

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NICOLE GRECHI RIBEIRO

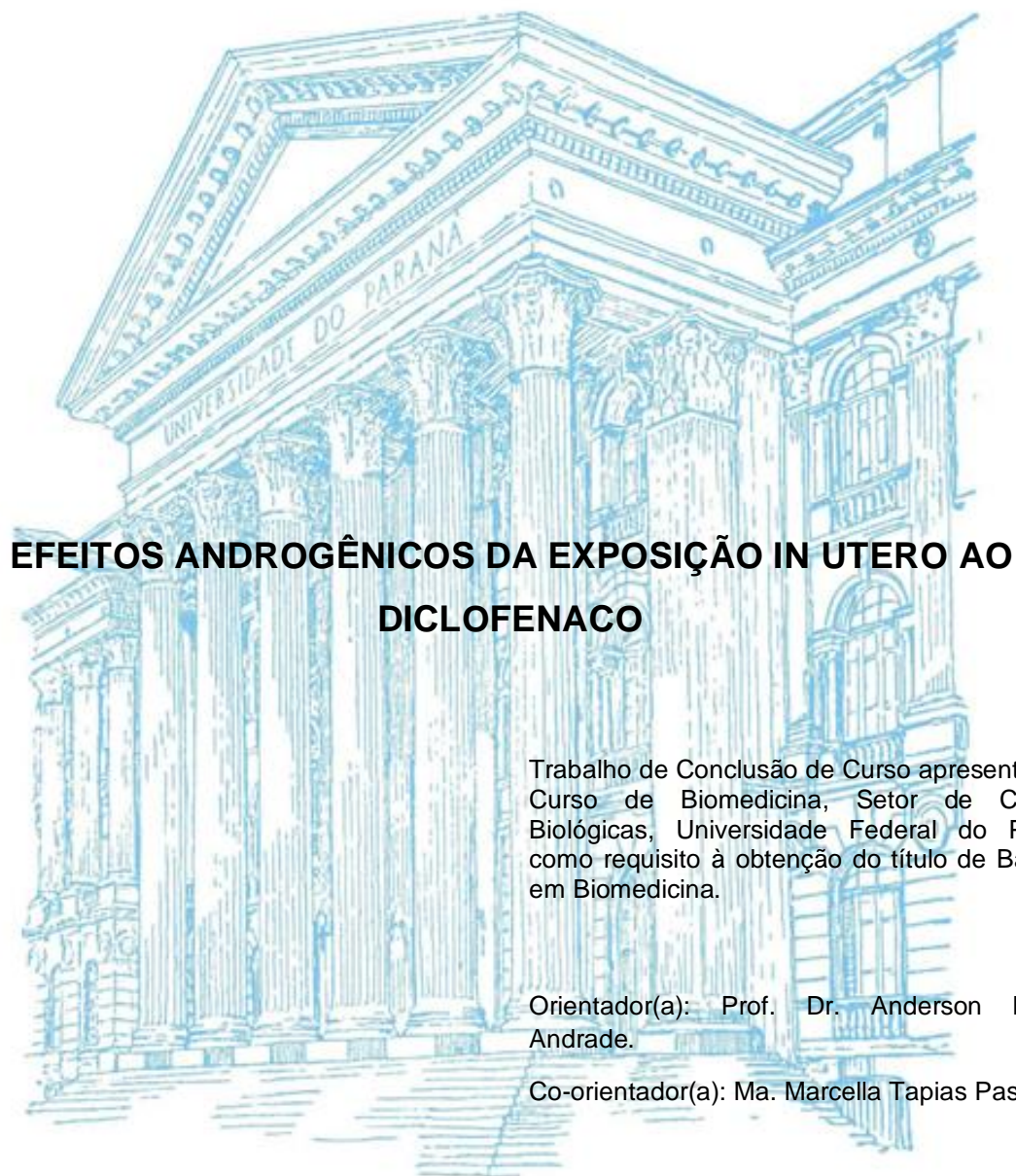


**EFEITOS ANDROGÊNICOS DA EXPOSIÇÃO IN UTERO AO
DICLOFENACO**

CURITIBA

2020

NICOLE GRECHI RIBEIRO



EFEITOS ANDROGÊNICOS DA EXPOSIÇÃO IN UTERO AO DICLOFENACO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson Martino Andrade.

Co-orientador(a): Ma. Marcella Tapias Passoni.

