of *in utero* and lactational dipyrone exposures on offspring development, with particular focus on sensitive endocrine and reproductive endpoints.

Key-words: Endocrine disruptors. Analgesics. Dipyrone. Metamizole. H295R steroidogenesis assay. Fetal rat testosterone production. Yeast androgen screen. Hershberger assay.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DOS PAÍSES ONDE A DIPIRONA ENCONTRA-SE DISPONÍVEL NO MERCADO	32
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA DIPIRONA..	33
FIGURA 3 – MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA POR ANALGÉSICOS NO TESTÍCULO FETAL	73

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1 – EFFECTS OF DIPYRONE, MAA AND AA ON THE H295R STEROIDOGENESIS.....	52
FIGURE 2 – PRODUCT/SUBSTRATE RATIOS RELATIVE TO SOLVENT CONTROLS FOR THE THREE ENZYMATIC REACTIONS CYP17-HYDROXYLASE, CYP17-LYASE AND CYP21 WHEN H295R CELLS WERE EXPOSED TO INCREASING CONCENTRATIONS OF DIPYRONE, MAA AND AA.....	53
FIGURE 3 – EFFECTS OF DIPYRONE ON FETAL RAT TESTIS TESTOSTERONE PRODUCTION FOLLOWING <i>IN UTERO</i> EXPOSURE FROM GESTATION DAY 14-18	54
FIGURE 4 – ANDROGEN AGONISTIC AND ANTAGONISTIC SCREENING FOR DIPYRONE, MAA AND AA.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANALGÉSICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIS (AINEs)	26
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO

TABLE S1 – PREGNANCY OUTCOMES IN RAT DAMS EXPOSED TO DIPYRONE 50, 100, 200 MG/KG/DAY AND DEHP 750 MG/KG/DAY FROM GESTATION DAYS 14 TO 18	55
TABLE 1 – BODY WEIGHT (g) AND ABSOLUTE ANDROGEN-DEPENDENT ORGAN WEIGHTS (g) OF PUBERTAL CASTRATED MALE RATS AFTER 10 DAYS OF TREATMENT IN THE HERSHBERGER ASSAY	58

LISTA DE SIGLAS

11-deoxyCORd5	- d5-11-deoxycortisol
11-deoxyCOSd8	- d8-11-deoxycorticosterona
AA	- 4-Aminoantipirina
A.A	- Ácido Araquidônico
AAA	- Acetilaminoantipirina
AAS	- Ácido acetilsalicílico
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
ALDOd7	- d7-aldosterona
AMPc	- Monofosfato cíclico de adenosina
ANd7	- d7-androstenediona
ANOVA	- Analysis of Variance
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AS	- Ácido salicílico
ATCC	- American Type Culture Collection
cAMP	- Cyclic adenosine monophosphate
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAS	- Chemical Abstracts Service
CB	- Receptor Canabinoide
CNPq	- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CORd4	- d4-cortisol
COSd8	- d8-corticosterona
COX	- Ciclooxigenase
CPRG	- Chloro-phenol red- β -D-galactopyranoside
DEHP	- Di(2-etilhexil)ftalato
DES	- Dietilestilbestrol
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DHEAd6	- d6-dehidroepiandrosterona
DHT	- Dihidrotestosterona
DHTd3	- d3-dihidrotestosterona
DMEM/F12	- Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	- Dimetilsulfóxido
EC	- European Comission

EDSP	- Endocrine Disruptor Screening Program
EMA	- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
ETEs	- Estações de Tratamento de Esgoto
EUA	- Estados Unidos da América
FAA	- Formilaminoantipirina
FDA	- Food and Drug Administration
GD	- Gestational day
GMPc	- Monofosfato cíclico de guanosina
hAR	- Receptor androgênico humano
HPLC	- High performance liquid chromatography
HSD	- Hidroxiesteroide deshidrogenase
IAAAS	- International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study
INSL-3	- Fator semelhante à insulina-3
IPCS	- International Programme on Chemical Safety
IS	- Internal standart
IU	- International Unit
LABC	- Levator ani muscle/Bulbocavernosus muscle
LOQ	- Limit of quantitation
MAA	- 4-Metilaminoantipirina
NSAIDs	- Non-steroidal anti-inflammatory drugs
OECD	- Organisation for Economic Co-operation and Development
PGD2	- Prostaglandina D2
pH	- Potencial hidrogeniônico
PPAR-γ	- Proliferador de peroxissomo-gama
PROGd9	- d9-progesterona
SD	- Standart deviation
SEM	- Standard error of mean
StAR	- Steroidogenic acute regulatory protein
TSd3	- d3-testosterona
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
US EPA	- United States Environmental Protection Agency
WHO	- World Health Organization
YAS	- <i>Yeast Androgen Screen</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	- microlitros
μM	- micromolar
cm^3	- centímetros cúbicos
e.g.	- por exemplo
Fig.	- figure
Flut	- flutamide
g	- gramas
h	- horas
kg	- quilogramas
mg	- miligramas
min	- minutos
mL	- mililitros
mm	- milímetros
ng	- nanogramas
nm	- nanômetros
nM	- nanomolar
pg	- picograma
Test	- testosterone
Veh	- vehicle

LISTA DE SÍMBOLOS

% - percentual

® - marca registrada

± - mais ou menos

°C - graus Celcius

≥ - maior ou igual

= - igual

g - força centrífuga (gravidade)

p - nível de significância

≤ - menor ou igual

n - tamanho da amostra

< - menor

β - beta

+ - mais

γ - gama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	SISTEMA ENDÓCRINO	21
2.2	DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	22
2.3	ANALGÉSICOS E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA	26
2.4	USO DE ANALGÉSICOS DURANTE A GESTAÇÃO.....	28
2.5	DIPIRONA	30
2.6	TESTES TOXICOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DESREGULADORAS ENDÓCRINAS.....	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL.....	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5	ARTIGO CIENTÍFICO	41
5.1	INTRODUCTION	43
5.2	MATERIAL AND METHODS	44
5.2.1	Animals.....	44
5.2.2	Chemicals.....	45
5.2.3	Selection of drug concentrations and doses	45
5.2.4	H295 steroidogenesis assay.....	46
5.2.5	<i>Ex vivo</i> fetal testicular testosterone production.....	47
5.2.6	Yeast androgen screen – YAS	48
5.2.7	Hershberguer assay	49
5.2.8	Statistical analyses	50
5.3	RESULTS	51
5.3.1	H295R steroidogenesis assay	51
5.3.2	<i>Ex vivo</i> fetal testicular testosterone production.....	54
5.3.3	Yeast Androgen Screen – YAS	55
5.3.4	Hershberguer assay	57
5.4	DISCUSSION	59
5.5	REFERENCES	64
6	DISCUSSÃO ESTENDIDA E CONCLUSÃO	67

7	REFERÊNCIAS.....	76
---	------------------	----

1 INTRODUÇÃO

A alta produção e o uso de substâncias químicas industriais nas últimas décadas têm causado preocupação na comunidade científica e no público em geral em razão da possibilidade de contaminações ambientais, exposições de organismos vivos e riscos à saúde. Dentre os diversos agentes químicos estudados, tem havido especial atenção com aqueles capazes de perturbar o sistema endócrino dos seres vivos, genericamente conhecidos como agentes desreguladores endócrinos. Essa preocupação justifica-se pela ampla diversidade de substâncias descritas com esse potencial e pelos possíveis efeitos adversos que podem ser induzidos por alterações do sistema endócrino. Em particular destacam-se os efeitos que podem ocorrer por perturbações endócrinas em organismos imaturos, especialmente no período pré-natal, cujo desenvolvimento e crescimento são amplamente dependentes de uma série de interações hormonais que ocorrem durante janelas específicas do desenvolvimento.

O aumento da incidência de desordens relacionadas ao sistema endócrino na população, como problemas de fertilidade, malformações genitais, disfunções tireoidianas, diabetes, obesidade e até alguns tipos de câncer, contribuem para a preocupação acerca de substâncias com potencial desregulador endócrino (WHO, 2012). Diversos estudos epidemiológicos e experimentais indicam que a exposição a essas substâncias, especialmente durante períodos críticos do desenvolvimento, poderia contribuir para o surgimento de alguns desses distúrbios (COLBORN et al., 1993; SHARPE E SKAKKEBAEK, 1993; VANDENBERG et al., 2007; VOM SAAL et al., 2008; GRAY et al., 2009; MARTINO-ANDRADE E CHAHOUD, 2010; SHARPE, 2011; VOM SAAL et al., 2014).

Muitas substâncias têm sido apontadas como potenciais desreguladores endócrinos. De acordo com um documento da Organização Mundial da Saúde publicado em 2012, cerca de 800 substâncias químicas são suspeitas ou reconhecidas como desreguladores endócrinos. Esse número é relativamente pequeno considerando a exposição humana a milhares de compostos e a novas moléculas que estão sendo constantemente sintetizadas. Além disso, a maioria dos compostos que está no mercado não foi adequadamente testada quanto a seus efeitos sobre o sistema endócrino (WHO, 2012).

Recentemente, evidências indicam que muitas substâncias químicas comumente utilizadas pela população, incluindo componentes de cosméticos e de higiene pessoal ou mesmo ingredientes inertes e ativos de medicamentos podem atuar como desreguladores endócrinos, sugerindo que as pesquisas nessa área devem ser ampliadas para que os riscos de exposição humana e animal sejam adequadamente reconhecidos e avaliados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SISTEMA ENDÓCRINO

O sistema endócrino ou hormonal é um sistema de controle presente no organismo dos mamíferos que regula uma série de funções, como, por exemplo, o metabolismo, a homeostasia (pressão arterial, temperatura, pH e balanço eletrolítico), crescimento, maturação, desenvolvimento físico e mental, funções reprodutivas e sexuais, adaptação e respostas a estímulos ambientais. A sinalização hormonal representa um processo geral de sinalização entre as células e atua em conjunto com o sistema nervoso. Nesse contexto, a unidade hipotálamo-hipófise representa o principal local de integração entre os sistemas nervoso e endócrino, onde o hipotálamo controla a secreção hormonal da hipófise anterior e conseqüentemente de glândulas periféricas como tireoide, adrenal, glândulas mamárias e gônadas (SILBERNAGL E DESPOPOULOS, 2009; KRONENBERG et al., 2010).

Os hormônios podem atuar de forma parácrina (células adjacentes) ou autócrina (próprias células produtoras). Nas células-alvo os hormônios ligam-se a receptores específicos com alta afinidade e especificidade, desencadeando respostas biológicas de acordo com cada tipo celular/tecido. A resposta tecidual a um estímulo hormonal depende basicamente da densidade e do tipo de receptor, do tipo celular e da concentração hormonal. Os mecanismos de síntese e metabolismo dos hormônios envolvem diversas enzimas e vias sinalizadoras, como por exemplo, a esteroidogênese, via pela qual o colesterol é convertido em testosterona e estradiol por meio de inúmeras enzimas no córtex da adrenal, ovários e testículos (PEAVY, 2004).

Além dos seus efeitos sobre a manutenção da homeostase, o sistema endócrino tem um papel fundamental nos processos de diferenciação e crescimento celular e tecidual, especialmente em organismos imaturos. A sinalização endócrina em fases críticas do desenvolvimento é essencial para induzir e dar suporte à diferenciação de muitos tecidos e permitir uma responsividade adequada das células-alvo em períodos posteriores. Por exemplo, sabe-se que o contato inicial do hormônio com os seus receptores é capaz de influenciar de maneira permanente a taxa de expressão de receptores e a funcionalidade dos mecanismos de transdução de sinal nas células-alvo – “*imprinting* hormonal” (CSABA, 2017).

Em virtude de seus potentes efeitos, os níveis circulantes de hormônios são regulados dentro de uma faixa normal. Existem estratégias fisiológicas, envolvendo mecanismos diretos de retroalimentação, utilizadas para manter os níveis apropriados de hormônios. Entretanto, essa regulação normal pode ser perturbada pela ação de substâncias desreguladoras endócrinas, seja pela alteração na disponibilidade de hormônios ou por interações nos mecanismos de sinalização hormonal (PARKER E SCHIMMER, 2012).

Os desreguladores endócrinos, que incluem agentes químicos naturais e uma ampla variedade de substâncias químicas industriais sintéticas, podem mimetizar, bloquear ou interferir na síntese, conversão, liberação e transporte de hormônios endógenos. Contudo, o espectro e a gravidade dos efeitos induzidos por tais substâncias serão dependentes das doses, frequência, e também dos períodos de desenvolvimento em que as exposições ocorrem.

2.2 DESREGULADORES ENDÓCRINOS

De acordo com a definição proposta pela Organização Mundial da Saúde, os desreguladores endócrinos, também conhecidos como interferentes hormonais ou compostos endócrino-ativos, são “substâncias exógenas ou misturas de substâncias que alteram a função do sistema endócrino e que conseqüentemente podem causar efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, sua progênie ou subpopulações, interferindo na atividade hormonal normal” (WHO-IPCS, 2002).

Um dos mais graves problemas quando se trata de produtos químicos endócrino-ativos, é que eles podem afetar fetos e recém-nascidos de uma maneira mais pronunciada que os adultos, pois os tecidos em desenvolvimento se proliferam

e diferenciam de forma mais ativa e, assim, são normalmente mais sensíveis a essas substâncias (SAWAKI et al., 2003). Organismos imaturos apresentam ainda, menor capacidade metabólica e de eliminação de substâncias químicas, o que pode contribuir para aumentar a susceptibilidade desses organismos aos efeitos de xenobióticos, incluindo os desreguladores endócrinos. Essas substâncias têm sido alvo de um grande número de pesquisas e questionamentos quanto aos seus possíveis riscos à saúde humana. Na última década, têm se acumulado referências sobre disfunções do sistema reprodutivo e endócrino, como puberdade precoce, diminuição da quantidade e funcionalidade espermática, aumento da incidência de câncer testicular, mamário, endometrial e de próstata, além de malformações congênitas (SWAN, 2000; SWAN et al., 2007; PERETZ et al., 2014; LEVINE et al., 2017; SATHYANARAYANA et al., 2017).

A preocupação com substâncias capazes de interferir com o sistema endócrino é relativamente recente, embora já em 1962 a pesquisadora Rachel Carson, em seu livro “Primavera silenciosa”, tenha chamado a atenção do mundo para os possíveis efeitos de substâncias químicas sobre o desenvolvimento de animais de vida selvagem e a saúde humana. O livro traz em detalhes o impacto negativo do uso abusivo dos agrotóxicos organoclorados no meio ambiente, apontando efeitos hormonais dos inseticidas e impactos sobre a reprodução humana. No entanto, apenas anos depois isso chegou de fato às agências regulamentadoras para que os riscos de tais exposições fossem devidamente avaliados.

Assim como em diversas subáreas da toxicologia, o estudo dessas substâncias também foi impulsionado por um fato trágico: o caso do Dietilestilbestrol (DES). A evidência mais convincente dos efeitos de desregulação endócrina decorrentes de exposição pré-natal em seres humanos vem da experiência com esse fármaco, um composto sintético com potente ação estrogênica, cujo uso em gestantes foi aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) de 1947 a 1971 para prevenção de abortos espontâneos e partos prematuros. Nesse período, essa substância foi utilizada terapêuticamente por mais de 5 milhões de gestantes em diversos países. Posteriormente, foram evidenciados problemas reprodutivos em descendentes expostos durante a gestação, particularmente durante o primeiro trimestre (TOPPARI et al., 1996; DASTON et al., 1997; MARTINO-ANDRADE E SWAN, 2017). O impacto significativo foi o aumento da incidência de casos de

adrenocarcinoma vaginal em mulheres jovens que foram expostas *in utero* ao DES, além de anomalias uterinas e distúrbios de fertilidade. Associações entre o uso materno de DES e anormalidades reprodutivas também foram observadas nos descendentes masculinos e incluíram criptorquidismo (não descida dos testículos ao escroto), hipotrofia e induração capsular dos testículos e anormalidades espermáticas (HERBST et al., 1971; GILL et al., 1976; BEN-BARUCH et al., 1981; JENSEN et al., 1995; TOPPARI et al., 1996).

Na década de 1990, a hipótese de que algumas anormalidades no desenvolvimento de órgãos sexuais masculinos e problemas de fertilidade estavam relacionados com a exposição *in utero* a estrogênios, trouxe uma nova linha para estudos subsequentes (BREITHAUPT, 2004). Estudos apontaram que mudanças no estilo de vida e na alimentação poderiam estar relacionadas com a maior exposição humana a substâncias estrogênicas e com o aumento da incidência de desordens do trato reprodutor (SHARPE E SKAKKEBAEK, 1993; LATHERS, 2002). Mais recentemente, estudos demonstraram que muitos compostos químicos ambientais atuam como antiandrógenos, seja como antagonistas de receptores androgênicos ou como inibidores da síntese de testosterona. Dados experimentais e epidemiológicos demonstraram que a exposição a algumas dessas substâncias pode alterar o desenvolvimento reprodutivo masculino, particularmente durante o período pré-natal de diferenciação sexual (GRAY et al., 2001; GRAY et al., 2006; MARTINO-ANDRADE et al., 2009).

Em seguida, muitos trabalhos importantes foram realizados; por exemplo, vom Saal e colaboradores (1998) demonstraram que a exposição ao Bisfenol A, um componente de alguns tipos de plásticos utilizados em diversos produtos e embalagens de alimentos, reduziu a produção espermática e causou alterações na próstata em ratos, mesmo em doses baixas. Muitos anos depois essa substância foi retirada da composição de mamadeiras e embalagens de alimentos infantis devido às evidências de toxicidade do desenvolvimento em diversos países, incluindo o Brasil (ANVISA, 2011; EC, 2011).

Nas últimas duas décadas, a pesquisa sobre substâncias que podem perturbar o funcionamento normal do sistema endócrino aumentou significativamente. Houve um aumento no número de compostos identificados como desreguladores endócrinos, bem como muitos estudos acerca dos mecanismos envolvidos na ação dessas substâncias. Diversas substâncias químicas industriais,

como componentes de produtos plásticos, agrotóxicos, retardantes de chama (éteres difenílicos polibromados – PBDEs), aditivos de cosméticos e produtos de higiene pessoal, dentre outros, já foram caracterizados como desreguladores endócrinos. Contudo, apesar das evidências mais fortes de desregulação endócrina humana estarem ligadas a um produto farmacêutico (DES), apenas recentemente as pesquisas estiveram direcionadas para a possibilidade de efeitos de perturbação endócrina de produtos farmacêuticos de uso comum, incluindo antidepressivos, agentes hipolipidêmicos e analgésicos. Os analgésicos são de especial preocupação devido ao seu uso comum em todo o mundo, inclusive por gestantes (KRISTENSEN et al., 2011; MÜLLER et al., 2012; BEVERLY et al., 2014; MARTINO-ANDRADE E SWAN, 2017).