CURITIBA

2020

RESUMO

Desreguladores endócrinos são substâncias encontradas no ambiente em que vivemos e que são capazes de interferir com o sistema endócrino e causar efeitos adversos com alterações hormonais, principalmente em populações suscetíveis. Estamos diariamente expostos a esses compostos, pois os mesmos podem ser encontrados em agrotóxicos, componentes de plásticos, aditivos e conservantes de cosméticos e produtos de higiene pessoal e diversos medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais são exemplos de medicamentos com capacidade de interferir no sistema endócrino. O acesso fácil a esses medicamentos faz com que esse estudo seja importante, pois em populações suscetíveis, como por exemplo gestantes, uma desregulação hormonal pode causar interferência nos processos de diferenciação e desenvolvimento de órgãos e sistemas do bebê. Existem diversos protocolos utilizados para avaliação de desreguladores endócrinos e o método de exposição *in utero* com posterior cultivo das gônadas foi o escolhido para esse experimento devido à sua curta duração e ao reduzido número de animais utilizados. Cinco grupos de ratas prenhes foram expostos à diferentes doses de diclofenaco (0,2, 1 e 5 mg/kg) e controles positivo e negativo. Após o tratamento entre os dias 14 e 18 da gestação (GD14 e GD18), período correspondente à janela de masculinização do desenvolvimento dos fetos machos, esses fetos foram removidos e suas gônadas retiradas para cultivo celular. O meio em que esses testículos foram cultivados foi armazenado e submetido a uma análise para quantificação de testosterona, tanto basal quanto estimulada por hCG. Após as análises estatísticas, foi possível concluir que o diclofenaco não apresenta nenhum dado de toxicidade relativo tanto às fêmeas quanto aos fetos, mas demonstrou um efeito de androgenicidade inesperado ao estudo. Quando incubado com hCG, potencializa a produção da testosterona em comparação a produção basal. Seus efeitos pró-androgênicos devem ser melhor estudados para compreensão da implicância desse resultado.

Palavras-chave: desreguladores endócrinos, diclofenaco, testosterona, hCG.

ABSTRACT

Endocrine disruptors are substances found in the environment in which we live that are capable of interfering with the endocrine system and causing adverse effects with hormonal changes, especially in susceptible populations. We are daily exposed to these compounds as they can be found in pesticides, plastics components, cosmetic additives and preservatives and personal care products and various medications. Analgesics and anti-inflammatories are examples of drugs that can interfere with the endocrine system. The easy access to these drugs, makes this study important, because in susceptible populations, such as pregnant women, a hormonal dysregulation may cause interference in the processes of differentiation and development of organs and systems of the baby. There are several protocols used to evaluate endocrine disruptors and the *in-utero* exposure method with subsequent gonad cultivation was chosen for this experiment due to its short duration and the small number of animals used. Five groups of pregnant rats were exposed to different doses of diclofenac (0.2, 1 and 5 mg / kg) and positive and negative controls. After treatment between days 14 and 18 of pregnancy (GD14 and GD18), period corresponding to the masculinization window of the development of male fetuses, these fetuses were removed, and their gonads removed for cell cultivation. The cultivation medium in which these testicles were cultured was stored and subjected to an analysis for both basal and hCG stimulated testosterone quantification. After statistical analysis, it was concluded that diclofenac does not show any relative toxicity data for both females and fetuses but demonstrated an unexpected androgenicity effect on the study. When incubated with hCG, it enhances testosterone production compared to basal production. Its pro-androgenic effects should be better studied to understand the implication of this result.

Keywords: endocrine disruptors, diclofenac, testosterone, hCG.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 CONTEXTO E PROBLEMA	5
1.2 ANALGÉSICOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS.....	6
1.3 PROTOCOLOS DE ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS	8
1.4 OBJETIVOS	10
1.4.1 Objetivo Geral.....	10
1.4.2 Objetivos Específicos.....	10
1.5 JUSTIFICATIVA	10
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 ANIMAIS	11
2.2 ACASALAMENTO, TRATAMENTO E EUTANASIA.....	11
2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA TESTICULAR FETAL EX VIVO.....	12
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1 TOXICIDADE MATERNA E FETAL DO DICLOFENACO	14
3.2 DICLOFENACO COMO DESREGULADOR ENDÓCRINO	17
REFERÊNCIAS	20

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

Dentre as diversas substâncias que podem apresentar riscos à saúde humana, os desreguladores endócrinos, que possuem a capacidade de interferir com o sistema endócrino, estão ganhando espaço em diversos estudos para compreensão de seus efeitos e mecanismos no organismo humano. Um desregulador endócrino pode ser definido como qualquer agente capaz de causar efeitos adversos por meio da interferência na síntese, secreção, transporte, ligação ou eliminação de hormônios (KABIR et al., 2015). Efeitos esses que são ainda mais preocupantes em populações sensíveis e suscetíveis a efeitos adversos com alterações hormonais, como gestantes, bebês e crianças. Agrotóxicos, componentes de plásticos, aditivos e conservantes de cosméticos e produtos de higiene pessoal e diversos medicamentos são alguns exemplos de agentes que podem atuar como desreguladores endócrinos (GAUDRIAULT et al., 2017; TALSNESS et al., 2009). Dentre os medicamentos, destacam-se alguns analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) de uso comum, como o paracetamol, o ibuprofeno e o ácido acetilsalicílico. Uma das preocupações em relação aos analgésicos está relacionada ao fácil acesso a esses medicamentos e a falta de estudos que incluam gestantes aos grupos de pesquisa para identificar possíveis efeitos tanto na mãe como no bebê. Dores que se tornam mais frequentes durante a gravidez e fazem com que as mulheres busquem alternativas farmacológicas e muitas vezes sem prescrição médica, evidenciam a necessidade da realização de estudos para compreensão dos efeitos desses medicamentos.

A avaliação de medicamentos e outras substâncias químicas como possíveis desreguladores endócrinos requer o uso de protocolos de estudo específicos, delineados para investigar múltiplos mecanismos de desregulação endócrina e efeitos adversos associados (GRAY et al., 2004). A desregulação endócrina no período gestacional é particularmente importante, uma vez que os hormônios são essenciais em diversos processos de diferenciação e desenvolvimento de órgãos e sistemas. Nesse sentido, a diferenciação sexual é particularmente suscetível a ação de desreguladores endócrinos, já que diversos hormônios secretados pelas gônadas fetais, e em particular a testosterona testicular, são responsáveis pela determinação do sexo fenotípico. Agentes antiandrogênicos, que reduzem a produção ou ação de hormônios androgênicos, podem comprometer a masculinização dos órgãos genitais internos, externos e do sistema nervoso central e ocasionar diversas alterações morfológicas e funcionais em indivíduos expostos

in utero (SHARPE, 2006). Embora os protocolos de estudos *in vivo* de longo prazo, como protocolos de exposição *in utero* e lactacional e de múltiplas gerações ainda sejam essenciais na avaliação de risco, novos protocolos de curta duração têm sido propostos a fim de determinar de forma mais rápida e com menor uso de animais, os possíveis efeitos endócrinos e reprodutivos de agentes químicos ambientais e medicamentos.

1.2 ANALGÉSICOS COMO DESREGULADORES ENDÓCRINOS

A associação de analgésicos e desregulação endócrina começou a ser investigada em 1996, em um estudo que descreveu uma associação positiva entre a ingestão de analgésicos durante a gestação e a ocorrência de criptorquidismo em recém-nascidos (BERKOWITZ e LAPINSKI, 1996). Anos depois, outros estudos associaram a ocorrência de hipospádias com o uso de ibuprofeno e ácido acetilsalicílico (KRISTENSEN et al., 2016). Dentre as substâncias com propriedades desreguladoras endócrinas, medicamentos como analgésicos e AINEs fazem parte de um grupo que apresenta efeitos que vem sendo foco de diversos estudos (LIND, 2013; SKAKKEBAEK, 2015).

Os AINEs estão entre as classes de medicamentos mais vendidas no mundo. São medicamentos popularmente conhecidos pelos seus efeitos e amplamente utilizados sem o uso de receitas médicas (ALBERT et al., 2013). O uso disseminado desses medicamentos entre mulheres grávidas faz com que a falta de informação a respeito das implicações relacionadas a esse uso possa levar problemas de saúde tanto para a mãe quanto para o bebê (MCKENNA e MCINTYRE, 2006).

O ibuprofeno é um medicamento com uso disseminado entre gestantes. Seu uso durante a gestação está associado a problemas como criptorquidismo e hipospádias, problemas causados pelo distúrbio da homeostase dos testículos, tanto nas células de Leydig e nas células de Sertoli (BEN MAAMAR et al., 2017). Em 2013, Albert et al. realizaram um estudo comprovando as propriedades desreguladoras endócrinas de diversos analgésicos, incluindo paracetamol, ácido acetilsalicílico e indometacina em cultivo *in vitro* de testículos humanos adultos. Nesse estudo, a produção de testosterona e de Insl3 pelas células de Leydig demonstrou alterações, além da redução da produção de prostaglandinas (ALBERT et al., 2013). Contudo, não há uma clara relação entre a inibição de prostaglandinas e a insuficiência androgênica (KRISTENSEN et al., 2012). De fato, os resultados de alguns estudos sugerem que inibidores de prostaglandinas podem aumentar a produção de testosterona, principalmente após estimulação com o hormônio luteinizante (LH) ou seu análogo funcional gonadotrofina coriônica humana (hCG) (FRUNGIERI et al.,

2006; FUCHS e CHANTHARAKSRI, 1981; ROMANELLI et al., 1995). Em um estudo de exposição *in vitro* de testículos fetais humanos, a indometacina e o ácido acetilsalicílico estimularam a produção de testosterona testicular. Por outro lado, nesse mesmo estudo, foi possível verificar os efeitos do paracetamol na inibição da produção do hormônio semelhante à insulina 3 (Insl3), um hormônio peptídico envolvido na descida testicular na vida fetal, e a associação dessa inibição com a ocorrência de criptorquidismo (MAZAUD-GUITTOT, 2013).

O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroide que possui propriedades analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Foi sintetizado e introduzido ao mercado em 1973 pela empresa Ciba-Geigy, atualmente Novartis. Seus efeitos analgésico e anti-inflamatório o tornaram um medicamento potente contra artrite reumatoide, osteoartrite, espondilite anquilosante e gota aguda (ALTMAN et al., 2015).

O uso do diclofenaco deve ser controlado em mulheres em idade fértil ou no início da gestação (ANDERSEN et al., 2016), uma vez que possui capacidade de atravessar a barreira placentária, fazendo com que haja acúmulo no feto se administrado no primeiro trimestre gestacional. Os riscos desse acúmulo em humanos ainda não são conhecidos (SIU et al., 2000).