Quanto ao mecanismo de ação, as substâncias desreguladoras endócrinas podem agir diretamente sobre os receptores hormonais ou indiretamente interferindo na síntese, conversão, liberação ou transporte de hormônios (WHO, 2012). Também podem atuar por mecanismos moleculares e epigenéticos, influenciando na expressão gênica. Além disso, algumas substâncias apresentam efeitos sinérgicos ou aditivos com hormônios naturais (HAMPL et al., 2016). É importante ressaltar ainda, que muitos desreguladores endócrinos podem interagir com o sistema endócrino por meio de múltiplos mecanismos de ação e ocasionar uma ampla variedade de efeitos adversos, incluindo distúrbios reprodutivos, imunológicos, metabólicos e comportamentais (GRAY et al., 2006; SCHUG et al., 2011).

O comprometimento da função reprodutiva de seres humanos e de espécies animais tem sido motivo de especial preocupação nos últimos anos. Nesse contexto, a crescente exposição a desreguladores endócrinos nas últimas décadas tem sido apontada como um dos fatores envolvidos no possível declínio da saúde reprodutiva humana. Contudo, devido à preocupação relativamente recente com compostos desreguladores endócrinos, os dados epidemiológicos sobre seus riscos ainda são escassos e restritos. Grande parte dos efeitos adversos provenientes dos desreguladores endócrinos envolve a exposição *in utero* a tais substâncias, e muitos desses efeitos podem ser observados apenas na vida adulta do indivíduo exposto. Esse longo período entre a exposição e a observação dos efeitos tóxicos dificulta a avaliação dos mesmos e o estabelecimento de uma relação entre a causa e o efeito. Sendo assim, os estudos experimentais são 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 humana e para o meio ambiente.

2.3 ANALGÉSICOS E DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA

Os analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), apresentados na TABELA 1, estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados em todo o mundo pela população em geral, incluindo mulheres em idade fértil, no período gestacional e lactacional e, em sua maioria, são vendidos sem prescrição médica. São utilizados para o tratamento da dor aguda e crônica, e frequentemente para controlar a febre e condições inflamatórias (BLOOR E PAECH, 2013).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ANALGÉSICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINEs)

Classe	Fármacos
Salicilatos	ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS)
Derivado do p-aminofenol	acetaminofeno (paracetamol)
Derivados da 5-pirazolona	dipirona, antipirina, aminopirina
Derivados do ácido heteroariloacético	indometacina, etodolaco
Derivados do ácido fenilacético	diclofenaco de sódio e potássio
Derivados do ácido fenilpropiónico	ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno
Fenamatos	ácido mefenâmico, ácido flufenâmico
Oxicans	meloxicam, piroxicam
Outros AINES	nimesulida (similar aos coxibes)
Inibidores seletivos da COX-2	celecoxibe, etoricoxibe

FONTE: O autor (2015).

Os analgésicos 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), mediadores envolvidos no desenvolvimento da inflamação e da dor (BLOOR E PAECH, 2013).

Tanto na população em geral quanto em gestantes, o perfil das respostas terapêuticas e tóxicas exercidas pelos analgésicos é dependente das características farmacocinéticas e da seletividade da droga pelas duas principais isoformas da COX, COX-1 e COX-2. As respostas inflamatórias são principalmente mediadas por prostanoídes dependentes da expressão da COX-2, enquanto que a COX-1 é expressa na maioria das células para gerar prostanoídes que modulam numerosos processos fisiológicos, tais como a proteção gástrica, regulação do fluxo sanguíneo, função renal e função plaquetária (RICCIOTTI E FITZGERALD, 2011).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* indicam que o paracetamol e alguns outros analgésicos apresentam potencial para atuarem como desreguladores endócrinos antiandrogênicos (KRISTENSEN et al., 2011, 2012; DEAN et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; VAN DEN DRIESCHE et al., 2015; BEN MAAMAR et al., 2017). Tais efeitos são preocupantes, uma vez que, como mencionado anteriormente, 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 durante o período crítico de diferenciação sexual, o que corresponde a janela entre 8 a 14 semanas de gestação em seres humanos, pode levar ao desenvolvimento de criptorquidismo, hipospádias (abertura da uretra na face ventral do pênis), comprometimento da fertilidade e redução da distância anogenital (SWAN et al., 2005; WELSH et al., 2008; JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011, 2012; SNIJDER et al., 2012; LIND et al., 2013; FISHER et al., 2016; LIND et al., 2017).

Estudos em roedores demonstram que a exposição intrauterina ao paracetamol pode resultar em alterações genitais e comportamentais associadas com a deficiência de androgênios no período pré-natal, incluindo redução da distância anogenital em machos e masculinização cerebral prejudicada (KRISTENSEN et al., 2011; HOLM et al., 2015; HAY-SCHMIDT et al., 2017), efeitos que corroboram o possível efeito antiandrogênico desse fármaco. Além disso, estudos indicam que a produção de testosterona é inibida em testículos fetais de ratos, cultivados *ex vivo* e expostos a analgésicos como o paracetamol, ácido acetilsalicílico e indometacina (KRISTENSEN et al., 2011, 2012). Num estudo com testículos fetais humanos transplantados em camundongos castrados e imunossuprimidos, van den Driesche et al. (2015) demonstraram que a exposição

prolongada a doses terapêuticas de paracetamol pode reduzir a produção de testosterona e inibir o crescimento da vesícula seminal dos camundongos, indicando inibição da esteroidogênese testicular nos fragmentos de testículos fetais humanos transplantados. Em outro estudo mais recente, Ben Maamar et al. (2017) demonstraram que a produção de testosterona é significativamente reduzida em fragmentos de testículos fetais humanos (8-10 semanas de gestação) cultivados *ex vivo* após exposição prolongada a doses terapêuticas de ibuprofeno, além de supressão da produção do fator semelhante à insulina-3 (INSL-3), hormônio produzido pelas células de Leydig fetais e que está envolvido nos processos de descida do testículo ao escroto.

2.4 USO DE ANALGÉSICOS DURANTE A GESTAÇÃO

Praticamente todas as mulheres experimentam algum desconforto durante a gestação e estima-se que cerca de 25% delas apresentem ao menos sintomas temporários. Esses desconfortos podem interferir em suas atividades diárias, na capacidade de trabalho e, conseqüentemente, alterar sua qualidade de vida. Dessa maneira, é indispensável a adoção de medidas farmacológicas ou não farmacológicas para o alívio da dor (FIGUEIRÓ-FILHO et al., 2011). Assim como outros medicamentos, os analgésicos devem ser usados com cautela durante a gestação, observando-se criticamente a relação entre os benefícios terapêuticos e os riscos à saúde materna e fetal.

Estudos em diferentes países indicam alta incidência do uso desses medicamentos por mulheres no período gestacional. Um relatório recente desses estudos, com foco no uso dessa classe de medicamentos durante o início da gestação, indicou que 56% das mulheres nos Estados Unidos da América (EUA) usaram paracetamol em algum momento durante o primeiro trimestre da gestação, enquanto o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico foram usados por 24% e 5% dessas mulheres, respectivamente (THORPE et al., 2013). Uma publicação anterior indica que enquanto o uso do ácido acetilsalicílico diminuiu no final da década de 1970, o uso do paracetamol aumentou e permaneceu elevado. De 1981 a 2004, 60-70% das mulheres entrevistadas relataram tomar paracetamol em algum momento durante a gestação. Foi observado também um aumento no uso de outros analgésicos, como

o ibuprofeno e o naproxeno, a medida que se tornaram medicamentos de venda livre de prescrição médica (WERLER et al., 2005; THORPE et al., 2013).

Um outro estudo, realizado na Dinamarca, indicou o uso do paracetamol por 50,3% de 88.142 gestantes que foram entrevistadas para essa pesquisa (REBORDOSA et al., 2008). Sendo que uma outra publicação indicou que esses analgésicos são utilizados durante a gestação por 56,2% de 491 mulheres entrevistadas, também na Dinamarca. Nesse estudo, o paracetamol foi utilizado por 47,6% das participantes, enquanto o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico foram utilizados por 7,7% e 4,3%, respectivamente (KRISTENSEN et al., 2011). Uma outra pesquisa realizada em maternidades de hospitais universitários na França, indicou o uso de analgésicos por 81% de 895 mulheres durante o primeiro ou segundo trimestre de gestação (PHILIPPAT et al., 2011). Além disso, em todas essas pesquisas, algumas mulheres relataram o uso simultâneo de mais de um analgésico.

O uso de analgésicos normalmente não é indicado durante a gestação, uma vez que o seu uso está associado ao aumento do risco de aborto espontâneo no início da gestação 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, responsável pela conexão entre a artéria pulmonar e a aorta fetais, podendo comprometer a circulação fetal e causar hipertensão pulmonar em recém-nascidos. Outro efeito associado à inibição de prostaglandinas no feto é a redução do fluxo sanguíneo renal, que pode resultar em diminuição da saída de urina fetal e consequente diminuição da produção de líquido amniótico (oligoidrâmnio). 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 consequente inibição da ativação plaquetária, efeito mais relacionado ao uso de ácido acetilsalicílico (RATHMELL et al., 1997).

O paracetamol é aceito como o analgésico de primeira escolha para uso durante o período gestacional, por não ser um anti-inflamatório típico e não causar muitos dos problemas gestacionais causados pelos demais medicamentos dessa classe. Ainda que seja considerado mais seguro do que os demais analgésicos, o paracetamol não está livre de toxicidade e a sua utilização por gestantes tem levantado preocupações sobre seus possíveis efeitos adversos ao feto. Seu uso está relacionado a aborto espontâneo, nascimento prematuro, baixo peso ao nascer,

malformações fetais, problemas no trato respiratório (asma), distúrbios no neurodesenvolvimento (TDAH e autismo) e infertilidade masculina na prole (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).

Diante desse contexto, é importante ressaltar que além da auto-medicação, existe uma exposição não intencional que pode ocorrer por meio da ingestão direta dos resíduos desses fármacos em alimentos e na água. Atualmente, há uma crescente preocupação com a presença de diversas substâncias em ambientes aquáticos, seus possíveis impactos ambientais e sobre a saúde animal e humana. Vários pesquisadores, em todo o mundo, detectaram concentrações residuais de medicamentos, entre eles analgésicos e AINEs, em águas naturais e em efluentes de Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs). Após a administração, uma parte significativa dos fármacos e seus metabólitos é excretada por humanos no esgoto doméstico e hospitalar, além dos resíduos provenientes de indústrias farmacêuticas que são outra fonte de contaminação ambiental. No entanto, estudos indicam que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio ambiente e não são completamente removidas nas ETEs. Sendo assim, muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional de água (BUSER et al., 1999; STUMPF et al., 1999; TERNES et al., 1999; BILA E DEZOTTI, 2003; SANTOS et al., 2013; EBELE et al., 2016).

Dessa maneira, a exposição analgésica durante a gestação pode ocorrer sob diferentes formas, seja por meio do contato direto pelo uso do medicamento, ou indireto por meio da ingestão de água ou alimentos contaminados. Essa exposição concomitante é particularmente preocupante quando se pensa em desregulação endócrina, pois a interação entre essas substâncias, que podem agir por múltiplos mecanismos de ação, pode potencializar os efeitos de desregulação endócrina – sendo que algumas substâncias produzem efeitos tóxicos em baixas concentrações – e por consequência, afetar de maneira irreversível a saúde humana e animal como um todo, especialmente a saúde reprodutiva.

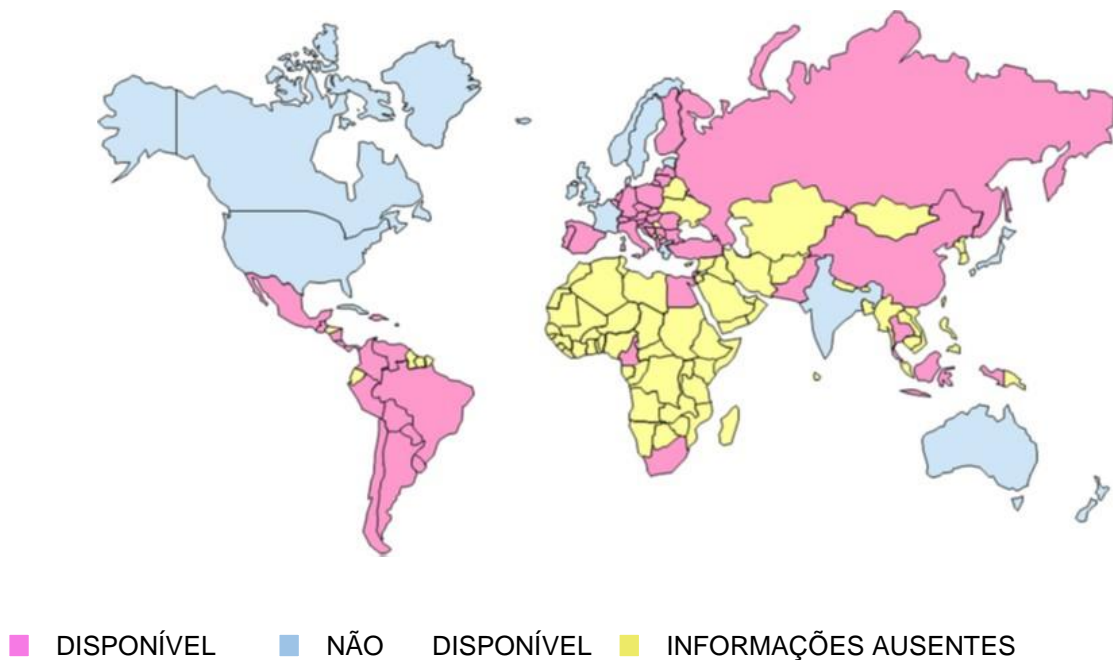
2.5 DIPIRONA

A dipirona, conhecida como metamizol ou metanossulfonato (1-fenil-2,3-dimetil-5-pirazolona-4-metilaminometanossulfônico), é um derivado pirazolônico, que

possui propriedades analgésicas e antipiréticas. 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 70 (CHETLEY, 1993). Apesar de a dipirona ser geralmente bem tolerada, foi retirada do mercado nos Estados Unidos e em alguns países europeus ou passou a ser utilizada com restrição devido a possíveis associações com discrasias sanguíneas como agranulocitose, uma desordem de início abrupto caracterizada por uma marcante redução da contagem de leucócitos, e anemia aplástica, caracterizada pela produção insuficiente de células sanguíneas na medula óssea (BAR-OZ et al., 2005; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009).

Diante dessas evidências, surgiram alguns estudos demonstrando que os riscos de agranulocitose na realidade são mínimos e comuns a todos os medicamentos pertencentes à essa classe. 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 e anemia aplástica. 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, não sendo verificada uma correlação entre o uso de dipirona e incidência de agranulocitose. 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 bastante 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).

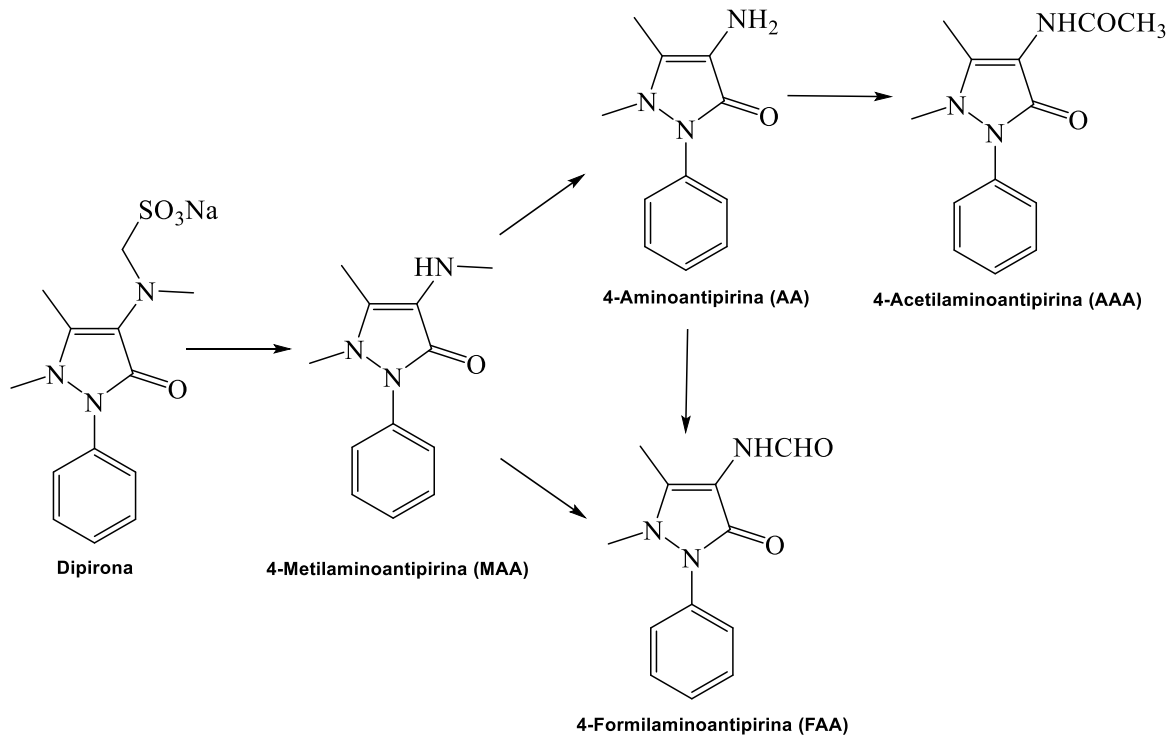
FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DOS PAÍSES ONDE A DAPIRONA ENCONTRA-SE DISPONÍVEL NO MERCADO



FONTE: STAMMSCHULTE et al., (2015).

A dipirona apresenta, de acordo com estudos realizados em voluntários humanos, quatro metabólitos conhecidos (LEVY et al., 1995). Após administração oral, é rapidamente hidrolisada no trato gastrointestinal para o 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) – sendo que os metabólitos MAA e AA são farmacologicamente ativos, responsáveis pelo efeito analgésico, enquanto que os metabólitos FAA e AAA possuem pouca atividade farmacológica (ANVISA, 2014; WEITHMANN E ALPERMANN, 1985).

FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA DIPIRONA



FONTE: O autor (2017).