Estudos sobre o uso do diclofenaco durante a gestação demonstram que não há associação desse fármaco com malformações ou abortos, porém estudos mais amplos devem ser realizados para resultados mais concretos (CASSINA et al., 2010). O uso de anti-inflamatórios durante a gestação é contra-indicado, principalmente durante o terceiro trimestre, pois pode induzir o fechamento do canal arterial e o diclofenaco foi estudado como um medicamento que pode aumentar esse risco (SHASTRI et al., 2013).

Apesar do diclofenaco ser contra-indicado no período gestacional, muitas gestantes podem utilizar esse medicamento, seja pela prática da automedicação ou pelo uso inadvertido antes do reconhecimento e confirmação da gestação. Contudo, existem poucos estudos que avaliam os possíveis efeitos desreguladores endócrinos do diclofenaco. Ao buscar na literatura, existe um estudo que associa o diclofenaco a uma atividade estrogênica e antiandrogênica, além de efeitos desreguladores endócrinos não associados à reprodução (KLOPČIČ et al., 2018). Um outro estudo em peixes indica um efeito na diferenciação sexual e gametogênese por sua ação como um desregulador endócrino (GRÖNER, 2017). Portanto, apesar de já existirem alguns estudos, as informações acerca das propriedades desreguladoras endócrinas desse fármaco ainda são escassas.

1.3 PROTOCOLOS DE ESTUDO PARA AVALIAÇÃO DE DESREGULADORES ENDÓCRINOS

O estudo de desreguladores endócrinos e seus efeitos começou a ser explorado nos Estados Unidos efetivamente em 1996, devido a falta de informações na área. Os primeiros experimentos incluíam testes *in vitro* e *in vivo* que buscavam avaliar efeitos relacionados à interação de agentes químicos com receptores hormonais e em particular efeitos estrogênicos (FRIEDMAN et al., 2016; GRAY et al., 2004). Dentre os primeiros testes desenvolvidos para o estudo de desreguladores endócrinos na experimentação animal com o uso de ratos, o teste uterotrófico, para detecção de efeitos estrogênicos, e o teste de Hershberger, para detecção de efeitos anti(androgênicos), ainda são usados na pesquisa. (GRAY et al., 2004; PASSONI, 2018)

A dificuldade para compreender e distinguir os efeitos diretos ou indiretos dos desreguladores endócrinos na reprodução por modelos *in vivo* de exposição gestacional, fez com que o modelo *in vitro* pudesse ser desenvolvido e utilizado em diferentes estudos. Em um estudo de 2009, foi utilizado o cultivo de testículos fetais para avaliar os efeitos relacionados ao tempo e à concentração do di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e de seu metabólito, mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP) *in vitro* sobre a função testicular fetal de ratos, sendo possível observar efeitos deletérios sobre as células germinativas (CHAUVIGNÉ et al., 2009). Em 2011, o mesmo grupo de pesquisa utilizou o ensaio de cultivo de testículos fetais *in vitro* para observar os efeitos do MEHP nas células de Leydig, que atuam na produção de andrógenos e de hormônio semelhante à insulina-3 (InsI3), e consequentemente afetam os órgãos reprodutivos dos fetos expostos ao MEHP durante a gestação (CHAUVIGNÉ et al., 2011).

Outro método utilizado para estudo de desreguladores endócrinos, considerado rápido para detectar alterações na produção de testosterona fetal, é o teste *ex vivo*, também utilizado no presente estudo. Nesse teste, ratas prenhes são expostas às substâncias teste durante a janela crítica para a diferenciação sexual, entre os dias 14 e 18 de gestação, e, ao final do tratamento, as gônadas fetais são retiradas para a avaliação da produção hormonal *ex vivo* e morfologia. Nesse contexto, esse teste já foi utilizado para a avaliação da produção de testosterona *ex vivo* de fetos expostos à ftalatos e de outros agentes químicos capazes de suprimir a esteroidogênese e causar efeitos negativos no desenvolvimento de órgãos reprodutores com consequências reprodutivas que podem ser observadas posteriormente na idade adulta por meio de outros protocolos experimentais (FURR et al., 2014).

Além dos efeitos sobre a produção de testosterona testicular, os ensaios *in vitro* e *ex vivo* de exposição de gônadas fetais também revelaram alterações morfológicas e na maturação das células germinativas de testículos e ovários fetais (JOBBLING et al., 2011; DEAN et al., 2016). Dentre os possíveis marcadores que podem ser utilizados na avaliação da maturação das células germinativas em testículos fetais de ratos destacam-se o octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) e o doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (DMRT1), identificados por imuno-histoquímica. O OCT4 é um fator de transcrição em células germinativas imaturas e sua presença ajuda a acompanhar a diferenciação das gônadas fetais. Por outro lado, o DMRT1 é um marcador dos estágios da divisão celular, expresso em células germinativas de ratos a partir do dia gestacional 15 e que deixa de ser expresso no ovário fetal à medida que as células germinativas entram em meiose (DEAN et al., 2016).