Embora seu mecanismo de ação ainda não esteja completamente elucidado, acredita-se que provavelmente se dê por meio da inibição da enzima ciclooxigenase, inibindo a síntese de prostaglandinas tanto na periferia quanto no sistema nervoso central. No entanto, outros mecanismos de ação têm sido propostos, como a interação com o sistema endocanabinoide (ROGOSCH et al., 2012; CRUNFLI et al., 2015) ou então, a atuação por meio de um mecanismo de bloqueio direto da hiperalgesia inflamatória periférica, estimulando a via de arginina/GMPc nos neurônios sensoriais (LORENZETTI E 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, principalmente no Brasil, onde é um dos principais analgésicos utilizados pela população em geral (ANVISA, 2001; ARRAIS et al., 2016; FERREIRA E LOPES, 2016) por ser um medicamento isento de prescrição (MIP), de baixo custo e que está presente em diversas e diferentes formulações

farmacêuticas – soluções, comprimidos, injetáveis, supositórios (KNAPPMANN E MELO, 2010).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) realizou, em julho de 2001, um “Painel Internacional de Avaliação da Segurança da Dipirona” com objetivo de promover esclarecimentos sobre seus riscos. Formou-se 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 que os dados científicos disponíveis associando a ocorrência desses riscos não eram suficientes para indicar alteração de sua situação regulatória (venda sem prescrição médica). Por meio dessa avaliação, ficou claro que os riscos da dipirona eram similares ou menores que os do paracetamol e do ácido acetilsalicílico, respectivamente. Mesmo assim, a maior preocupação no Brasil ainda era a ocorrência de agranulocitose, uma reação rara, mas que 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 das reações durante seu uso, o tratamento deveria ser imediatamente interrompido e o médico consultado (ANVISA, 2001).

De acordo com dados dessa mesma publicação da ANVISA de 2001, 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%). Nesse período, existiam no país 125 produtos à base de dipirona, dos quais 71 em associação a outras substâncias, sendo que mais de 80% das vendas registradas foram feitas sem prescrição médica. Em um estudo recente sobre a prevalência da auto-medicação no Brasil, Arrais et al. (2016) demonstraram que os analgésicos foram os medicamentos mais utilizados, sendo a dipirona o mais consumido (15,4%), seguida de uma associação contendo dipirona, orfenadrina e cafeína (12,2%) e do paracetamol (11,4%). 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.

Estudos sobre o uso de medicamentos durante a gravidez indicam que a dipirona é o analgésico mais utilizado durante esse período na vida das mulheres,

além de relatar o uso desse fármaco por 5 a 11% das gestantes brasileiras. O fato da dipirona ter sido retirada do mercado em muitos países contribuiu para a escassez de evidências sobre a segurança desse medicamento durante a gestação (MENGUE et al., 2001; FONSECA et al., 2002; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009). Isso 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 antiandrogênicos.

Os metabólitos da dipirona atravessam facilmente a barreira placentária. Além disso, o uso da dipirona está 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 nos filhos de mulheres que tomaram dipirona durante a gestação, além de uma associação significativa entre a exposição pré-natal à dipirona e um risco aumentado de leucemia infantil (SHARPE E FRANCO, 1996; POMBO-DE-OLIVEIRA E KOIFMAN, 2006; ZANROSSO et al., 2010). Esses estudos devem ser 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 foi associada com uma baixa produção de líquido amniótico quando utilizada em altas doses no terceiro trimestre de gestação e com fechamento prematuro do canal arterial (BAR-OZ et al., 2005).

Em um outro estudo, realizado por Bar-Oz et al. (2005), não foi encontrada associação entre dipirona e anomalias congênitas, em uma comparação com paracetamol. Os dados sugeriram que a dipirona utilizada durante o primeiro trimestre de gestação não está associada com risco aumentado de malformações, sendo que algumas mulheres que fizeram uso da medicação não sabiam que estavam grávidas.

Recentemente foi publicado um estudo realizado na Alemanha por Dathe et al. (2017) que compararam os resultados da gestação de 446 mulheres expostas a dipirona no primeiro trimestre com um grupo controle selecionado aleatoriamente compreendendo 887 mulheres não expostas a dipirona. Os dados foram obtidos por meio de questionários aplicados durante o primeiro trimestre e dois meses após a data prevista de nascimento entre janeiro de 2000 e dezembro de 2015. Os resultados demonstraram que a taxa de defeitos congênitos maiores não foi

aumentada pelo uso da dipirona e as incidências cumulativas para abortos espontâneos não revelaram diferença significativa entre o grupo exposto à dipirona e o grupo controle. Assim, de acordo com os autores desse estudo, a exposição à dipirona no primeiro trimestre não parece suportar um risco teratogênico substancial.

Segundo a ANVISA (2014), 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 último trimestre. No entanto, muitas mulheres fazem uso desse medicamento sem recomendação ou orientação médica, em qualquer período da gestação, e na maioria das vezes, sem ter conhecimento dos possíveis riscos provenientes de sua utilização. Além disso, considerando que a dipirona é o principal analgésico utilizado pela população brasileira, é possível que muitas mulheres utilizem esse fármaco no início da gestação, quando ainda não sabem que estão grávidas. Esse uso inadvertido é preocupante do ponto de vista da desregulação endócrina, pois muitos dos processos de desenvolvimento pré-natal dependentes de hormônios, como a diferenciação sexual, ocorrem no início da gestação. Em consequência disso, mais estudos acerca dos riscos do uso da dipirona no período gestacional se fazem necessários.

2.6 TESTES TOXICOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DESREGULADORAS ENDÓCRINAS

Nas últimas duas décadas, houve um aumento da preocupação na comunidade científica em relação aos possíveis efeitos adversos causados aos seres humanos e animais pela exposição a substâncias químicas presentes no meio ambiente que têm o potencial de afetar o sistema endócrino. Para tanto, agências regulatórias internacionais passaram a estabelecer protocolos para os estudos de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento e, têm compilado métodos para triagem e desenvolvido estratégias para a avaliação de substâncias desreguladoras endócrinas.

A avaliação de desreguladores endócrinos é regulamentada por órgãos específicos que desenvolvem estratégias *in vitro* e *in vivo* para triagem e avaliação de substâncias que podem afetar o sistema endócrino. Pode-se destacar a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), que criou o programa de triagem

de desreguladores endócrinos (Endocrine Disruptor Screening Program – EDSP); a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), que criou guias de triagem para desreguladores endócrinos; e a Organização Mundial da Saúde (WHO), que apresenta relatórios periódicos do conhecimento científico atual sobre essas substâncias. O EDSP utiliza métodos validados para a triagem de substâncias químicas a fim de identificar potenciais desreguladores endócrinos, determinar efeitos adversos, dose-resposta, avaliar o risco e, finalmente, gerenciar o risco de acordo com as leis atuais. Esses ensaios permitem que a EPA identifique e caracterize a atividade endócrina de pesticidas, produtos químicos comerciais e contaminantes ambientais (US EPA, 2017).

Dentre os testes propostos por estas agências regulamentadoras para a identificação de desreguladores endócrinos 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 esses 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 no adulto, bem como nas gerações expostas durante todos os estágios de desenvolvimento, desde o útero, período de lactação, até a idade adulta (BAKER, 2001; KOLLE et al., 2012).

Tendo em vista o papel fundamental dos andrógenos na diferenciação e manutenção do sistema reprodutor, uma série de testes têm sido desenvolvidos para avaliar a interferência de xenobióticos sobre a produção e/ou ação de hormônios androgênicos. Esses ensaios incluem a avaliação da esteroidogênese *in vitro*, como o teste em células de adenocarcinoma humano da linhagem H295R, que avalia o efeito das substâncias teste na síntese de hormônios esteroides. Essas células são utilizadas devido à capacidade única das mesmas em expressar todas as enzimas necessárias para a esteroidogênese. As células são incubadas com a substância teste e, posteriormente, realizadas as dosagens hormonais a fim de avaliar inibição ou efeitos estimulatórios sobre as enzimas esteroidogênicas (OECD, 2011). De maneira similar, o teste de produção de testosterona testicular fetal *ex vivo*, é

utilizado para triagem de substâncias que podem interferir com a esteroidogênese testicular fetal. Para tanto, ratas prenhes são tratadas com as substâncias teste do 14^o ao 18^o dia de gestação, período que corresponde à janela de masculinização dependente de androgênios em ratos, e os testículos fetais incubados *ex vivo* por 3h para determinar a produção de testosterona. Esse ensaio é de curta duração, utiliza um número menor de animais que outros ensaios *in vivo* e, ao contrário dos testes *in vitro*, reflete de maneira mais adequada as interações complexas que ocorrem no organismo intacto (FURR et al., 2014).

Na avaliação *in vitro* de efeitos androgênicos e antiandrogênicos mediados por receptores, são utilizados ensaios celulares de transativação de genes repórter sob controle do receptor androgênico humano (hAR) em células de mamíferos ou leveduras. Um desses ensaios, o *Yeast Androgen Screen* (YAS), utiliza células de levedura que expressam o hAR que, por sua vez, controla a expressão da enzima β -galactosidase, cuja atividade pode ser medida em um ensaio colorimétrico. Assim, o YAS permite a detecção de agonistas ou antagonistas do receptor androgênico, quando as leveduras são incubadas *in vitro* com a substância teste isoladamente ou combinada com a dihidrotestosterona (potente agonista endógeno do receptor androgênico) (KOLLE et al., 2010). De maneira complementar, o teste de Hershberger é um bioensaio *in vivo* de curta duração utilizado para triagem de substâncias que podem apresentar atividade androgênica ou antiandrogênica. Esse ensaio consiste na ação trófica da substância teste sobre órgãos andrógeno-dependentes em ratos machos castrados (androgenicidade) e no bloqueio dos efeitos tróficos da testosterona sobre esses órgãos (antiandrogenicidade). Os órgãos analisados são glândula do pênis, próstata ventral, vesícula seminal, músculo levantador do ânus/bulbocavernoso e glândulas bulbouretrais (OECD, 2009).

Desse modo, a combinação de ensaios de atuação direta sobre receptores com testes que avaliam alterações indiretas na produção de hormônios contribui para uma avaliação estratégica e eficiente de desreguladores endócrinos. Como cada ensaio tem suas vantagens e limitações (custo, tempo, sensibilidade), essa estratégia é essencial para identificar substâncias químicas desreguladoras endócrinas que podem atuar por meio de múltiplas interações com o sistema endócrino.

3 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos indicam que a exposição pré-natal a desreguladores endócrinos, incluindo alguns analgésicos de uso comum, pode levar a sérias desordens reprodutivas.

A dipirona é o principal analgésico utilizado no Brasil, seguida do paracetamol. Embora seja esse último o analgésico mais indicado na gestação, alguns estudos demonstram ampla utilização de dipirona nesse período. Contudo, não existem estudos acerca dos seus possíveis efeitos desreguladores endócrinos. O fato da dipirona ter sido retirada ou ser utilizada com restrições em muitos países em virtude de sua associação com agranulocitose e anemia aplástica, contribuiu para a escassez de evidências sobre a segurança desse medicamento durante a gestação (MENGUE et al., 2001; FONSECA et al., 2002; DA SILVA DAL PIZZOL et al., 2009).

Ao mesmo tempo que o uso da dipirona não é recomendado durante a gestação, a menos que o benefício justifique o risco, ainda há um risco para a exposição inadvertida. Portanto, tendo em vista a susceptibilidade de organismos imaturos a perturbações endócrinas e a possibilidade de exposição pré-natal à dipirona, a investigação dos possíveis efeitos desreguladores endócrinos desse fármaco é fundamental para identificar e caracterizar riscos à saúde reprodutiva humana.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da dipirona e seus principais metabólitos, 4-Metilaminoantipirina (MAA) e 4-Aminoantipirina (AA), na esteroidogênese e nas atividades androgênicas e antiandrogênicas mediadas por receptores *in vitro* e *in vivo* por meio de diferentes ensaios que contemplam mecanismos de ação relevantes para a indução de distúrbios reprodutivos e do desenvolvimento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar os efeitos desreguladores endócrinos da dipirona e seus metabólitos, MAA e AA, por meio dos seguintes ensaios:

- Teste de produção de testosterona testicular fetal *ex vivo*.
- Teste de esteroidogênese *in vitro*, que utiliza células H295R de adenocarcinoma humano.
- Teste de Hershberger, que avalia a atividade androgênica e antiandrogênica *in vivo*.
- Teste da atividade androgênica e antiandrogênica mediada por receptores *in vitro* por meio da ativação de genes reporter – *Yeast Androgen Screen* – YAS.

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Assessment of the analgesic dipyron as a possible (anti)androgenic endocrine disruptor

Marcella Tapias Passoni¹, Maja Nørgaard Kristensen², Rosana Nogueira de Moraes³, Claudia Woitkowiak⁴, Ana Claudia Boareto¹, Bruna Andreotti da Silva Amaral³, Nicole Grechi¹, Paulo Roberto Dalsenter¹, Cecilie Hurup Munkboel², Bjarne Styrishave², David Møbjerg Kristensen², Caroline Gomes⁴, Bennard van Ravenzwaay⁴, Anderson Joel Martino-Andrade^{1,3}

¹Department of Pharmacology, Reproductive Toxicology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

²Department of Pharmacy, Toxicology Laboratory, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Universitetsparken 2, DK-2100 Copenhagen, Denmark

³Department of Physiology, Animal Endocrine and Reproductive Physiology Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR, Brazil

⁴BASF SE Experimental Toxicology and Ecology, Ludwigshafen, Germany

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

Mild analgesics are among the most used pharmaceuticals worldwide and have recently been associated with antiandrogenic effects. Regardless of the high prevalence of dipyron use in many countries, the potential antiandrogenic effects of this analgesic have not yet been investigated. Here we examined the production of steroid hormones in human H295R cell line after exposure to dipyron and two metabolites, 4-Methylaminoantipyrine (MAA) and 4-Aminoantipyrine (AA), as well as fetal testicular testosterone production in rats following maternal dipyron exposure. Androgen agonistic/antagonistic effects were examined *in vitro* for dipyron and its two metabolites in a yeast-based transcriptional activation reporter gene assay (Yeast Androgen Screen – YAS), and *in vivo* for dipyron through the Hershberger assay. *In vitro* we tested a wide range of concentrations of dipyron, MAA, and AA (0.1-1000 μ M) while in the *in vivo* assays we used three human relevant dipyron doses (50, 100, 200 mg/kg/day). In the H295R steroidogenesis assay, dipyron, MAA and AA reduced the production of androgens and corticosteroids. Testosterone was reduced at concentrations 4-13 times higher than the maximum plasma concentrations reported in humans for MAA and AA. However, no effects were observed in the fetal testicular testosterone production assay at any dose. In the YAS and Hershberger assays no androgen agonistic/antagonistic activities were observed. Taken together, these results indicate that dipyron and its metabolites do not interact with the androgen receptor, but have the potential to inhibit steroidogenesis, however only at concentrations that are not relevant under normal medical use.

Keywords: Metamizole, H295R steroidogenesis assay, fetal rat testosterone production, yeast androgen screen, Hershberger assay.

5.1 INTRODUCTION

Mild analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most widely used drugs worldwide and usually available as non-prescription (over-the-counter) drugs. They are used in the management of pain and often to control fever and inflammatory conditions. In addition to the widespread use by the general population, some studies indicate a high prevalence of analgesic use by pregnant women, and sometimes, simultaneous use of more than one analgesic (Kristensen et al. 2011; Rathmell et al. 1997; Thorpe et al. 2013). Recent *in vivo* and *in vitro* studies indicate that paracetamol and some other analgesics have the potential to act as antiandrogens by inhibiting testosterone production, which may result in adverse reproductive and developmental effects (Ben Maamar et al. 2017; Kristensen et al. 2011, 2012, 2016; Van Den Driesche et al. 2015). Testosterone production is inhibited in fetal rat testes cultured *ex vivo* and exposed to analgesics such as paracetamol, acetylsalicylic acid and indomethacin (Kristensen et al. 2011, 2012). Developmental rodent studies indicate that paracetamol exposure may result in genital and behavioral changes associated with disruption of prenatal androgen action, including reduced anogenital distance and impaired brain masculinization (Hay-Schmidt et al. 2017; Holm et al. 2015; Kristensen et al. 2011). Experimental data also indicate that besides androgen suppression by the rat fetal testis, commonly used analgesics can inhibit steroidogenesis in other model systems, including *ex vivo* culture systems of adult and fetal human testis and human adrenocarcinoma H295R cell line (Ben Maamar et al. 2017; Mazaud-Guittot et al. 2013; Tinwell et al. 2013; Van den Driesche et al. 2015). In addition, a number of human epidemiological studies have reported on associations between prenatal use of analgesics and reproductive abnormalities in male newborns, particularly cryptorchidism (Fisher et al. 2016; Jensen et al. 2010; Kristensen et al. 2011; Lind et al. 2013; Lind et al. 2017; Snijder et al. 2012).

Dipyrone (metamizole) is a pirazolone derivative, which has analgesic and antipyretic properties, but limited anti-inflammatory effects. Following oral administration, dipyrone is rapidly converted into several active metabolites, including 4-Methylaminoantipyrine (MAA) and 4-Aminoantipyrine (AA). Its analgesic mode of action is not completely understood, but it may be credited to several different effects of its active metabolites, including cyclooxygenase (COX) inhibition and activation of

the endocannabinoid system (Crunfli et al. 2015; Rogosch et al. 2012). Although dipyrone is generally well tolerated, it was withdrawn from the market in the United States and some European countries due to possible associations with agranulocytosis, aplastic anemia, neutropenia, and other blood dyscrasias. However, it continues to be widely used in some countries of Europe, South America, Asia and Africa often as a nonprescription drug (Arrais et al. 2016; Bar-Oz et al. 2005; da Silva Dal Pizzol et al. 2009; Ferreira and Lopes, 2016; Hoffmann et al. 2015; Pizzol et al. 2016). Dipyrone is generally not recommended during pregnancy, but reports indicate that it is frequently used in e.g. South American countries like Brazil (da Silva Dal Pizzol et al. 2009). In addition, due to the high prevalence of dipyrone use in the general population in many countries, pregnant women that are unaware of their pregnancy status may unwittingly use dipyrone in the first weeks of pregnancy, a critical time window for reproductive androgen-dependent development.

In this study, we combined a set of *in vitro* and *in vivo* test systems to examine the effects of dipyrone on steroidogenesis and receptor-mediated androgenic and antiandrogenic activities. For assessment of dipyrone effects on steroidogenesis, we measured the production of steroid hormones in human adrenocarcinoma H295R cell line and fetal testicular testosterone production in rats following intrauterine exposure. Androgen agonistic and antagonistic effects of dipyrone were examined *in vitro* using a yeast-based transcriptional activation reporter gene assay (Yeast Androgen Screen – YAS), as well as *in vivo* through the Hershberger assay, using androgen-dependent tissues as biomarkers of androgenic action in castrated rats.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Animals

All experimental protocols were approved by the Committee on Animal Research and Ethics of the Federal University of Paraná (Consent Number 981) which is in accordance with national and international guidelines of animal welfare. Wistar rats were obtained from Federal University of Paraná (UFPR), and maintained under a 12 h light/dark cycle and controlled humidity and temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) at the Reproductive Toxicology Laboratory (UFPR). Standard pellet food (Nuvital, Colombo, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. The animals were housed in

collective polypropylene cages (414 mm × 344 mm × 168 mm), four animals per cage, and acclimatized for one week before beginning the experiments. The animals were weighed, ranked by weight, and randomly assigned to each experimental group.