Por meio do protocolo de exposição *in utero* ao diclofenaco, nesse estudo foi possível avaliar os efeitos do analgésico atuando diretamente no período da janela de masculinização (GD14 ao GD18) dos machos expostos. A escolha do protocolo se deu devido à capacidade de analisar um período específico e assim, obter resultados de toxicidade com um número reduzido de animais e um tempo curto de experimentação.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Investigar os possíveis efeitos desreguladores endócrinos do diclofenaco durante o período crítico para o desenvolvimento sexual de fetos machos.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de testosterona basal e estimulada por gonadotrofina coriônica humana (hCG) em testículos fetais de ratos expostos *in utero* ao diclofenaco.
- Avaliar a toxicidade do diclofenaco durante a gestação.
- Avaliar os efeitos do diclofenaco na prole.

1.5 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a gestação é um período crítico para a desregulação endócrina e que a diferenciação sexual pré-natal é amplamente suscetível a perturbações hormonais, torna-se necessário avaliar os possíveis efeitos desreguladores endócrinos de analgésicos em períodos críticos para o desenvolvimento sexual durante a gestação. Ao contrário do paracetamol e do ibuprofeno, o diclofenaco, um analgésico e anti-inflamatório amplamente utilizado pela população geral, e eventualmente por gestantes, não foi extensivamente estudado em relação ao seu potencial de atuação como um desregulador endócrino. Assim, no presente estudo, foi utilizado um método de curta duração para a avaliação do diclofenaco como um desregulador endócrino e seus possíveis efeitos sobre o desenvolvimento e a função das gônadas fetais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos (*Rattus norvegicus*), da variedade Wistar, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Esse experimento foi realizado sob o CEUA 1163. Durante todo o experimento os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Toxicologia Reprodutiva, no Departamento de Farmacologia da UFPR, em caixas de polipropileno, com no máximo quatro animais por caixa. Os animais viviam com água e ração à vontade, num ciclo claro/escuro de 12h (luzes acesas de 7h00 às 19h00). A temperatura da sala era mantida constante em 22 ± 2 °C.

2.2 ACASALAMENTO, TRATAMENTO E EUTANASIA

Fêmeas adultas de 90 dias foram acasaladas com ratos machos adultos por três horas na proporção de três fêmeas para cada macho. Após o período de três horas, cada fêmea foi submetida a um lavado vaginal para verificação da presença de espermatozoides no esfregaço para que fosse confirmada a cópula. Quando verificada a presença do espermatozoide, dia gestacional zero (GD0), as fêmeas foram separadas nos grupos experimentais. Os acasalamentos foram feitos até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para a realização do experimento. Ao completar o décimo quarto dia gestacional (GD14) iniciou-se o tratamento das fêmeas prenhes até o décimo oitavo dia (GD18), período correspondente à janela da masculinização dependente de androgênios em ratos. Os grupos foram finalizados com o seguinte n amostral: os grupos controle negativo, diclofenaco 0,2 e controle positivo com sete fêmeas prenhes em cada e os grupos diclofenaco 1 e diclofenaco 5 com oito fêmeas prenhes em cada.

Para esse experimento, foi utilizado diclofenaco em sal manipulado e as doses foram escolhidas com base na dose terapêutica para humanos com extrapolação alométrica para ratos. Outro fator que influenciou na escolha das doses e concentrações foi o estudo da toxicologia reprodutiva materna e fetal. O diclofenaco é administrado em humanos numa dose de 150 mg por dia no máximo. Ao considerar um peso de 70 kg, obtém-se uma dose de 2,4 mg/kg/dia. Para o cálculo da dose alométrica para ratos foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{150 \times 0,25^{0,75}}{70^{0,75}} = \frac{150 \times 0,3535}{24,200} = 2,20 \text{ mg totais para o animal-alvo}$$

Considerando que o animal-alvo possui um peso médio de 250 g, a dose correspondente é de aproximadamente 9 mg/kg/dia. Dados da literatura indicam que a dose máxima que não apresenta toxicidade materna e fetal em ratos é de 5 mg/kg/dia (EMEA, 2003). Sendo assim, as doses de diclofenaco utilizadas nesse experimento foram de 0,2 mg/kg/dia, 1 mg/kg/dia e 5 mg/kg/dia. Mais dois grupos foram tratados para controle positivo e negativo do experimento. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada na dose de 2 mL/kg e controle positivo foi tratado com di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) na dose de 750 mg/kg/dia. Todos os tratamentos foram administrados por gavagem.

Ao completarem 18 dias de gestação, dentro de um período de uma a três horas após a última administração do tratamento, as fêmeas foram previamente sedadas em câmara anestésica com isoflurano e posteriormente decapitadas. O sangue das ratas foi coletado. Após a eutanásia das progenitoras, os fetos foram removidos, pesados e decapitados. Cada feto identificado foi sexado por meio da visualização das gônadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica. Os quatro primeiros machos de cada ninhada e as duas primeiras fêmeas tiveram suas gônadas removidas e encaminhadas de acordo com a seguinte tabela:

FETO	GÔNADA ESQUERDA	GÔNADA DIREITA
M1	Cultivo sem hCG	Cultivo com hCG
M2	Cultivo sem hCG	Cultivo com hCG
M3	PCR	Histologia
M4	PCR	Imunohistoquímica
F1	PCR	Histologia
F2	PCR	Imunohistoquímica

Tabela 1: Distribuição das gônadas removidas às análises submetidas. M: macho. F: fêmea.