5.2.2 Chemicals

For *in vivo* studies, sodium dipyrone (CAS 5907-38-0) was supplied by Shandong Xinhua Pharmaceutical (Zibo, China). Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, CAS 117-81-7), flutamide (CAS 13311-84-7), canola oil, and testosterone propionate (CAS 57-85-2) were obtained from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). For the castration procedures of the Hershberger assay we used ketamine from Vetrnil (Louveira, Brazil), xylazine from Agro Veterinária (São Paulo, Brazil), ketoprofen from Vencofarma (Londrina, Brazil), and an association of procaine benzyl penicillin, dihydrostreptomycin sulfate and piroxicam from Calbos (São José dos Pinhais, Brazil). For sedation induction before euthanasia, we used sevoflurane from Instituto Biochimico (Rio de Janeiro, Brazil).

For the steroidogenesis assay we used dipyrone monohydrate (CAS 5907-38-0), 4-Methylaminoantipyrine hydrochloride (MAA, CAS 856307-27-2) and 4-Aminoantipyrine (AA, CAS 83-07-8) from Campro Scientific (Berlin, Germany).

For the Yeast Androgen Screen (YAS) we used dipyrone (CAS 5907-38-0), 4-Aminoantipyrine (AA, CAS 83-07-8), dihydrotestosterone (DHT, CAS 521-18-6) and hydroxyflutamide (CAS 52806-53-8) from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany) and 4-Methylaminoantipyrine (MAA, CAS 519-98-2) from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Texas, USA).

Dimethyl sulfoxide (DMSO) used in all *in vitro* experiments was from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). Dipyrone, MAA and AA used in all experimental procedures had purities ≥ 95%.

5.2.3 Selection of drug concentrations and doses

In the *in vitro* studies, we used dipyrone and its two major metabolites, MAA and AA. The tested concentrations were based on the reported maximum plasma concentrations of dipyrone metabolites in humans following oral administration of three daily dipyrone doses of 1 g for seven days (Levy et al. 1995). Following this

administration scheme, maximum plasma concentrations (C_{max}) of MAA and AA were 75.9 and 24.1 μM , respectively. Parent dipyrone is not detected in plasma because of the rapid biotransformation. Thus, a wide range of concentrations below and above the C_{max} of MAA and AA reported by Levy et al. (1995) was tested in our *in vitro* systems. In the steroidogenesis assay we tested seven concentrations of dipyrone and MAA (0, 0.314, 3.14, 10, 31.4, 100, 314, 1000 μM) and AA (0, 0.314, 3.14, 10, 31.4, 100, 314, 800 μM). In the YAS, we tested six concentrations of dipyrone and AA (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) and MAA (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 μM). In the YAS assay we tested somewhat lower concentrations of dipyrone and its metabolites because, in contrast to the H295R assay, a protein-free medium was used. According to Levy et al. (1995) the protein unbound fractions of MAA and AA in human plasma are approximately 42% and 52%, respectively.

For the *in vivo* tests, three doses of dipyrone were used (50, 100, and 200 mg/kg/day) based on therapeutic use in humans (maximum daily dose = 4 g) and developmental reproductive toxicology data, particularly maternal and fetal toxicity. Based on the maximum human therapeutic dipyrone dose for a 70 kg adult (57 mg/kg/day) we calculated the estimated therapeutic dose for rats using allometric scaling as 223 mg/kg/day (ANVISA, 2014; Nevill, 1994). For calculations, rat body weight was set at 0.3 kg and exponent scaling at 0.75. Because dipyrone maternal and fetal toxicity has been reported to occur at doses ranging from 100 to 400 mg/kg/day (EMEA, 2003), we decided to test dose levels below 200 mg/kg/day. The selected doses were administered by oral gavage after dissolving dipyrone salt in distilled water at a volume of administration of 5 ml/kg.

5.2.4 H295 steroidogenesis assay

The *in vitro* steroidogenesis assay is based on a human adrenocarcinoma cell line (NCI-H295R cells) used to evaluate the effects of dipyrone and its two main metabolites, MAA and AA, on steroidogenesis. The cell line was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, #CRL-2128, Manassas, VA, USA).

The assay was conducted in accordance with the OECD guideline (2011) at the Toxicology Laboratory, University of Copenhagen. Steroid extraction was performed as described previously by Nielsen et al. (2012) and Hansen et al. (2017) and the subsequent quantification of steroid hormones was performed according to

Weisser et al. (2016). Briefly, the cells were grown in 75 cm³ flasks with DMEM/F12 growth media with 1% ITS+ premix and 2.5% Nu-serum at 37°C with 5% CO₂. All assays were conducted between passages 4-12 (OECD, 2011). The culture was trypsinized for plating when it reached a confluency of approximately 90%. Cells were diluted in growth media and seeded in 24 well plates at a concentration of 3x10⁵ cells/mL (1 mL/well). Dipyrone, MAA, and AA were serially diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO 0.2%) to achieve the testing concentrations ranging from 0.314 to 1000 µM. Each compound was tested in triplicate on two different days, giving a total of 6 replicates. Furthermore, DMSO 0.2% (n = 6) was included as a solvent control to measure background steroid production.

Following 48 h incubation, 950 µL cell medium were collected from each sample and 5 ng (50 µL of a 0.1 µg/mL) internal standard (IS) was added. The IS contained the following deuterated standards: d7-androstenedione (ANd7), d8-corticosterone (COSd8), d8-11-deoxycorticosterone (11-deoxyCOSd8), d9-progesterone (PROGd9), d3-testosterone (TSd3), d3-dihydrotestosterone (DHTd3), d7-aldosterone (ALDOd7), d4-cortisol (CORd4), d5-11-deoxycortisol (11-deoxyCORd5) and d6-dehydroepiandrosterone (DHEAd6). A panel of androgens, progestagens, corticosteroids was analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) as previously described by Weisser et al. (2016). The LC-MS/MS equipment consisted of a binary 1290 Agilent infinity series system combined with a binary 1100 Agilent HPLC series pump, which was used for both on-line cleanup and separation of steroids.

Cell viability was assessed by the Alamar blue test, which measures the ability of viable cells to convert resazurin into the fluorescent compound resorufin (O'Brien et al. 2000). Following the 48 h incubation with test compounds for assessment of steroid production, resazurin was added to the wells and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3 h. The fluorescence of resorufin was measured using 560 nm excitation/590 nm emission wavelengths. Cells with viability below 80% of the vehicle control were excluded from analyses.

5.2.5 *Ex vivo* fetal testicular testosterone production

We used the *ex vivo* testosterone production protocol proposed by Furr et al. (2014). Adult females (90 days) were mated with adult male rats for 3 h during the

dark phase of the light cycle. The day of sperm detection was considered as gestation day zero (GD 0). The animals were separated into five experimental groups (9-11 dams per group). Dams were treated daily by oral gavage from GD 14 to GD 18. DEHP (positive control) was dissolved in canola oil and administered at 750 mg/kg/day, a dose known to inhibit testosterone production by the rat fetal testis. The negative control group was treated with distilled water and test groups were administered dipyrone at 50, 100 or 200 mg/kg/day.

Approximately 1–3 h after the last treatment on GD 18, rat dams were euthanized by sevoflurane inhalation in a closed chamber followed by decapitation. The uterus was removed and the number of fetuses (live and dead) and resorptions were counted and recorded. The fetuses were immediately removed from the uterus, euthanized by decapitation and testes were collected using a dissecting microscope (Olympus BX41TF, Japan). The left testes from the first three males identified in each litter were immediately transferred to a 12-well plate containing 0.5 ml M199 media (Vitrocell, Campinas, Brazil) without phenol red (1 testis per well) and incubated with gentle rocking for 3 h at 37°C. After incubation, medium was collected and centrifuged for 10 min at 4°C and 2000 g and the supernatant was stored at -20°C until analysis. Testosterone was quantified by enzyme immunoassay, using polyclonal anti-testosterone antibody (R156/7; 1:7500 dilution) and the respective horseradish peroxidase-testosterone conjugate obtained from Coralie Munro at the University of California (Davis, CA, USA), and according to the procedures described by Brown et al. (2004). 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 (BioTek, Winooski, USA). The results were expressed as ng/testis/3h and the assay sensitivity was 2.3 pg/well. All samples were evaluated in duplicate, and intra and inter-assay coefficients of variation were less than 10%.

5.2.6 Yeast androgen screen – YAS

The YAS assay was performed as described by Sohoni and Sumpter (1998) with slight modifications (Kolle et al. 2010) at the Experimental Toxicology and Ecology Department, BASF. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) stably transformed

with the human androgen receptor (hAR) gene and expression plasmids carrying androgen-responsive sequences and the reporter gene lac-Z was obtained from Professor Vollmer of the Technical University Dresden. Dihydrotestosterone served as androgen agonistic control and hydroxyflutamide in the presence of dihydrotestosterone was used as androgen antagonistic control (Kolle et al. 2010).

Dipyron, MAA, and AA were serially diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and transferred to a 96-well microplate, resulting in final concentrations ranging from 0.1 to 100 μ M, in the presence or absence of 5 nM dihydrotestosterone (DHT). To each well we added 200 μ L of medium containing the recombinant yeasts and the chromogenic substrate, chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG). The plates were incubated for about 48 hours and the color change was assessed by the absorbance at 570 nM. All substances were plated in quadruplicate and the median for each concentration was calculated. The final results represent values from two independent experiments with different yeast cell pre-cultures and fresh substance solutions. The vehicle DMSO (1%) was used as a negative control. In the YAS, a test chemical was considered an androgen agonist if the β -galactosidase activity was increased concentration dependently by more than 10%. A test chemical was determined to be an androgen antagonist if the β -galactosidase activity was decreased concentration dependently at least 10% when the test chemical is tested together with DHT. In addition, to assess yeast toxicity we measured optical density at 690 nM as an indicator of yeast growth. A decrease of at least 50% in relation to control was used as an indicator of toxicity.

5.2.7 Hershberguer assay

Male pubertal rats, aged 49 days, were castrated via midline scrotal incision under anesthesia (ketamine 75 mg/kg and xylazine 1.5 mg/kg; intraperitoneal) (Andrade et al. 2002; OECD, 2009). After surgery, animals received subcutaneously ketoprofen (2 mg/kg) and an association of procaine benzyl penicillin (20,000,000 IU), dihydrostreptomycin sulfate (8 g) and piroxicam (0.60 g) at 1 ml/kg. After a seven day recovery period, the animals were separated into seven experimental groups (12 animals per group) to investigate the possible (anti)androgenic activity of dipyron. The castrated male rats were treated daily for 10 consecutive days with different substances. A group of animals was treated orally with distilled water and

subcutaneously with testosterone propionate to serve as the positive control for androgenicity. The negative control, received distilled water by oral route and canola oil subcutaneously. Flutamide, used as positive control for antiandrogenicity, was dissolved in distilled water and administered by gavage at 5 mg/kg/day to testosterone-treated rats. Dipyrone (50, 100, and 200 mg/kg) administered orally to testosterone-treated rats was used for the evaluation of antiandrogenicity, while a separate group received oral dipyrone at 200 mg/kg and canola oil by subcutaneous route for the evaluation of androgenic activity. Dipyrone was administered by oral gavage after dilution in distilled water. Testosterone propionate was dissolved in canola oil and administered subcutaneously at a dose of 0.25 mg/kg/day. Testosterone and flutamide doses were based on our previous studies (Fernandes et al. 2015; Müller et al. 2012). The volumes of administration were 5.0 ml/kg for oral route and 1.0 ml/kg for subcutaneous administration.

Twenty-four hours after the last treatment, the animals were weighed and euthanized by sevoflurane inhalation in a closed chamber followed by decapitation. The glans penis, ventral prostate (without the prostatic capsule), seminal vesicle (with and without fluid), levator ani muscle/bulbocavernosus muscle (LABC), and bulbourethral glands were removed and carefully dissected to remove the surrounding connective tissue. Absolute and relative (weight \times 100/body weight) organ weights were recorded.

5.2.8 Statistical analyses

The statistical analyses were performed using Graph-Pad Prism software version 6.0 (Graph-Pad, San Diego, CA, USA). Normality and homogeneity of variances were evaluated prior to statistical analysis. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between groups were tested by Tukey's multiple comparisons test. In the fetal testosterone production assay, litters were used as statistical units. Differences were considered statistically significant at a probability level of 5% ($p \leq 0.05$). For assessment of receptor mediated androgenic/antiandrogenic activities in the YAS assay, we used predefined cut-off values of β -galactosidase activity changes as described above. All results are presented as mean \pm standard error of mean (SEM) or standard deviation (SD),

except for YAS data, which are presented as median \pm maximum and minimum values.

5.3 RESULTS

5.3.1 H295 steroidogenesis assay

The effects of dipyrone and its two main metabolites, MAA and AA, on H295R steroidogenesis are shown in Fig. 1. No cytotoxic effects were observed following exposure to these drugs, except for dipyrone at 1000 μ M during the second run ($n = 3$). Overall, dipyrone, MAA, and AA significantly reduced the concentrations of all three androgens (DHEA, androstenedione and testosterone) and of all measured corticosteroids (except for cortisone following dipyrone exposure). Testosterone concentrations were significantly reduced at the two highest concentrations of MAA (314 and 1000 μ M) and AA (314 and 800 μ M), and at the three highest dipyrone concentrations (100, 314, and 1000 μ M). In addition, progesterone and 17OH-progesterone were significantly increased. The effect of AA on 17OH-progesterone concentrations was particularly evident, with an increase of up to 250%. On the other hand, AA reduced the concentrations of pregnenolone and 17OH-pregnenolone. Changes in the product to substrate ratios for the three major CYP enzymes in the H295R steroidogenesis are shown in Fig. 2. In this plot, a ratio lower than 1 indicates inhibition of the steroidogenic reaction, whereas a ratio higher than 1 is suggestive of stimulatory effects. All three tested compounds had inhibitory effects on CYP21, which catalyzes the conversion of progestagens into glucocorticoids, and on the lyase reaction of CYP17, which is responsible for the formation of androgens from hydroxyprogestagens. From all three tested compounds, AA seemed to be the most potent chemical in reducing the activities of CYP21 and CYP17-lyase. Also, the hydroxylase activity of CYP17 seemed increased, which may be a consequence of 17OH-progesterone accumulation, as a result of CYP21 and CYP17-lyase inhibition, rather than a true stimulatory enzymatic effect.

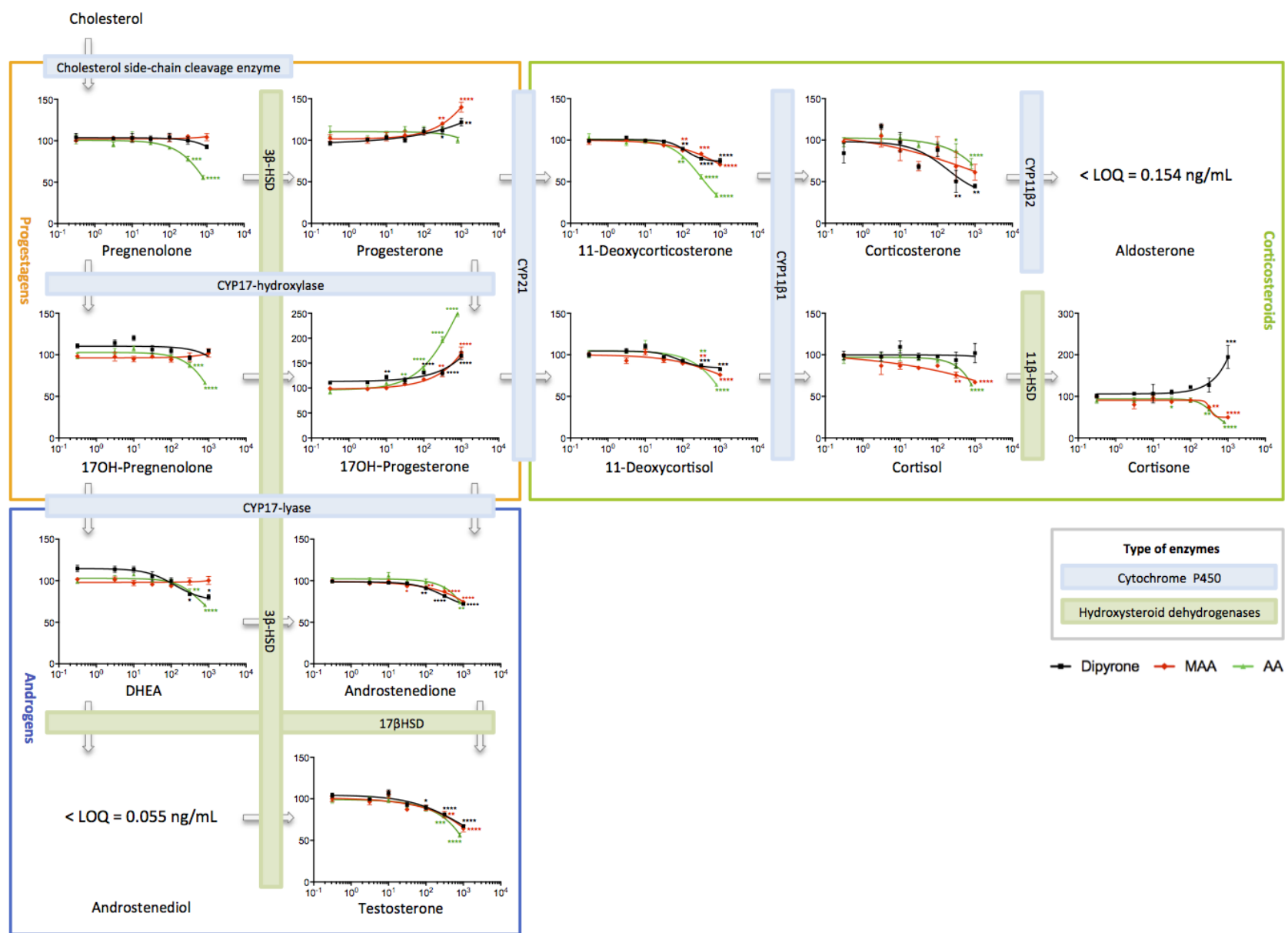


Fig. 1. Effects of dipyrone, MAA and AA on the H295R steroidogenesis (μM). Data are presented as steroid concentrations relative to the solvent controls (=100%) as function of increasing drug concentrations. Error bars are standard error of mean (SEM; $n = 6$). Significant values are marked with asterisks, * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$), **** ($p \leq 0.0001$). The enzymes (CYPs and HSDs) are presented in boxes. CYP17: 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, 3 β -HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 β -HSD: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, CYP21: 21-hydroxylase, CYP11 β 1/2: 11 β -hydroxylase, 11 β -HSD: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. LOQ: limit of quantification.

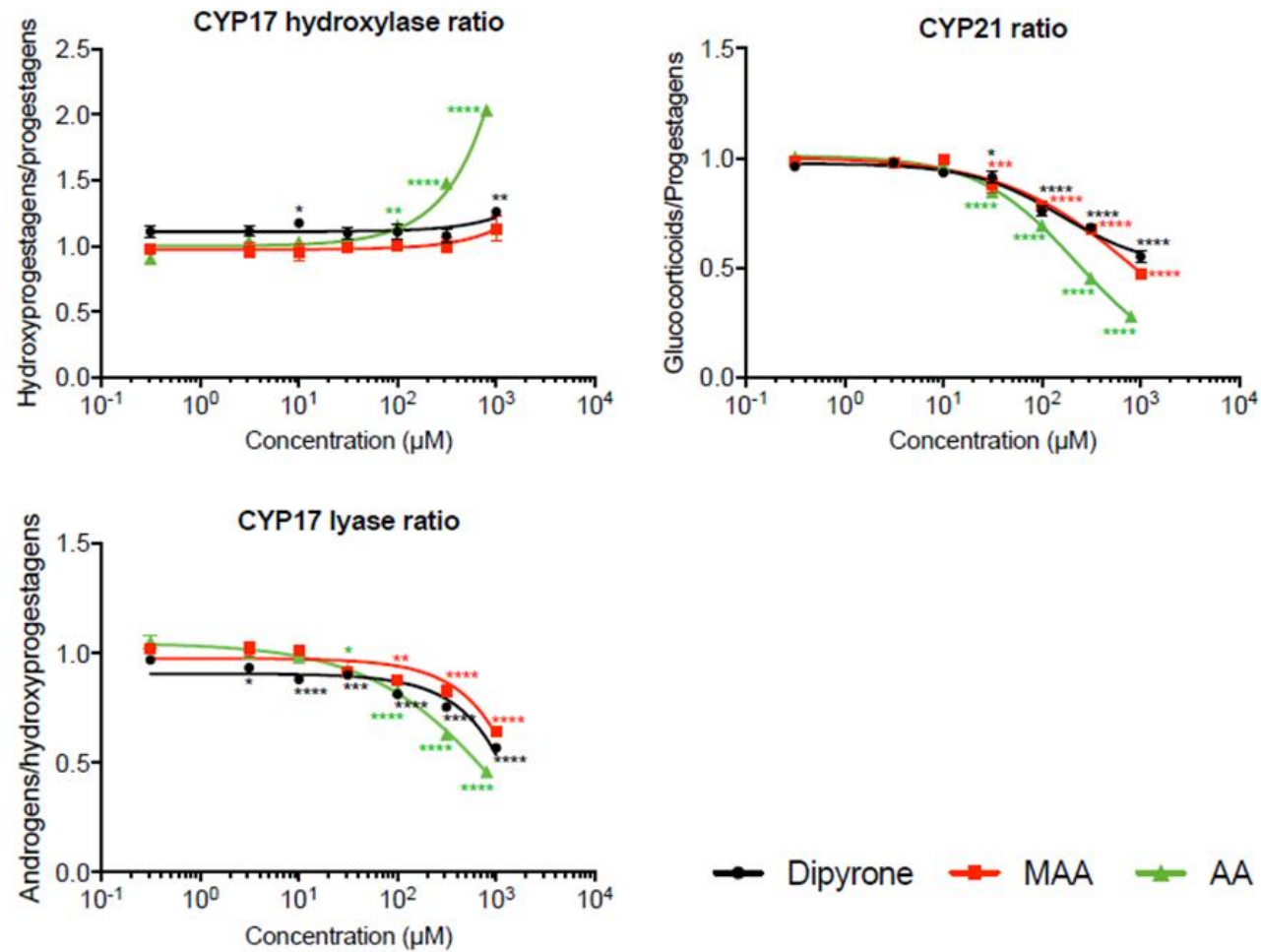


Fig. 2. Product/substrate ratios relative to solvent controls for the three enzymatic reactions CYP17-hydroxylase, CYP17-lyase and CYP21 when H295R cells were exposed to increasing concentrations of dipyrone, MAA and AA. Significant values are marked with asterisks, * ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.001$), **** ($p \leq 0.0001$). Error bars are SEM ($n = 6$).

5.3.2 *Ex vivo* fetal testicular testosterone production

Results of fetal rat testicular testosterone production following *in utero* exposure to dipyrone or DEHP are shown in Fig 3. Three male fetuses per litter (n = 9-10 litters/group) were used, except for litters that had less than three males (two controls, two dipyrone 50 mg/kg/day, one dipyrone 100 mg/kg/day, four dipyrone 200 mg/kg/day and one DEHP). One litter from the control group was comprised of females only. Intrauterine dipyrone exposure did not produce reductions in testosterone production at any dose level tested. In contrast, DEHP, used as positive control at 750 mg/kg/day, significantly reduced testosterone output by approximately 85% in relation to control. Pregnancy outcomes, including maternal weight gain, litter size, fetal weight and fetal viability are shown in Supplementary Table 1. These parameters were not statistically different between experimental groups.

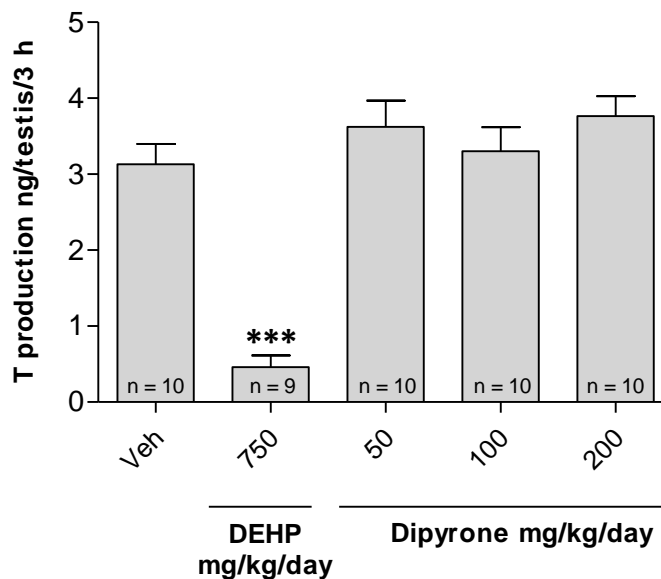


Fig. 3. Effects of dipyrone on fetal rat testis testosterone production following *in utero* exposure from gestation day 14-18. On gestation day 18, testes from three fetuses per litter were incubated for 3 h at 37°C. The plasticizer DEHP was used as positive control. The columns represent litter means \pm SEM of testosterone production (ng/testis/3 h). *** p < 0.001 (ANOVA; Tukey). Veh = vehicle control treated with distilled water.

Supplementary Table 1. Pregnancy outcomes in rat dams exposed to dipyrone 50, 100, 200 mg/kg/day and DEHP 750 mg/kg/day from gestation days 14 to 18.

Parameters	Experimental groups				
	Vehicle	DEHP	D50	D100	D200
Number of dams	11	9	10	10	10
Litter size	7.55±3.14	9.11±2.47	8.20±2.39	9.60±1.84	8.60±2.59
Body weight gain (GD 0-18)	60.3±17.2	64.1±10.5	64.8±14.9	67.8±8.5	61.3±10.4
Body weight gain (GD 14-18)	20.0±11.8	21.9±9.4	22.2±8.6	24.1±7.2	16.8±10.5
Fetal weight	1.42±0.12	1.43±0.07	1.36±0.10	1.31±0.06	1.35±0.11
% live fetuses	81.0±25.5	94.1±7.9	90.3±11.5	99.2±2.4	90.9±13.2

All data are shown as litter means ± SD.

GD: gestation day; D: Dipyrone (50, 100 or 200 mg/kg/day).

5.3.3 Yeast androgen screen – YAS

DHT induced an expected concentration-response increase in androgen dependent β -galactosidase activity, whereas hydroxyflutamide inhibited DHT-induced activity (Fig. 4A). There was no evidence of androgenic or antiandrogenic activity of dipyrone, MAA or AA in the YAS system (Fig. 4B-D). When tested alone these compounds were unable to elicit responses above the level of solvent control. In addition, no significant reductions in androgenic response were observed when test compounds were incubated with DHT (Fig. 4B-D). Cytotoxicity was not observed in any of the experimental runs.

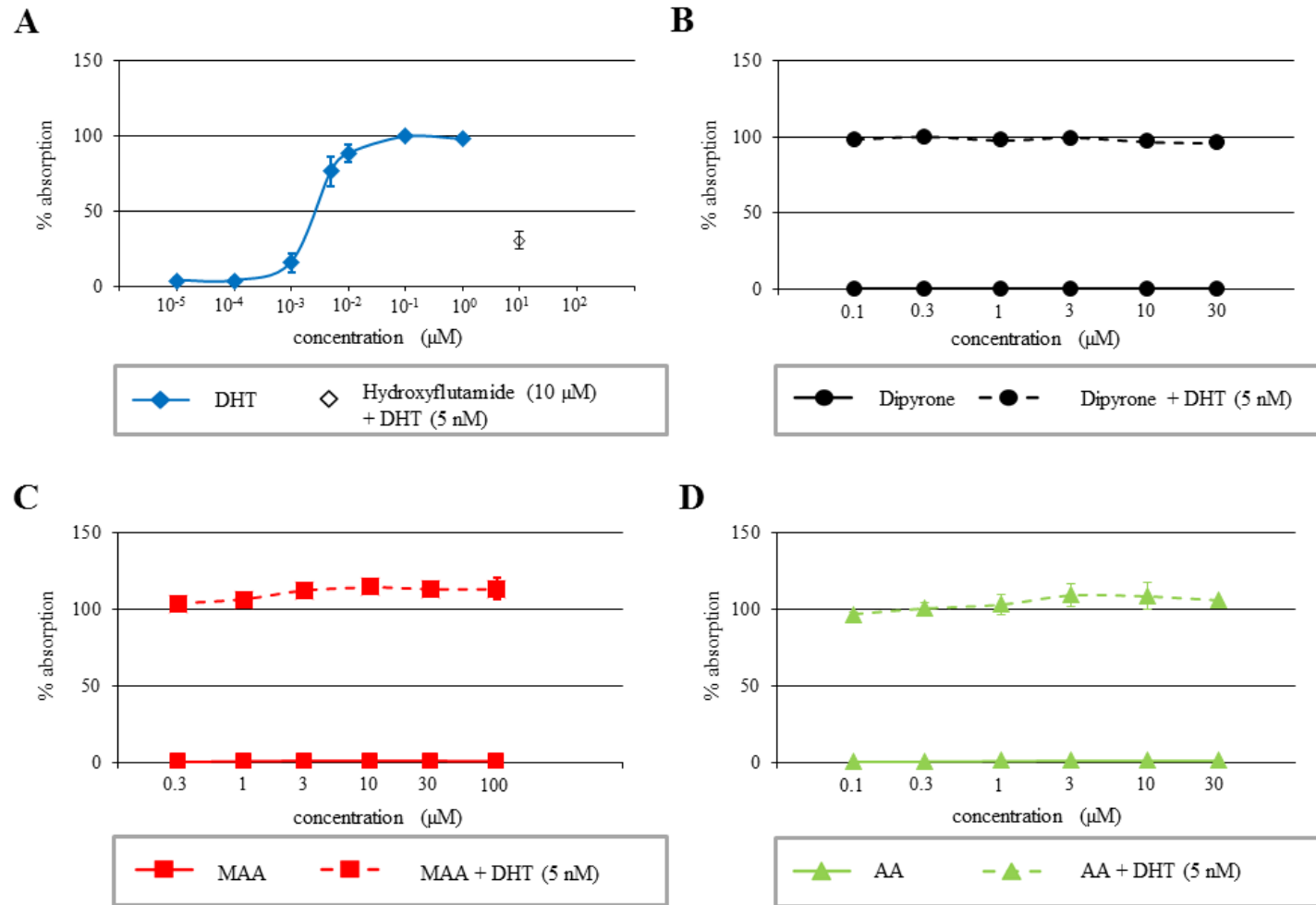


Fig. 4. Androgen agonistic and antagonistic screening for dipyrone (B), MAA (C) and AA (D). Androgen receptor dependent enzyme activities for positive controls, DHT and hydroxyflutamide are shown in panel A. DHT at 0.1 μM was considered as 100% androgenic response. Hydroxyflutamide 10 μM was combined with DHT at 5 nM to assess antiandrogenicity. DHT response at 5 nM was set at 100% for anti-androgenicity. Data are presented as median \pm maximum and minimum from two independent run experiments ($n = 8$).

5.3.4 Hershberger assay

The results of body and absolute tissue weights following the Hershberger assay are shown in Table 1. The body weights of male rats on necropsy day were not statistically different between groups. The animals that received testosterone (positive control for androgenicity) showed a significant increase in the absolute weights of the glans penis, ventral prostate, seminal vesicle, bulbourethral glands, and levator ani/bulbocavernosus muscle compared with the vehicle control group (canola oil). Similarly, the animals that received testosterone and flutamide (positive control for antiandrogenicity) showed a statistically significant reduction in the absolute weights of these tissues when compared with the animals that received only testosterone. The weight of androgen-dependent organs in groups treated with dipyrone combined with testosterone did not differ from the testosterone-only group. Moreover, no significant changes were detected in androgen-dependent organ weights in the animals that received only dipyrone in relation the vehicle control group. Overall, the same profile of responses was observed for the analysis of relative organs weights (data not shown).

Table 1. Body weight (g) and absolute androgen-dependent organ weights (g) of pubertal castrated male rats after 10 days of treatment in the Hershberger assay.

Parameters	Experimental groups						
	Vehicle	Test	Flut + Test	D50 + test	D100 + test	D200 + test	D200
Body weight	239±35	249±24	234±24	252±38	237±28	236±31	237±22
Glans penis	0.034±0.010	0.071±0.011*	0.039±0.006#	0.067±0.011	0.066±0.010	0.066±0.006	0.030±0.007
Ventral prostate	0.020±0.006	0.136±0.035*	0.033±0.012#	0.126±0.042	0.115±0.028	0.137±0.040	0.017±0.005
Seminal vesicle with fluid	0.069±0.022	0.502±0.120*	0.087±0.028#	0.482±0.172	0.431±0.108	0.458±0.168	0.065±0.015
Seminal vesicle without fluid	0.060±0.023	0.300±0.102*	0.074±0.022#	0.328±0.093	0.301±0.063	0.327±0.088	0.056±0.014
LABC	0.178±0.050	0.434±0.060*	0.205±0.041#	0.419±0.090	0.382±0.064	0.393±0.076	0.156±0.052

Note: Test for androgenicity and antiandrogenicity. All data are shown as mean ± SD of body and absolute organ weights (n = 12 animals per group).

*Significantly different from vehicle control (p<0.05 ANOVA/Tukey); #Significantly different from Testosterone group (p < 0.05 ANOVA/Tukey).

Test: testosterone (0.25 mg/kg/day); Flut: flutamide (5 mg/kg/day); D: Dipyron (50, 100 or 200 mg/kg/day); LABC: levator ani/bulbocavernosus muscle.

5.4 DISCUSSION

There is some toxicological evidence for endocrine modulation of mild analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which can interact with components of the endocrine system through multiple mechanisms. In rodent studies, developmental exposures to some of these drugs has been linked to alterations in the production of testicular hormones (Kristensen et al. 2011, 2012) and reproductive and behavioral changes in the exposed offspring (Hay-Schmidt et al. 2017; Holm et al. 2015). In addition, human epidemiological studies have reported on possible associations between prenatal analgesic exposures and reproductive changes, such as reduced anogenital distance (Fisher et al. 2016; Lind et al. 2017) and increased risk of cryptorchidism (Kristensen et al. 2011; Jensen et al. 2010; Snijder et al. 2012).

The present study was conducted to assess the ability of dipyrone, an analgesic and antipyretic drug widely used in many parts of the world, to elicit (anti)androgenic responses in several model systems. Our results showed that *in vitro* exposure of steroidogenic active H295R cells to dipyrone and its two main metabolites, MAA and AA, reduced the production of androgens and corticosteroids in a concentration-dependent manner. In contrast, dipyrone did not induce any effects on the *ex vivo* fetal testis testosterone production assay, as well as it did not elicit *in vivo* or *in vitro* androgen agonistic/antagonistic activities.

In the *in vitro* H295R assay, dipyrone and its metabolites affected steroidogenesis at different steps. The analysis of steroidogenic product to substrate ratios suggests that these compounds are inhibitors of CYP21 and CYP17-lyase enzymes. From the shape of the concentration-response curve, AA seemed to be the most potent of the three compounds in reducing testosterone production. In addition, AA markedly increased the concentrations of 17OH-progesterone, suggestive of CYP21 and CYP17-lyase inhibition. However, the reductions of testosterone and other steroid hormones induced by dipyrone and its metabolites were observed at the high-end concentrations of our response curve. For MAA and AA, the lowest concentration to reduce testosterone levels in our model (314 μM) was approximately 4 and 13 times higher than the maximum plasma concentrations of 76 μM and 24 μM reported in humans after 7-day oral administration of 3 g dipyrone/day, respectively

(Levy et al. 1995). Dipyrone itself is not detected in plasma following oral and/or parenteral administrations, because of the fast metabolic conversion to MAA, AA, and other metabolites (Levy et al. 1995).

In the *ex vivo* fetal testicular testosterone production assay, no effects were observed following maternal dipyrone exposure to 50, 100, and 200 mg/kg/day in rats. In addition, no signs of maternal or fetal toxicity were observed at any dose level. These doses were selected on the basis of maximum human exposures and allometric extrapolations from humans to rats. The contrasting results of H295R assay and fetal rat testicular testosterone production may be related to differences in target organ concentrations and/or sensitivity of test systems. As already mentioned, significant effects on H295R steroidogenesis were seen at concentrations above those usually seen in human exposure scenarios, while the rat study used human relevant doses. Also, local regulatory mechanisms may compensate eventual perturbations of steroidogenesis *in vivo*, as paracrine systems are active in the fetal testis, which differs from the limited autocrine feedback observed *in vitro*. Testosterone production is regulated through autocrine and paracrine negative feedback via the cAMP pathway, thereby controlling the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). This protein is responsible for activating cholesterol, making it available for CYP11A1, the first and rate-limiting step in steroidogenesis forming pregnenolone (Miller and Auchus, 2011). This pathway is active in Leydig cells *in vivo* and likely also *ex vivo* (Houk et al. 2004) and induces gene expression of StAR thereby increasing pregnenolone formation and downstream steroids including testosterone. The present study indicates that such feedback systems may be active *ex vivo* and *in vivo* compensating for the observed decrease in testosterone production in the H295R experiments. Interestingly, paracetamol exposure was also unable to reduce *ex vivo* fetal testicular testosterone production in rats (Kristensen et al. 2011), but it did reduce testosterone concentrations in H295R cells (Holm et al. 2015; Tinwell et al. 2013) and in organotypic culture of rat fetal testis *in vitro* (Kristensen et al. 2011). These potential compensatory feedback systems should be studied in further details.