Outros parâmetros foram analisados para avaliação da toxicidade durante a gestação. São esses: acompanhamento do peso materno nos dias 0, 7, 14, 15, 16, 17 e 18 da gestação, razão sexual e viabilidade fetal, contagem do número total de implantes (a fim de identificar reabsorções tardias ou precoces) e peso e tamanho da ninhada.

2.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TESTOSTERONA TESTICULAR FETAL EX VIVO

Dois No teste de avaliação da produção de testosterona testicular fetal ex vivo foi utilizado o protocolo proposto por Furr et al. (2014) a fim de investigar o possível efeito do diclofenaco na inibição da esteroidogênese testicular fetal. Os grupos formados para a realização desse teste foram: grupo veículo, tratado com água, grupos que receberam

diclofenaco nas doses de 0,2, 1 e 5 mg/kg e o grupo controle positivo, tratado com DEHP na dose de 750 mg/kg. Para avaliação da produção basal de testosterona os testículos foram incubados individualmente em poços contendo 500 µl do meio M-199 (Vitrocell, Campinas, Brazil) por 3 horas à 37 °C e com ar ambiente sob agitação, conforme descrito por Wilson et al. (2004). Já para a avaliação da produção estimulada, os testículos direitos de cada feto foram incubados nas mesmas condições, porém na presença de 100 mUI/mL de hCG. Após as três horas de incubação, os meios de cada poço foram coletados, centrifugados e congelados a -20 °C e posteriormente submetidos a enzimaímunoenensaio no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Reprodutiva Animal da UFPR. A quantificação de testosterona foi feita utilizando anticorpos antitesterona (R156/7), obtidos de Coralie Munro na Universidade da Califórnia, Davis (Davis, CA, EUA), e os respectivos hormônios conjugados com peroxidase (Horseradish peroxidase – HRP) como competidores. Os ensaios foram realizados de acordo com Munro et al. (1991) e Brown et al. (2004). Os valores de absorbância foram obtidos após leitura das placas em leitor de microplaca (BioTek, Winooski, USA; 405 nm).

As análises de PCR e imunohistoquímica serão realizadas posteriormente, como parte de um estudo maior.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do experimento foram analisados por ANOVA (análise de variância) de duas vias seguido pelo teste de Dunnet e o teste de Bonferroni para comparação dos dados da produção de testosterona basal e estimulada por hCG. Já os outros parâmetros foram analisados através do teste t de Student. O programa utilizado para a análise estatística foi GraphPad Prisma® Software 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 TOXICIDADE MATERNA E FETAL DO DICLOFENACO

Profissionais Ao analisar os dados obtidos durante a gestação e após a eutanásia das fêmeas prenhes, não foi possível identificar nenhum sinal de toxicidade, seja ela materna ou fetal. Observando a Figura 1, o ganho de peso das mães durante a gestação até o início do tratamento aconteceu de forma gradativa como o esperado. Ao comparar qualquer um dos grupos teste com o controle negativo (veículo), o ganho de massa não apresentou nenhuma diferença significativa entre os mesmos, seja no período anterior ou após o início do tratamento.

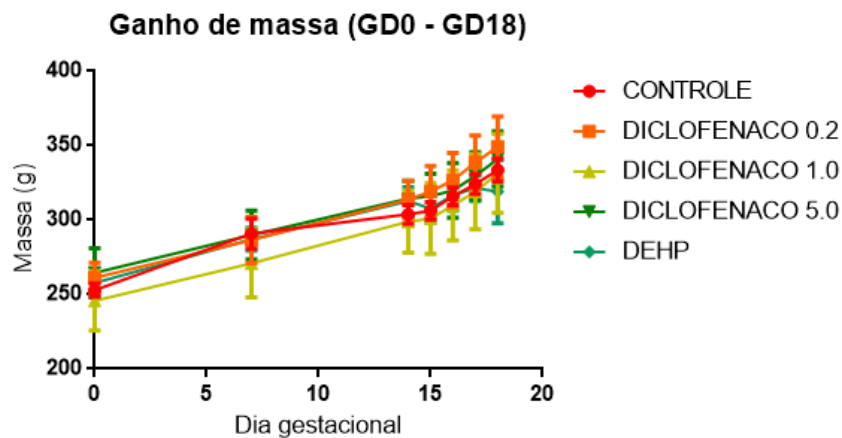


Figura 1: Ganho de massa das fêmeas do GD0 ao GD18 (identificação da gestação até a eutanásia). n=7 ou 8 fêmeas por grupo.

Outro dado possível de identificar alguma toxicidade no tratamento das fêmeas durante a gestação, seria a diferença de peso entre o GD18 e o GD14. Ao visualizar o gráfico (Figura 2), é possível identificar uma redução no peso das fêmeas conforme o aumento da dose de diclofenaco, porém, esse dado, quando submetido a uma análise estatística, também não demonstra nenhuma diferença significativa para que possa ser possível descrever uma toxicidade causada pelo diclofenaco.