In addition, in developmental rodent studies paracetamol induced anti-androgenic responses, such as reduced anogenital distance (Kristensen et al. 2011) and nipple retention (Axelstad et al. 2014) in males, as well as changes in sexually dimorphic behaviors (Hay-Schmidt et al. 2017). It is also important to highlight that in

addition to suppressing androgen production, paracetamol and other mild analgesics can act through several other mechanisms, including inhibition of prostaglandin synthesis, increased activation of the endocannabinoid system, known to reduce Leydig cell function, and inhibition of insulin-like factor-3 (INSL-3), a Leydig cell product involved in the process of testicular descent. The disruption of these signaling pathways may collectively contribute to the downstream consequences of developmental exposures to reproductive and behavioral outcomes (Martino-Andrade and Swan, 2017). Therefore, additional *in vivo* apical studies with dipyrone are needed to fully characterize its potential endocrine disrupting effects. Such studies include *in utero* and lactational exposure assays and examination of endocrine and reproductive sensitive endpoints in male and female offspring at different life stages.

We also investigated the androgen agonistic and antagonistic activities of dipyrone in two experimental models, the *in vitro* Yeast Androgen Screen (YAS) and the Hershberger bioassay. In the YAS assay, no antagonistic effects were observed in yeast cells expressing the human androgen receptor when co-exposed to DHT and dipyrone, MAA or AA. Similarly, in the Hershberger assay, co-administration of dipyrone and testosterone to castrated rats did not change the weight of androgen-dependent tissues in relation to the testosterone-only group, indicating the absence of antiandrogenic activity. Furthermore, dipyrone and its metabolites did not induce any androgenic activity *in vitro* or *in vivo*. These results are in agreement with prior studies conducted with other analgesics (Kolle et al. 2010; Mazaud-Guittot et al. 2013). Mazaud-Guittot et al. (2013) investigated possible estrogen, androgen, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) agonistic and antagonistic activities of paracetamol and acetylsalicylic acid using *in vitro* reporter gene assays. The results by Mazaud-Guittot et al. (2013) were negative for all nuclear receptor-mediated agonistic or antagonistic responses, indicating that the endocrine modulation exerted by these drugs involves other hormonal signaling pathways or alternative mechanisms, such as interference with gonadal function and hormonal production. It is noteworthy that the Hershberger and the yeast-based transcriptional activation reporter gene assays are complementary tests that in concert allow a better assessment of receptor-mediated effects of test compounds. While the *in vitro* reporter gene assay constitutes an easy and direct method for assessment of agonistic and antagonistic activities, it does not take into account

other variables that may affect the *in vivo* responses, including pharmacokinetic parameters, such as absorption, distribution, bioavailability and metabolism (OECD, 2009).

The major strength of this study is that we used a collection of complementary *in vitro* and *in vivo* assays to examine the interference of dipyrone on androgen production or action. This combined *in vitro* and *in vivo* approach is essential to identify potential interactions with components of the endocrine system. In addition, this strategy can be useful to provide insights into the mechanism of action and potency of selected chemicals. One major limitation of our study is that we did not measure the plasmatic concentrations of dipyrone metabolites in the rat studies (internal doses), which precluded a more accurate comparison of *in vivo* and *in vitro* data. However, we were still able to compare the selected doses and concentrations with known external and internal doses reported in humans.

Our results indicate that dipyrone and its two main metabolites have the potential to inhibit the steroidogenesis *in vitro* at concentrations above the usual concentrations achieved following medical use, which agrees with the absence of inhibitory effects on testosterone production in our animal study using therapeutically relevant doses. However, these findings may be relevant in a wider human exposure scenario context, considering the widespread use of dipyrone in some countries and the possibility of co-exposures with other drugs and environmental chemicals that act through similar mechanisms. This is particularly critical for vulnerable populations, such as pregnant women and children. In addition, because dipyrone may possibly interact with other hormonal systems, its influence on endocrine-mediated processes should be investigated in developmental studies designed to examine multiple endocrine and reproductive endpoints.

Acknowledgments

Marcella T. Passoni was a scholarship recipient from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil) – Master of Science. Anderson Joel Martino-Andrade and Paulo Roberto Dalsenter were fellowship recipients from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

5.5 REFERENCES

- Andrade AJM, Araújo S, Santana GM, Ohi M, Dalsenter PR (2002) Screening for *in Vivo* (Anti)estrogenic and (Anti)androgenic Activities of Technical and Formulated Deltamethrin. *Regul Toxicol Pharmacol* 35(3):379-82 doi: 10.1006/rtph.2002.1554
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014) Novalgina – Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda
- Arrais PS, Fernandes ME, Pizzol TD, et al. (2016) Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. *Rev Saude Publica* 50(suppl 2):13s doi:10.1590/S1518-8787.2016050006117
- Axelstad M, Christiansen S, Boberg J, et al. (2014) Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. *Reproduction* 147(4):489-501 doi:10.1530/REP-13-0447
- Bar-Oz B, Clementi M, Di Giantonio E, et al. (2005) Metamizol (dipyrone, optalgin) in pregnancy, is it safe? A prospective comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 119(2):176-9 doi:10.1016/j.ejogrb.2004.07.004
- Ben Maamar M, Lesne L, Hennig K, et al. (2017) Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep* 7:44184 doi:10.1038/srep44184
- Brown J, Walker SE, Steinmain K (2004) *Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species*. Virginia: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Front Royal
- Crunfli F, Vilela FC, Giusti-Paiva A (2015) Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 42(3):246-55 doi: 10.1111/1440-1681.12347
- da Silva Dal Pizzol T, Schuler-Faccini L, Mengue SS, Fischer MI (2009) Dipyrone use during pregnancy and adverse perinatal events. *Arch Gynecol Obstet* 279(3):293-7 doi:10.1007/s00404-008-0707-3
- EMA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2003) *Veterinary Medicines and Inspections. Committee for veterinary medicinal products – Metamizole*
- Fernandes NF, Martino-Andrade AJ, Dos Santos Lourenco AC, et al. (2015) Supplementation with *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen does not affect androgenic-anabolic parameters in male rats. *J Ethnopharmacol* 161:46-52 doi:10.1016/j.jep.2014.11.049
- Ferreira TR, Lopes LC (2016) Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions. *J Pediatr (Rio J)* 92(1):81-7 doi:10.1016/j.jpmed.2015.04.007
- Fisher BG, Thankamony A, Hughes IA, Ong KK, Dunger DB, Acerini CL (2016) Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. *Hum Reprod* 31(11):2642-2650 doi:10.1093/humrep/dew196
- Furr JR, Lambright CS, Wilson VS, Foster PM, Gray LE, Jr. (2014) A short-term *in vivo* screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. *Toxicol Sci* 140(2):403-24 doi:10.1093/toxsci/kfu081
- Hansen CH, Larsen LW, Sorensen AM, Halling-Sorensen B, Styris have B (2017) The six most widely used selective serotonin reuptake inhibitors decrease androgens and increase estrogens in the H295R cell line. *Toxicol In Vitro* 41:1-11

- doi:10.1016/j.tiv.2017.02.001
- Hay-Schmidt A, Finkielman OTE, Jensen BAH, et al. (2017) Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. *Reproduction* 154(2):145-152 doi:10.1530/REP-17-0165
- Hoffmann F, Meinecke P, Freitag MH, et al. (2015) Who gets dipyrone (metamizole) in Germany? Prescribing by age, sex and region. *J Clin Pharm Ther* 40(3):285-8 doi: 10.1111/jcpt.12261
- Holm JB, Chalmey C, Modick H, et al. (2015) Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. *Toxicol Sci* 148(1):288-98 doi:10.1093/toxsci/kfv179
- Houk CP, Pearson EJ, Martinelle N, et al (2004) Feedback Inhibition of Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression in Vitro and in Vivo by Androgens. *Endocrinology* 145:1269–1275 doi: 10.1210/en.2003-1046
- Jensen MS, Rebordosa C, Thulstrup AM, et al. (2010) Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. *Epidemiology* 21(6):779-85 doi:10.1097/EDE.0b013e3181f20bed
- Kolle SN, Kamp HG, Huener HA, et al. (2010) In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. *Toxicol In Vitro* 24(7):2030-40 doi:10.1016/j.tiv.2010.08.008
- Kristensen DM, Hass U, Lesne L, et al. (2011) Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. *Hum Reprod* 26(1):235-44 doi:10.1093/humrep/deq323
- Kristensen DM, Lesne L, Le Fol V, et al. (2012) Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int J Androl* 35(3):377-84 doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01282.x
- Kristensen DM, Mazaud-Guittot S, Gaudriault P, et al. (2016) Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. *Nat Rev Endocrinol* 12(7):381-93 doi: 10.1038/nrendo.2016.55
- Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B (1995) Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites. *Clin Pharmacokinet* 28(3):216-34 doi:10.2165/00003088-199528030-00004
- Lind DV, Main KM, Kyhl HB, et al. (2017) Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. *Hum Reprod* 32(1):223-231 doi:10.1093/humrep/dew285
- Lind JN, Tinker SC, Broussard CS, et al. (2013) Maternal medication and herbal use and risk for hypospadias: data from the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 22(7):783-93 doi:10.1002/pds.3448
- Martino-Andrade AJ, Swan SH (2017) Interaction of Pharmaceuticals with Environmental Chemicals. Cap. 7, p. 141-174. In: Cohen A, vom Saal FS. *Integrative Environmental Medicine*. Oxford University Press doi:10.1093/med/9780190490911.001.0001
- Mazaud-Guittot S, Nicolas Nicolaz C, Desdoits-Lethimonier C, et al. (2013) Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. *J Clin Endocrinol Metab* 98(11):E1757-67 doi:10.1210/jc.2013-2531
- Miller WL, Auchus RJ (2011) The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32:81–151 doi: 10.1210/er.2010-0013
- Müller JC, Imazaki PH, Boareto AC, et al. (2012) In vivo and in vitro estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. *Reprod Toxicol* 34(1):80-5

- doi:10.1016/j.reprotox.2012.04.001
- Nevill AM (1994) The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. *J Appl Physiol* (1985) 77(6):2870-3
- Nielsen FK, Hansen CH, Fey JA, et al. (2012) H295R cells as a model for steroidogenic disruption: a broader perspective using simultaneous chemical analysis of 7 key steroid hormones. *Toxicol In Vitro* 26(2):343-50 doi:10.1016/j.tiv.2011.12.008
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000) Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17):5421-6 doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x
- OECD. Guideline for the testing of chemicals (2009) Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats
- OECD. Guideline for the testing of chemicals (2011) Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay
- Pizzol TSD, Tavares NUL, Bertoldi AD, et al. (2016) Use of medicines and other products for therapeutic purposes among children in Brazil. *Rev Saude Publica* 50(suppl 2):12s doi:10.1590/S1518-8787.2016050006115
- Rathmell JP, Viscomi CM, Ashburn MA (1997) Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. *Anesth Analg* 85(5):1074-87
- Rogosch T, Sinning C, Podlewski A, et al. (2012) Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol). *Bioorg Med Chem* 20(1):101-7 doi:10.1016/j.bmc.2011.11.028
- Snijder CA, Kortenkamp A, Steegers EA, et al. (2012) Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. *Hum Reprod* 27(4):1191-201 doi:10.1093/humrep/der474
- Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158(3):327-39
- Thorpe PG, Gilboa SM, Hernandez-Diaz S, et al. (2013) Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 22(9):1013-8 doi: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. *Regul Toxicol Pharmacol* 66(2):184-96 doi:10.1016/j.yrtph.2013.04.002
- van den Driesche S, Macdonald J, Anderson RA, et al. (2015) Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci Transl Med* 7(288):288ra80 doi:10.1126/scitranslmed.aaa4097
- Weisser JJ, Hansen CH, Poulsen R, Larsen LW, Cornett C, Styris have B (2016) Two simple cleanup methods combined with LC-MS/MS for quantification of steroid hormones in in vivo and in vitro assays. *Anal Bioanal Chem* 408(18):4883-95 doi:10.1007/s00216-016-9575-z

6 DISCUSSÃO ESTENDIDA E CONCLUSÃO

Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) de uso comum podem provocar distúrbios endócrinos e reprodutivos por meio de múltiplos mecanismos, principalmente alterando o desenvolvimento testicular fetal em animais e humanos. A exposição pré-natal a esses fármacos tem sido associada a alterações na produção de hormônios testiculares, criptorquidismo, malformações do trato reprodutivo e distúrbios reprodutivos na vida adulta (KRISTENSEN et al., 2011; KRISTENSEN et al., 2012; SNIJDER et al., 2012; ALBERT et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; HOLM et al., 2015; VAN DEN DRIESCHE et al., 2015; BEN MAAMAR et al., 2017; HAY-SCHMIDT et al., 2017; LIND et al., 2017). A exposição humana a analgésicos pode ocorrer, de maneira similar a outros desreguladores ambientais, por meio da exposição a resíduos presentes na água, nos alimentos ou em outros meios, mas 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., 2016). Assim, diferentemente de outros desreguladores endócrinos, a possibilidade de exposição a altas doses de analgésicos e outros medicamentos é grande, conferindo riscos potenciais a indivíduos expostos, incluindo populações vulneráveis como gestantes e crianças.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade da dipirona e seus dois metabólitos principais, 4-Metilaminoantipirina (MAA) e 4-Aminoantipirina (AA), de induzirem respostas androgênicas e/ou antiandrogênicas em diferentes ensaios. A dipirona é amplamente utilizada em diversos países, particularmente no Brasil, onde ocupa o primeiro lugar em vendas entre os analgésicos (ANVISA, 2001; ARRAIS et al., 2016; FERREIRA E LOPES, 2016). Neste estudo, foi utilizado um conjunto de testes complementares *in vitro* e *in vivo* a fim de determinar o potencial da dipirona e seus metabólitos de influenciar a produção ou ação de hormônios androgênicos. Foram utilizados o teste de avaliação da esteroidogênese *in vitro* em células H295R, o teste de produção de testosterona testicular fetal em ratos, o teste de ativação transcricional do receptor androgênico (*Yeast Androgen Screen* - YAS) e, ainda, o teste de Hershberger, bioensaio que utiliza órgãos andrógeno-dependentes como biomarcadores de efeitos (anti)androgênicos em ratos castrados.

De maneira geral, os resultados do teste de esteroidogênese *in vitro*, demonstraram que a exposição à dipirona, MAA e AA, reduziu a produção de androgênios e corticosteroides de maneira concentração-dependente, ao contrário do que foi observado no teste de produção de testosterona testicular fetal *ex vivo*, no qual a dipirona não teve efeitos sobre a produção de testosterona pelo testículo fetal. Além disso, não foram observadas atividades agonistas ou antagonistas androgênicas *in vitro* ou *in vivo*.

No teste de esteroidogênese *in vitro*, foram utilizadas células H295R de adenocarcinoma humano devido a sua capacidade de expressar todas as enzimas da via esteroidogênica. Com base nos resultados obtidos, foi possível observar que a dipirona e os seus metabólitos inibiram a esteroidogênese em diferentes etapas. A análise da razão entre o produto e o substrato esteroidogênico sugere que esses compostos são inibidores das enzimas CYP17-lyase e CYP21. De maneira geral, uma razão abaixo de 1 é sugestiva da inibição da enzima que converte o substrato em produto, enquanto que uma razão acima de 1 é sugestiva de uma indução enzimática. Sendo assim, pode-se dizer que os três compostos testados inibiram as enzimas CYP17-lyase, que converte hidroxiprogéstágenos em andrógenos, e CYP21, que converte progéstágenos em corticosteroides, sendo o metabólito AA o mais potente em inibir a atividade dessas enzimas. Os resultados sugerem ainda um possível efeito estimulatório na enzima CYP17-hidroxilase, principalmente após a exposição ao metabólito AA. No entanto, esse efeito pode não ser um efeito estimulatório de fato, e sim um resultado da inibição das enzimas CYP17-lyase e CYP21, tendo como consequência o acúmulo do substrato 17OH-progesterona.

Foi possível observar também que o metabólito AA foi o mais potente dos três compostos testados em reduzir as concentrações de testosterona. No entanto, as reduções de testosterona e outros hormônios esteroides induzidos pela dipirona e seus metabólitos, foram observados principalmente nas concentrações mais altas da curva concentração-resposta. Para os metabólitos MAA e AA, a menor concentração (314 μM) que foi capaz de reduzir a produção de testosterona nesse ensaio, foi aproximadamente 4 e 13 vezes maior do que as concentrações plasmáticas máximas reportadas em seres humanos de 75,9 μM e 24,1 μM , respectivamente. Essas concentrações plasmáticas foram alcançadas após administração oral de três doses diárias de dipirona de 1 g durante 7 dias (LEVY et al., 1995).

Além disso, os resultados do teste de esteroidogênese *in vitro* indicaram reduções significativas nas concentrações de corticosteroides, com exceção da cortisona, que teve sua concentração elevada quando exposta à maior dose de dipirona. Os corticosteroides desempenham um papel essencial na regulação dos principais processos fisiológicos, pois estão envolvidos em respostas adaptativas de estresse e muitos outros aspectos do desenvolvimento, incluindo imunomodulação, neurodesenvolvimento, metabolismo energético, regulação do equilíbrio hídrico, controle da glicemia e pressão arterial. A desregulação desses hormônios no período pré-natal pode comprometer essas respostas, ocasionando diversas alterações na prole, como alterações comportamentais, imunológicas e incapacidade de gerar respostas adaptativas adequadas ao estresse (ODERMATT et al., 2006). Alguns estudos têm indicado que a exposição a compostos naturais ou produtos químicos industriais que prejudicam a ação dos corticosteroides pode contribuir para a crescente incidência de déficits cognitivos, distúrbios imunológicos e doenças metabólicas. A ação prejudicada desses hormônios tem sido associada à várias doenças, incluindo osteoporose, catarata, obesidade, diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias e auto-imunes (CARNAHAN E GOLDSTEIN, 2000; COOPER, 2004; FREEL E CONNELL, 2004; DE MELLO, 2004; ROSMOND, 2005; ODERMATT et al., 2006).

No teste de produção de testosterona testicular fetal *ex vivo*, não foram observados efeitos após a exposição intrauterina a dipirona nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg/dia em ratos. Além disso, nenhum sinal de toxicidade materna ou fetal foi observado nas doses testadas. Essas doses foram selecionadas com base na dose terapêutica para humanos (dose máxima diária de dipirona = 4 g) e cálculos de extrapolações alométricas, a fim de definir doses terapêuticas devido ao ajuste necessário para a taxa metabólica da espécie estudada, assegurando a eficácia e a segurança do tratamento (NEVILL, 1994; ANVISA, 2014).

Os resultados aparentemente conflitantes entre os testes de esteroidogênese *in vitro* e de produção de testosterona testicular fetal em ratos podem ser explicados por diferentes motivos. Primeiramente, os resultados de inibição de androgênios e corticosteroides *in vitro* foram observados em concentrações de MAA e AA acima das que geralmente são vistas em um contexto de exposição humana, enquanto que no ensaio *in vivo* foram utilizadas somente doses de dipirona relevantes para humanos. Além disso, mecanismos regulatórios

locais podem compensar eventuais perturbações da esteroidogênese *in vivo*, já que os sistemas parácrinos são ativos no testículo fetal, o que difere do feedback autócrino limitado observado *in vitro*. A produção de testosterona é regulada por meio de feedback negativo autócrino e parácrino pela via AMPc, controlando assim a atividade da proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR). Essa proteína é responsável por ativar o colesterol, tornando-o disponível para a conversão em pregnenolona por meio da ação da enzima CYP11A1, o primeiro passo da esteroidogênese (MILLER E AUCHUS, 2011). Essa via está ativa em células de Leydig *in vivo* e provavelmente *ex vivo* (HOUK et al., 2004), e induz a expressão gênica de StAR, aumentando assim a formação de pregnenolona e os demais esteróides, incluindo a testosterona. O presente estudo indica que esses sistemas de feedback podem estar ativos *in vivo* e *ex vivo*, compensando a diminuição da produção de testosterona observada no teste de esteroidogênese *in vitro*. Dessa maneira, as diferenças nas respostas dos testes *in vitro* e *in vivo* para a avaliação da dipirona e seus metabólitos em relação a produção de testosterona podem estar relacionadas a diferenças na sensibilidade dos testes, nas diferentes concentrações e doses testadas, parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos, além de mecanismos regulatórios de compensação.

Resultados semelhantes aos obtidos nesse estudo, foram reportados para o paracetamol, que também não inibiu a produção de testosterona testicular fetal *ex vivo* em ratos (KRISTENSEN et al., 2011), mas reduziu as concentrações de testosterona em células H295R de adenocarcinoma humano (HOLM et al., 2015; TINWELL et al., 2013) e em testículos fetais de ratos em cultura organotípica *in vitro* (KRISTENSEN et al., 2011). Além disso, em estudos de avaliação do desenvolvimento em roedores, o paracetamol induziu respostas antiandrogênicas, como a diminuição da distância anogenital (KRISTENSEN et al., 2011) e a retenção de mamilos (AXELSTAD et al., 2014) em machos, bem como mudanças em comportamentos sexualmente dimórficos, como, por exemplo, diminuição da agressividade e da disputa territorial entre animais do mesmo sexo e, diminuição do número de penetrações e ejaculações durante o acasalamento com fêmeas na fase receptiva do ciclo estral (HAY- SCHMIDT et al., 2017).

É provável que os analgésicos e AINEs induzam distúrbios reprodutivos masculinos por meio de múltiplos mecanismos de ação. Os mecanismos associados à insuficiência androgênica e outras perturbações induzidas pelo paracetamol e

outros analgésicos ainda permanecem indefinidos. Alguns desses fármacos podem reduzir a expressão do hormônio INSL-3 e, dessa forma, comprometer a descida do testículo ao escroto (KRISTENSEN et al., 2011; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; VAN DEN DRIESCHE et al., 2015). Em concordância com essas informações, estudos epidemiológicos recentes demonstraram associações entre a exposição materna a analgésicos e um risco aumentado de criptorquidismo em recém-nascidos do sexo masculino (JENSEN et al., 2010; KRISTENSEN et al., 2011; SNIJDER et al., 2012).

Além disso, Kristensen et al. (2011) propuseram que esses fármacos e algumas substâncias químicas ambientais podem desregular a função testicular por meio da inibição das prostaglandinas, alvo farmacológico dos AINEs, durante períodos críticos para a diferenciação sexual e gonadal. Sabe-se que as prostaglandinas regulam diversas funções no sistema reprodutor, incluindo a ovulação, a fertilização, o parto e a espermatogênese (SALES E JABBOUR, 2003; GAYTAN et al., 2006; UZUN et al., 2015). Nos testículos em desenvolvimento, a prostaglandina D2 (PGD2) está envolvida na formação do cordão seminífero mantendo a expressão contínua de SOX-9, gene regulador chave da diferenciação das células de Sertoli, do desenvolvimento subsequente dos testículos e masculinização do trato reprodutivo.

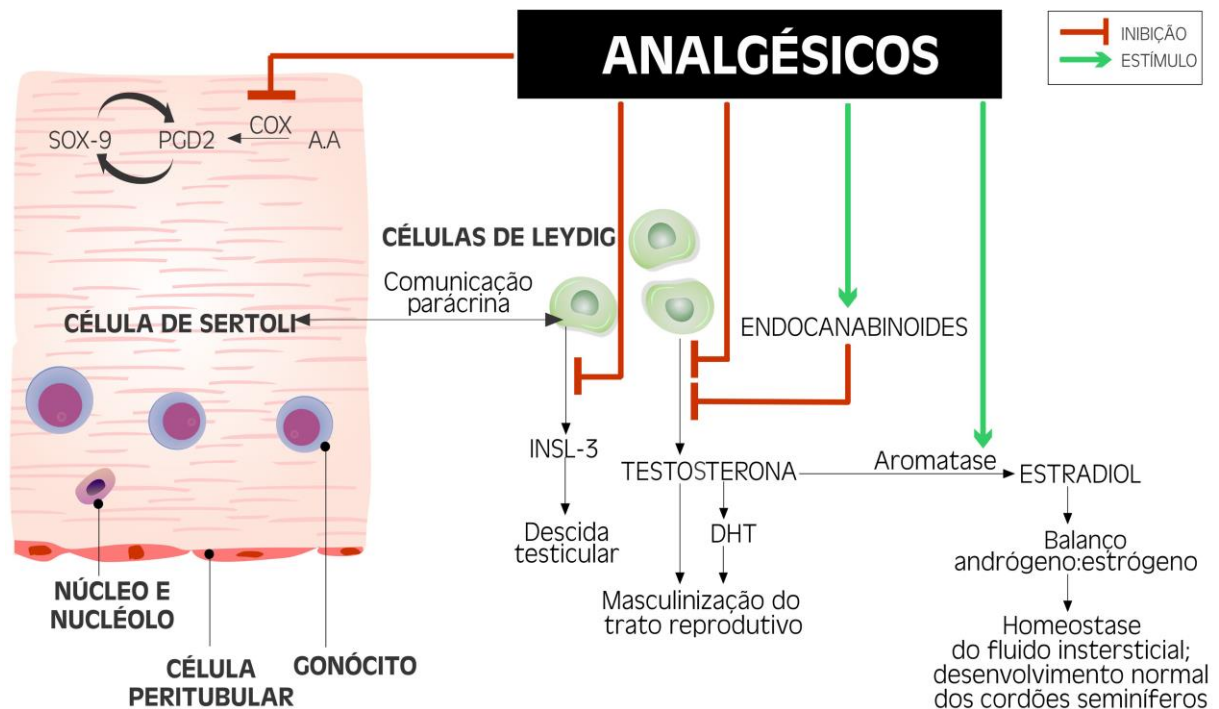
A inibição das prostaglandinas no testículo em desenvolvimento pode desencadear a diferenciação anormal das células de Sertoli e, conseqüentemente, resultar em uma série de perturbações celulares e hormonais no testículo fetal. Por exemplo, disfunções nas células de Sertoli podem comprometer o desenvolvimento e função das células de Leydig e, como resultado, ocasionar alterações hormonais, principalmente inibição de INSL-3 e da produção de testosterona. Contudo, a relação entre a inibição das prostaglandinas, a supressão da produção de testosterona e outros distúrbios hormonais ainda não é clara. Além disso, os analgésicos também podem prejudicar a esteroidogênese por mecanismos que são independentes da supressão de prostaglandinas (WILHELM et al., 2007; JAKOB E LOVELL-BADGE, 2011; KRISTENSEN et al., 2011; ALBERT et al., 2013; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013; MARTINO-ANDRADE E SWAN, 2017). Por exemplo, os efeitos dos analgésicos nos testículos podem ser provenientes de desequilíbrios na relação androgênio-estrogênio alterando a expressão ou a atividade de enzimas esteroidogênicas, 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).

Os efeitos dos analgésicos 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. Os receptores canabinoides (CB) estão presentes nas células de Leydig, Sertoli e germinativas, sugerindo um envolvimento funcional da sinalização desses receptores na esteroidogênese, espermatogênese e fertilização, podendo desencadear alterações nas funções reprodutivas masculinas (GYE et al., 2005). Diversos estudos em modelos animais associaram exposições a canabinoides a reduções nos pesos dos testículos e vesícula seminal, espermatogênese prejudicada, redução da distância anogenital, supressão dos níveis plasmáticos de testosterona, diminuição da produção de testosterona testicular fetal, além de redução do comportamento sexual (MERARI et al., 1973; DIXIT et al., 1974; ROSENKRANTZ E BRAUDE, 1974; KOLODNY et al., 1976; DALTERIO et al., 1978; DALTERIO E BARTKE, 1981; DALTERIO et al., 1983; DALTERIO et al., 1984a; DALTERIO et al., 1984b; WENGER et al., 2001; KAMALI et al., 2016). Esses estudos indicam que os canabinoides são capazes de afetar a esteroidogênese testicular *in vitro* e *in vivo*, podendo envolver tanto estimulação quanto inibição, dependendo da dose. Isso sugere que os receptores CB controlam múltiplos aspectos do desenvolvimento e funções testiculares (MECCARIELLO et al., 2014).

A FIGURA 3 apresenta alguns dos principais alvos dos analgésicos no desenvolvimento de testículos fetais, que podem contribuir para a indução de distúrbios do trato reprodutivo masculino em animais e humanos.

FIGURA 3 – MECANISMOS DE DESREGULAÇÃO ENDÓCRINA POR ANALGÉSICOS NO TESTÍCULO FETAL



FONTE: O autor (2017).

LEGENDA: Os analgésicos podem inibir a enzima ciclooxigenase (COX), que está envolvida na síntese de prostaglandina D2 (PGD2), um mediador que promove a expressão contínua de SOX-9 (regulador da diferenciação das células de Sertoli e do desenvolvimento testicular). Além disso, esses fármacos podem atuar diretamente sobre as células de Leydig fetais e induzir múltiplos distúrbios hormonais, incluindo a supressão do fator semelhante à insulina-3 (INSL3) e da produção de testosterona. Os analgésicos também podem ativar o sistema endocanabinoide, que reduz a função das células de Leydig, e ainda desregular o equilíbrio normal entre androgênios e estrogênios, alterando a expressão de enzimas esteroidogênicas essenciais, como CYP17A1 e CYP19. A.A = ácido araquidônico; INSL-3 = fator semelhante à insulina-3; DHT = dihidrotestosterona.

No presente estudo também foram avaliadas as atividades agonistas e antagonistas androgênicas da dipirona em dois modelos experimentais, o *Yeast Androgen Screen* (YAS), ensaio *in vitro* que utiliza a ativação transcricional de genes repórter em células de levedura que expressam receptores de androgênios humanos (hAR), e o teste de Hershberger, bioensaio que utiliza o peso de órgãos andrógeno-dependentes como biomarcadores da ação androgênica em ratos castrados. Não foram observados efeitos antagonistas em células de leveduras quando expostas a DHT combinada com dipirona, MAA ou AA. Da mesma forma, no teste de Hershberger, a co-administração de dipirona e testosterona em ratos castrados não alterou o peso dos órgãos andrógeno-dependentes em relação ao grupo tratado com

testosterona, indicando ausência de atividade antiandrogênica. Além disso, a dipirona e seus metabólitos não induziram atividade androgênica *in vitro* ou *in vivo*.

Os resultados corroboram os dados de estudos anteriores realizados com outros analgésicos (KOLLE et al., 2010; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013). Mazaud-Guittot et al. (2013) investigaram as possíveis atividades agonistas e antagonistas do paracetamol e do ácido acetilsalicílico utilizando ensaios de genes repórter *in vitro* para receptores nucleares de estrogênio, androgênio e proliferador de peroxissomo-gama (PPAR- γ). Os resultados foram negativos para todas as respostas agonistas ou antagonistas, indicando que a modulação endócrina exercida por esses fármacos envolve outras vias de sinalização hormonal ou mecanismos alternativos, como interferência na função gonadal e na produção hormonal.

É importante ressaltar que o YAS e o teste de Hershberger são testes complementares que, quando combinados, permitem uma melhor avaliação dos efeitos das substâncias testadas. Enquanto o YAS constitui um método fácil e direto para a avaliação de atividades agonistas e antagonistas, não leva em consideração outras variáveis que podem afetar as respostas *in vivo*, incluindo parâmetros farmacocinéticos, como absorção, distribuição, biodisponibilidade e metabolismo (OCDE, 2009).

O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos da dipirona e seus metabólitos na produção ou ação de androgênios utilizando uma combinação de testes complementares *in vitro* e *in vivo*. Essa abordagem é essencial para identificar possíveis interações com os componentes do sistema endócrino. Além disso, essa estratégia pode ser útil para fornecer informações sobre o potencial e o mecanismo de ação das substâncias testadas.

Os resultados apresentados indicam que a dipirona e seus dois principais metabólitos têm o potencial de inibir a esteroidogênese *in vitro* em concentrações acima das usuais em seres humanos, o que corrobora a ausência de efeitos inibitórios no teste de produção de testosterona testicular fetal em ratos, que utilizou apenas doses terapeuticamente relevantes. No entanto, os resultados encontrados podem ser relevantes em um contexto real de exposição humana, considerando a ampla utilização da dipirona em diversos países, incluindo o Brasil, e a possibilidade de co-exposição com outros fármacos e substâncias químicas ambientais que compartilham de mecanismos de ação semelhantes e desencadeiam os mesmos tipos de distúrbios reprodutivos. Os diferentes mecanismos de ação envolvem

múltiplos alvos celulares e moleculares, e mais pesquisas devem ser desenvolvidas a fim de avaliar os possíveis efeitos interativos entre essas substâncias químicas.

Devido às evidências de que os analgésicos podem causar distúrbios hormonais, e potencialmente defeitos genitais masculinos após a exposição *in utero*, é necessária a avaliação do risco-benefício antes da utilização desses fármacos durante a gestação. No período gestacional sabe-se que as dores e as condições inflamatórias podem ser persistentes e prejudiciais para a mãe e o desenvolvimento do feto. Dor severa e persistente não tratada durante a gestação pode desencadear estresse, ansiedade, aumento da pressão arterial e depressão na mãe, sendo recomendável em determinados casos o uso de analgésicos (FDA, 2015). No entanto, as gestantes devem ser orientadas para evitar a automedicação e adotar hábitos de vida saudáveis para diminuir a exposição a outras substâncias químicas ambientais (MARTINO-ANDRADE E SWAN, 2017).

Diante dos resultados obtidos e considerando que a dipirona pode interagir com outros sistemas hormonais, sua influência nos processos mediados pelo sistema endócrino deve ser investigada de maneira mais aprofundada. Portanto, tem-se como perspectiva a realização de estudos de exposição durante períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e a lactação, e a avaliação de efeitos de manifestação precoce e tardia na prole, como malformações genitais, desenvolvimento puberal, função gametogênica e hormonal, e alterações comportamentais em machos e fêmeas. Além disso, é necessário investigar a prevalência atual do uso da dipirona em gestantes brasileiras e possíveis associações entre essa exposição e desfechos reprodutivos em recém-nascidos.

7 REFERÊNCIAS

- ALBERT, O. et al. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. **Hum Reprod**, v. 28, n. 7, p. 1890-8, Jul 2013.
- AMINOSHARIAE, A.; KHAN, A. Acetaminophen: old drug, new issues. **J Endod**, v. 41, n. 5, p. 588-93, May 2015.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Novalgina – Sanofi-Aventis Farmacêutica Ltda**, 2014.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Painel Internacional de Avaliação da segurança da dipirona**, 2001.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC n. 41, de 16 de setembro de 2011 - Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactentes e dá outras providências**. IMPRENSA/ANVISA, 2011.
- ARRAIS, P. S. et al. Prevalence of self-medication in Brazil and associated factors. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 13s, Dec 2016.
- AXELSTAD, M. et al. Mixtures of endocrine-disrupting contaminants induce adverse developmental effects in preweaning rats. **Reproduction**, v. 147, n. 4, p. 489-501, 2014.
- BAKER, V. A. Endocrine disrupters--testing strategies to assess human hazard. **Toxicol In Vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 413-9, 2001 Aug-Oct 2001.
- BAR-OZ, B. et al. Metamizol (dipyrone, optalgin) in pregnancy, is it safe? A prospective comparative study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v. 119, n. 2, p. 176-9, Apr 2005.
- BEN MAAMAR, M. et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. **Sci Rep**, v. 7, p. 44184, Mar 2017.
- BEN-BARUCH, G. et al. Uterine anomalies in diethylstilbestrol-exposed women with fertility disorders. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v. 60, n. 4, p. 395-7, 1981.
- BENSEÑOR, I. M. Dipyrone and blood dyscrasia revisited: "non-evidence based medicine". **Sao Paulo Med J**, v. 123, n. 3, p. 99-100, May 2005.
- BEVERLY, B. E. et al. Simvastatin and dipentyl phthalate lower ex vivo testicular testosterone production and exhibit additive effects on testicular testosterone and gene expression via distinct mechanistic pathways in the fetal rat. **Toxicol Sci**, v. 141, n. 2, p. 524-37, Oct 2014.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Pharmaceutical drugs in the environment. **Quim. Nova**, v. 26, n. 4, p. 523-530, Fev 2003.

BLOOR, M.; PAECH, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the initiation of lactation. **Anesth Analg**, v. 116, n. 5, p. 1063-75, May 2013.

BREITHAUPT, H. A cause without a disease. **EMBO Rep**, v. 5, n. 1, p. 16-8, Jan 2004.

BUSER, H. R. et al. Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. **Environ. Sci. Technol**, v. 33, n. 15, p. 2529-2535, 1999.