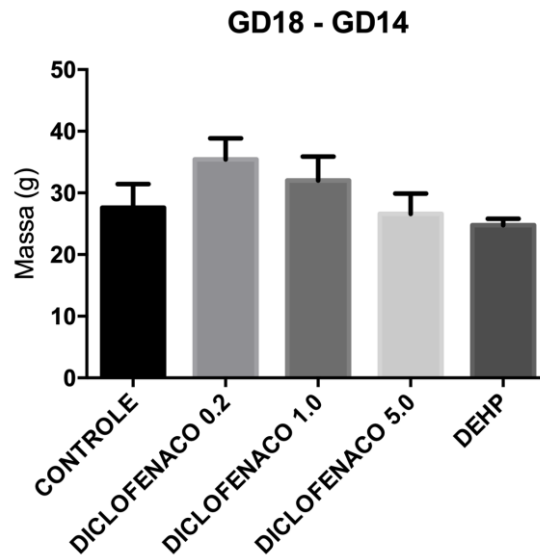


Figura 2: Variação do peso das fêmeas do início do tratamento (GD14) a eutanásia (GD18). n=7 ou 8 fêmeas por grupo.

Os dados obtidos com as informações das ninhadas também não apresentaram nenhuma evidência de toxicidade. O peso das ninhadas entre os grupos, tanto de machos e fêmeas separados como da ninhada como um todo, o tamanho das ninhadas e a razão sexual (M/F) (Figuras 3, 4, 5, 6 e 7) não demonstraram nenhuma alteração significativa para comprovação de algum efeito do diclofenaco. Quando submetidos a uma análise estatística, a única diferença encontrada foi na razão sexual entre o grupo tratado com diclofenaco na dose de 5 mg/kg e o grupo controle negativo, porém, ao analisar o grupo tratado com DEHP, não foi vista nenhuma diferença. Tendo em vista que o efeito sobre a razão sexual foi observado em uma única dose de diclofenaco, a relevância biológica desse dado é incerta.

De maneira geral, os dados gestacionais e fetais investigados, incluindo o ganho de massa na gestação e a massa, número e viabilidade dos fetos, indicam ausência de toxicidade materna do diclofenaco nas doses testadas. A investigação da toxicidade materno-fetal é essencial na interpretação de dados de toxicidade endócrina e reprodutiva, uma vez que a indução de toxicidade sistêmica pode resultar em alterações hormonais e reprodutivas inespecíficas, relacionadas ao estado geral de saúde do animal (DANIELSSON, 2012).

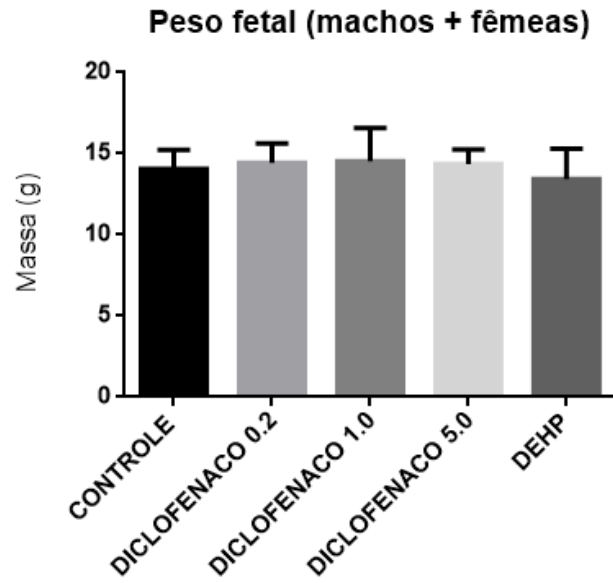


Figura 3: Peso das ninhadas.

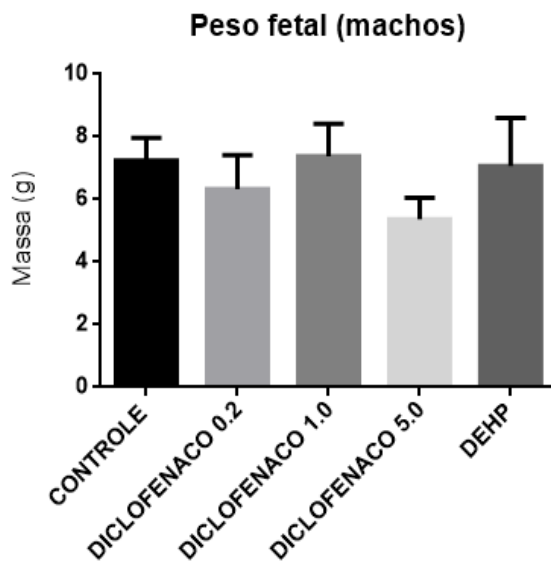


Figura 4: Peso dos fetos machos.