CARNAHAN, M. C.; GOLDSTEIN, D. A. Ocular complications of topical, peri-ocular, and systemic corticosteroids. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 11, n. 6, p. 478-83, Dec 2000.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**, 1962.

CHETLEY, A. **Dipyron: A drug no one needs**. BUKO Pharma-Campaign and HAI-Europe, 1993.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F. S.; SOTO, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, n. 5, p. 378-84, Oct 1993.

COOPER, M. S. Sensitivity of bone to glucocorticoids. **Clin Sci (Lond)**, v. 107, n. 2, p. 111-23, Aug 2004.

CRUNFLI, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyron. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 42, n. 3, p. 246-55, Mar 2015.

CSABA, G. The Present and Future of Human Sexuality: Impact of Faulty Perinatal Hormonal Imprinting. **Sex Med Rev**, v. 5, n. 2, p. 163-169, Apr 2017.

DA SILVA DAL PIZZOL, T. et al. Dipyron use during pregnancy and adverse perinatal events. **Arch Gynecol Obstet**, v. 279, n. 3, p. 293-7, Mar 2009.

DALTERIO, S.; BARTKE, A. Fetal testosterone in mice: effect of gestational age and cannabinoid exposure. **J Endocrinol**, v. 91, n. 3, p. 509-14, Dec 1981.

DALTERIO, S. et al. Direct and pituitary-mediated effects of delta9-THC and cannabinol on the testis. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 8, n. 6, p. 673-8, Jun 1978.

DALTERIO, S. et al. Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in male mice: I. Prenatal exposure. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 20, n. 1, p. 107-13, Jan 1984a.

DALTERIO, S. et al. Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in mice: II. Postnatal effects. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 20, n. 1, p. 115-23, Jan 1984b.

DALTERIO, S. L.; BARTKE, A.; MAYFIELD, D. Cannabinoids stimulate and inhibit testosterone production in vitro and in vivo. **Life Sci**, v. 32, n. 6, p. 605-12, Feb 1983.

DASTON, G. P. et al. Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. **Reprod Toxicol**, v. 11, n. 4, p. 465-81, 1997 Jul-Aug 1997.

DATHE, K. et al. Metamizole use during first trimester-A prospective observational cohort study on pregnancy outcome. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, Aug 2017.

DE MELLO, W. C. Heart failure: how important is cellular sequestration? The role of the renin-angiotensin-aldosterone system. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 2, p. 431-8, Aug 2004.

DEAN, A. et al. Prostaglandins, masculinization and its disorders: effects of fetal exposure of the rat to the cyclooxygenase inhibitor- indomethacin. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62556, 2013.

DIXIT, V. P.; SHARMA, V. N.; LOHIYA, N. K. The effect of chronically administered cannabis extract on the testicular function of mice. **Eur J Pharmacol**, v. 26, n. 1, p. 111-4, Apr 1974.

EBELE, A. J. et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. **Emerg Contamin**, p. 1-16, 2016.

EC, European Commission. **Commission Implementing Regulation (EU) N° 321/2011 of 1 April 2011 amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles Text with EEA relevance** UNION, O. J. O. T. E. Official Journal of the European Union: Commission Implementing Regulation (EU) 2011.

ESPIRIDIÃO, S. et al. Morphological and biochemical action of dipyrone on rat placenta. **Gen Pharmacol**, v. 27, n. 3, p. 505-7, Apr 1996.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. **FDA Drug Safety Communication: FDA has reviewed possible risks of pain medicine use during pregnancy**. Set 2015.

FERREIRA, T. R.; LOPES, L. C. Analysis of analgesic, antipyretic, and nonsteroidal anti-inflammatory drug use in pediatric prescriptions. **J Pediatr (Rio J)**, v. 92, n. 1, p. 81-7, 2016 Jan-Feb 2016.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. **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. Jan, 2011.

FISHER, B. G. et al. Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. **Hum Reprod**, v. 31, n. 11, p. 2642-2650, Nov 2016.

FONSECA, M. R.; FONSECA, E.; BERGSTEN-MENDES, G. [Prevalence of drug use during pregnancy: a pharmacoepidemiological approach]. **Rev Saude Publica**, v. 36, n. 2, p. 205-12, Apr 2002.

FREEL, E. M.; CONNELL, J. M. Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 8, p. 1993-2001, Aug 2004.

FURR, J. R. et al. A short-term in vivo screen using fetal testosterone production, a key event in the phthalate adverse outcome pathway, to predict disruption of sexual differentiation. **Toxicol Sci**, v. 140, n. 2, p. 403-24, Aug 2014.

GAYTÁN, M. et al. Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. **Reproduction**, v. 132, n. 4, p. 571-7, Oct 2006.

GILL, W. B.; SCHUMACHER, G. F.; BIBBO, M. Structural and functional abnormalities in the sex organs of male offspring of mothers treated with diethylstilbestrol (DES). **J Reprod Med**, v. 16, n. 4, p. 147-53, Apr 1976.

GRAY, L. E. et al. Transgenerational effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in the male CRL:CD(SD) rat: added value of assessing multiple offspring per litter. **Toxicol Sci**, v. 110, n. 2, p. 411-25, Aug 2009.

GRAY, L. E. et al. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Hum Reprod Update**, v. 7, n. 3, p. 248-64, 2001 May-Jun 2001.

GRAY, L. E. et al. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. **Int J Androl**, v. 29, n. 1, p. 96-104; discussion 105-8, Feb 2006.

GYE, M. C.; KANG, H. H.; KANG, H. J. Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. **Arch Androl**, v. 51, n. 3, p. 247-55, 2005 May-Jun 2005.

HAMPL, R.; KUBÁTOVÁ, J.; STÁRKA, L. Steroids and endocrine disruptors--History, recent state of art and open questions. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 155, n. Pt B, p. 217-23, Jan 2016.

HAN, S. et al. Endocrine disruption and consequences of chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*. **Aquat Toxicol**, v. 98, n. 3, p. 256-64, Jul 2010.

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

HERBST, A. L.; ULFELDER, H.; POSKANZER, D. C. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **N Engl J Med**, v. 284, n. 15, p. 878-81, Apr 1971.

HOFFMANN, F. et al. Who gets dipyron (metamizole) in Germany? Prescribing by age, sex and region. **J Clin Pharm Ther**, v. 40, n. 3, p. 285-8, Jun 2015.

HOLM, J. B. et al. Aniline Is Rapidly Converted Into Paracetamol Impairing Male Reproductive Development. **Toxicol Sci**, v. 148, n. 1, p. 288-98, Nov 2015.

HOUK, C. P. et al. Feedback inhibition of steroidogenic acute regulatory protein expression in vitro and in vivo by androgens. **Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 1269-75, Mar 2004.

JAKOB, S.; LOVELL-BADGE, R. Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. **FEBS J**, v. 278, n. 7, p. 1002-9, Apr 2011.

JENSEN, M. S. et al. Maternal use of acetaminophen, ibuprofen, and acetylsalicylic acid during pregnancy and risk of cryptorchidism. **Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 779-85, Nov 2010.

JENSEN, T. K. et al. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health? **Clin Chem**, v. 41, n. 12 Pt 2, p. 1896-901, Dec 1995.

KAMALI, Y. et al. 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. **Braz J Vet Pathol**, 9(2), p. 70-77, 2016.

KIM, H. J. et al. Determination of non-opioid analgesics in adulterated food and dietary supplements by LC-MS/MS. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 31, n. 6, p. 973-8, 2014.

KNAPPMANN, A. L.; DE MELO, E. B. [Quality of over-the-counter medicines: a study with dipyron brands commercialized in a drugstore in Cascavel city (Paraná, Brazil)]. **Cien Saude Colet**, v. 15 Suppl 3, p. 3467-76, Nov 2010.

KOLLE, S. N. et al. In house validation of recombinant yeast estrogen and androgen receptor agonist and antagonist screening assays. **Toxicol In Vitro**, v. 24, n. 7, p. 2030-40, Oct 2010.

KOLLE, S. N. et al. A testing strategy for the identification of mammalian, systemic endocrine disruptors with particular focus on steroids. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 63, n. 2, p. 259-78, Jul 2012.

KOLODNY, R. et al. Depression of plasma testosterone with acute marijuana administration. In: M.C. Braude, S. Szara (Eds.), **The Pharmacology of Marijuana**, Raven Press, New York, pp. 217–225, 1976.

KRISTENSEN, D. M. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. **Hum Reprod**, v. 26, n. 1, p. 235-44, Jan 2011.

KRISTENSEN, D. M. et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. **Int J Androl**, v. 35, n. 3, p. 377-84, Jun 2012.

KRONENBERG, H. M. et al. **Williams: Tratado de Endocrinologia**. 11^a ed. cap. 1, p. 2. Editora Elsevier, 2010.

LATHERS, C. M. Endocrine disruptors: a new scientific role for clinical pharmacologists? Impact on human health, wildlife, and the environment. **J Clin Pharmacol**, v. 42, n. 1, p. 7-23, Jan 2002.

LEVINE, H. et al. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. **Human Reproduction Update**, pp. 1–14, 2017.

LEVY, M.; ZYLBER-KATZ, E.; ROSENKRANZ, B. Clinical pharmacokinetics of dipyrrone and its metabolites. **Clin Pharmacokinet**, v. 28, n. 3, p. 216-34, Mar 1995.

LIEW, Z. et al. Acetaminophen use during pregnancy, behavioral problems, and hyperkinetic disorders. **JAMA Pediatr**, v. 168, n. 4, p. 313-20, Apr 2014.

LIND, D. V. et al. Maternal use of mild analgesics during pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. **Hum Reprod**, v. 32, n. 1, p. 223-231, Jan 2017.

LIND, J. N. et al. Maternal medication and herbal use and risk for hypospadias: data from the National Birth Defects Prevention Study, 1997-2007. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 22, n. 7, p. 783-93, Jul 2013.

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflamm Res**, v. 45, n. 6, p. 308-11, Jun 1996.

MARTINO-ANDRADE, A. J.; CHAHOUD, I. Reproductive toxicity of phthalate esters. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 1, p. 148-57, Jan 2010.

MARTINO-ANDRADE, A. J. et al. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. **Int J Androl**, v. 32, n. 6, p. 704-12, Dec 2009.

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.

MAZAUD-GUITTOT, S. et al. Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 11, p. E1757-67, Nov 2013.

MECCARIELLO, R. et al. Updates in reproduction coming from the endocannabinoid system. **Int J Endocrinol**, v. 2014, p. 412354, 2014.

MENGUE, S. S. et al. [Drug use by pregnant women in six Brazilian cities]. **Rev Saude Publica**, v. 35, n. 5, p. 415-20, Oct 2001.

MERARI, A.; BARAK, A.; PLAVES, M. Effects of 1(2) -tetrahydrocannabinol on copulation in the male rat. **Psychopharmacologia**, v. 28, n. 3, p. 243-6, 1973.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocr Rev**, v. 32, n. 1, p. 81-151, Feb 2011.

MÜLLER, J. C. et al. In vivo and in vitro estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. **Reprod Toxicol**, v. 34, n. 1, p. 80-5, Aug 2012.

NEVILL, A. M. The need to scale for differences in body size and mass: an explanation of Kleiber's 0.75 mass exponent. **J Appl Physiol (1985)**, v. 77, n. 6, p. 2870-3, Dec 1994.

ODERMATT, A. et al. Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: potential mechanisms and relevance. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 102, n. 1-5, p. 222-31, Dec 2006.

OECD. Guideline for the testing of chemicals (2009) **Test No. 441: Hershberger Bioassay in Rats**.

OECD. Guideline for the testing of chemicals (2011) **Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay**.

PARKER, K. L.; SCHIMER, B. P. Introdução à endocrinologia: o eixo hipotálamo-hipófise. In: Brunton, L.L.; Chabner, B.A.; Knollmann, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. Editora Artmed. 12 ed. 2012. cap. 38, p. 1103.

PEAVY, D. E. Endocrine Control Mechanisms. In: RHOADES, R. A. T., G.A. (Ed.). **Medical Physiology**. Second edition: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. cap. 31, p.567-580.

PERETZ, J. et al. Bisphenol a and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. **Environ Health Perspect**, v. 122, n. 8, p. 775-86, Aug 2014.

PHILIPPAT, C. et al. Analgesics during pregnancy and undescended testis. **Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 747-9, Sep 2011.

PIZZOL, T. D. et al. Use of medicines and other products for therapeutic purposes among children in Brazil. **Rev Saude Publica**, v. 50, n. suppl 2, p. 12s, Dec 2016.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; KOIFMAN, S.; LEUKEMIA, B. C. S. G. O. I. A. Infant acute leukemia and maternal exposures during pregnancy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 15, n. 12, p. 2336-41, Dec 2006.

RATHMELL, J. P.; VISCOMI, C. M.; ASHBURN, M. A. Management of nonobstetric pain during pregnancy and lactation. **Anesth Analg**, v. 85, n. 5, p. 1074-87, Nov 1997.

REBORDOSA, C. et al. Pre-natal exposure to paracetamol and risk of wheezing and asthma in children: a birth cohort study. **Int J Epidemiol**, v. 37, n. 3, p. 583-90, Jun 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 31, n. 5, p. 986-1000, May 2011.

ROGOSCH, T. et al. Novel bioactive metabolites of dipyron (metamizol). **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 1, p. 101-7, Jan 2012.

ROSENKRANTZ, H.; BRAUDE, M. Acute, subacute and 23-day chronic marijuana inhalation toxicities in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 428-41, Jun 1974.

ROSMOND, R. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 1-10, Jan 2005.

SALES, K. J.; JABBOUR, H. N. Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in reproductive tract physiology and pathology. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 71, n. 3-4, p. 97-117, Jul 2003.

SANTOS, L. H. et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. **Sci Total Environ**, v. 461-462, p. 302-16, Sep 2013.

SATHYANARAYANA, S. et al. Early Prenatal Phthalate Exposure, Sex Steroid Hormones, and Birth Outcomes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 102, n. 6, p. 1870-1878, Jun 2017.

SAWAKI, M. et al. Evaluation of an in utero through lactational exposure protocol for detection of estrogenic effects of ethinyl estradiol on the offspring of rats: preliminary trial. **Reprod Toxicol**, v. 17, n. 3, p. 335-43, 2003 May-Jun 2003.

SCHUG, T. T. et al. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 127, n. 3-5, p. 204-15, Nov 2011.

SHARPE, C. R.; FRANCO, E. L. Use of dipyron during pregnancy and risk of Wilms' tumor. Brazilian Wilms' Tumor Study Group. **Epidemiology**, v. 7, n. 5, p. 533-5, Sep 1996.

SHARPE, R. M. Pediatrics: endocrine disruption and human health effects--a call to action. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, n. 11, p. 633-4, Sep 2011.

SHARPE, R. M.; SKAKKEBAEK, N. E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? **Lancet**, v. 341, n. 8857, p. 1392-5, May 1993.

SILBERNAGL, S.; DESPOPOULOS, A. Hormones and Reproduction. In: **Color atlas of physiology**. 6 ed. Stuttgart, Germany: Thieme, 2009. cap. 11, p. 268.

SNIJDER, C. A. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics during pregnancy and the occurrence of cryptorchidism and hypospadias in the offspring: the Generation R Study. **Hum Reprod**, v. 27, n. 4, p. 1191-201, Apr 2012.

SORDILLO, J. E. et al. Prenatal and infant exposure to acetaminophen and ibuprofen and the risk for wheeze and asthma in children. **J Allergy Clin Immunol**, v. 135, n. 2, p. 441-8, Feb 2015.

STAMMSCHULTE, T. et al. Metamizole (dipyrone)-associated agranulocytosis. An analysis of German spontaneous reports 1990-2012. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 71, n. 9, p. 1129-38, Sep 2015.

STUMPF, M. et al. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Sci Total Environ**, v. 225, n. 1-2, p. 135-41, Jan 1999.

SWAN, S. H. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. **APMIS**, v. 108, n. 12, p. 793-804, Dec 2000.

SWAN, S. H. et al. Semen quality of fertile US males in relation to their mothers' beef consumption during pregnancy. **Hum Reprod**, v. 22, n. 6, p. 1497-502, Jun 2007.

SWAN, S. H. et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 8, p. 1056-61, Aug 2005.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. **Sci Total Environ**, v. 225, n. 1-2, p. 81-90, Jan 1999.

THORPE, P. G. et al. Medications in the first trimester of pregnancy: most common exposures and critical gaps in understanding fetal risk. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, v. 22, n. 9, p. 1013-8, Sep 2013.

TINWELL, H. et al. The screening of everyday life chemicals in validated assays targeting the pituitary-gonadal axis. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 66, n. 2, p. 184-96, Jul 2013.

TOPPARI, J. et al. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environ Health Perspect**, v. 104 Suppl 4, p. 741-803, Aug 1996.

US EPA, United States Environmental Protection Agency. **Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)**. 2017.

UZUN, B. et al. Evaluation of the reproductive toxicity of naproxen sodium and meloxicam in male rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 34, n. 4, p. 415-29, Apr 2015.

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

VANDENBERG, L. N. et al. Human exposure to bisphenol A (BPA). **Reprod Toxicol**, v. 24, n. 2, p. 139-77, 2007 Aug-Sep 2007.

VOM SAAL, F. S. et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. **Toxicol Ind Health**, v. 14, n. 1-2, p. 239-60, 1998 Jan-Apr 1998.

VOM SAAL, F. S. et al. The plastic world: sources, amounts, ecological impacts and effects on development, reproduction, brain and behavior in aquatic and terrestrial animals and humans. **Environ Res**, v. 108, n. 2, p. 127-30, Oct 2008.

VOM SAAL, F. S. et al. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. **Reprod Toxicol**, v. 45, p. 105-16, Jun 2014.

WEITHMANN, K. U.; ALPERMANN, H. G. Biochemical and pharmacological effects of dipyrone and its metabolites in model systems related to arachidonic acid cascade. **Arzneimittelforschung**, v. 35, n. 6, p. 947-52, 1985.

WELSH, M. et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1479-90, Apr 2008.

WENGER, T. et al. The central cannabinoid receptor inactivation suppresses endocrine reproductive functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 284, n. 2, p. 363-8, Jun 2001.

WERLER, M. M. et al. Use of over-the-counter medications during pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v. 193, n. 3 Pt 1, p. 771-7, Sep 2005.

WILHELM, D. et al. SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. **J Biol Chem**, v. 282, n. 14, p. 10553-60, Apr 2007.

WHO-IPCS, World Health Organization – International Programme on Chemical Safety. **Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors**. Geneva, Switzerland. 2002.

WHO, World Health Organization. **State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals**. 2012.

ZANROSSO, C. W. et al. N-acetyltransferase 2 polymorphisms and susceptibility to infant leukemia with maternal exposure to dipyrone during pregnancy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 12, p. 3037-43, Dec 2010.