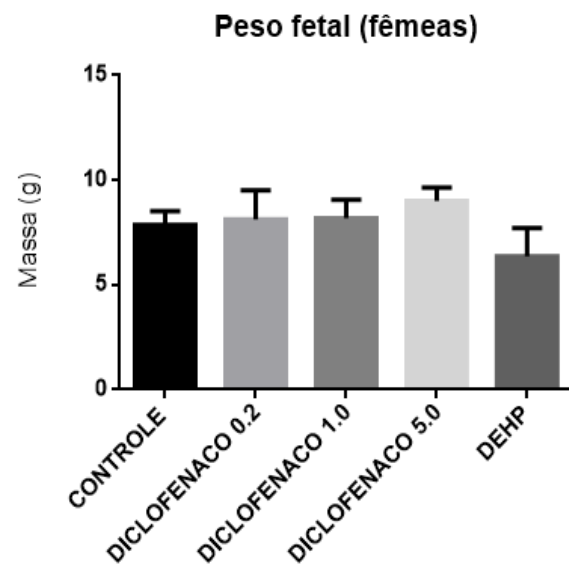


Figura 5: Peso dos fetos fêmeas.

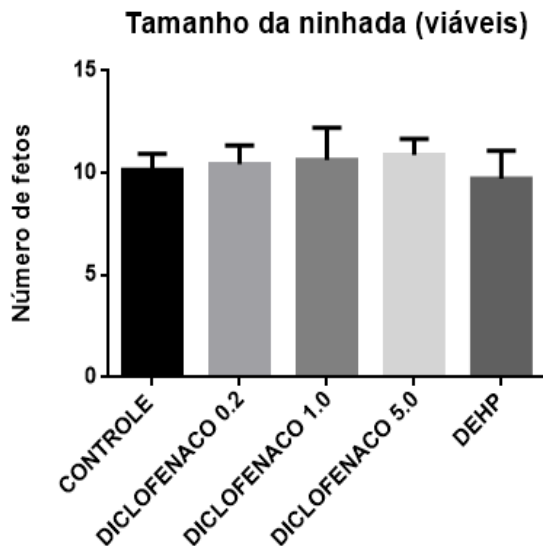


Figura 6: Tamanho da ninhada (fetos viáveis).

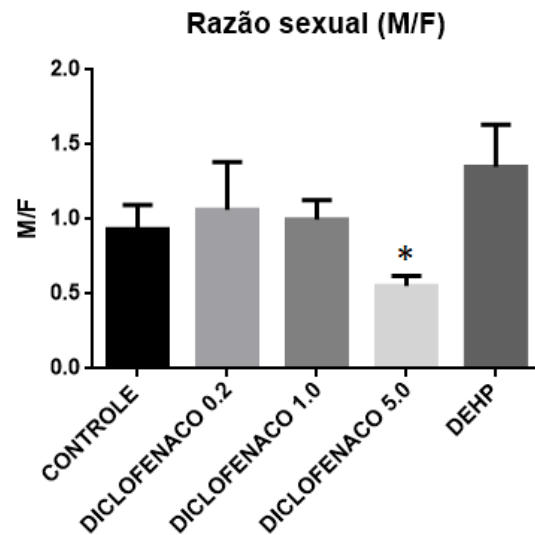


Figura 7: Razão sexual (machos/fêmeas). * indica diferença estatística entre o diclofenaco 5,0 mg/kg e o controle (teste t de Student).

3.2 DICLOFENACO COMO DESREGULADOR ENDÓCRINO

Apesar O experimento *ex vivo* foi conduzido com o objetivo de identificar um efeito desregulador endócrino do diclofenaco, interferindo de alguma forma na produção de testosterona pelos testículos fetais. Os resultados obtidos da análise do hormônio nos meios de cultivo com produção basal, não demonstraram nenhum efeito do diclofenaco. Já ao analisar a produção de testosterona estimulada pela presença do hCG, os resultados foram diferentes da nossa hipótese inicial de que o diclofenaco poderia inibir a esteroidogênese testicular fetal. A análise de ANOVA de duas vias revelou efeitos significativos do tratamento ($p < 0,001$), estimulação por hCG ($p < 0,001$) e interação ($p = 0,027$) (Figura 8). Em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo DEHP, houve aumento significativo na produção de testosterona com a estimulação com hCG, em relação aos testículos não estimulados (produção basal). Além disso, o tratamento com DEHP reduziu significativamente a produção basal e estimulada por hCG em relação ao controle. Embora o tratamento com diclofenaco não tenha induzido alterações na produção basal de testosterona em relação ao controle, observamos um aumento dose-dependente na produção de testosterona estimulada por hCG. Apesar de contrariar a nossa hipótese inicial, os nossos resultados são consistentes com os dados de outros estudos que apontam para efeitos estimulatórios da produção de testosterona testicular em animais expostos a inibidores da síntese de prostaglandinas (FRUNGIERI et al., 2012; FUCHS AND CHANTHARAKSRI, 1982; ROMANELLI et al., 1995). Em 1981, Fuchs e Chantharaksri, ao

estudar os efeitos da prostaglandina F2 α (PGF2 α) na regulação da produção de testosterona estimulada por LH em testículos de ratos machos adultos, conduziram um experimento muito semelhante ao nosso da incubação dos testículos fetais (com produção basal e estimulada de testosterona). O que os pesquisadores descobriram é que testículos na presença de um anti-inflamatório com um mecanismo de ação como o do diclofenaco, ou seja, inibição da biossíntese de prostaglandinas, atua estimulando a produção de testosterona regulada por gonadotrofinas.

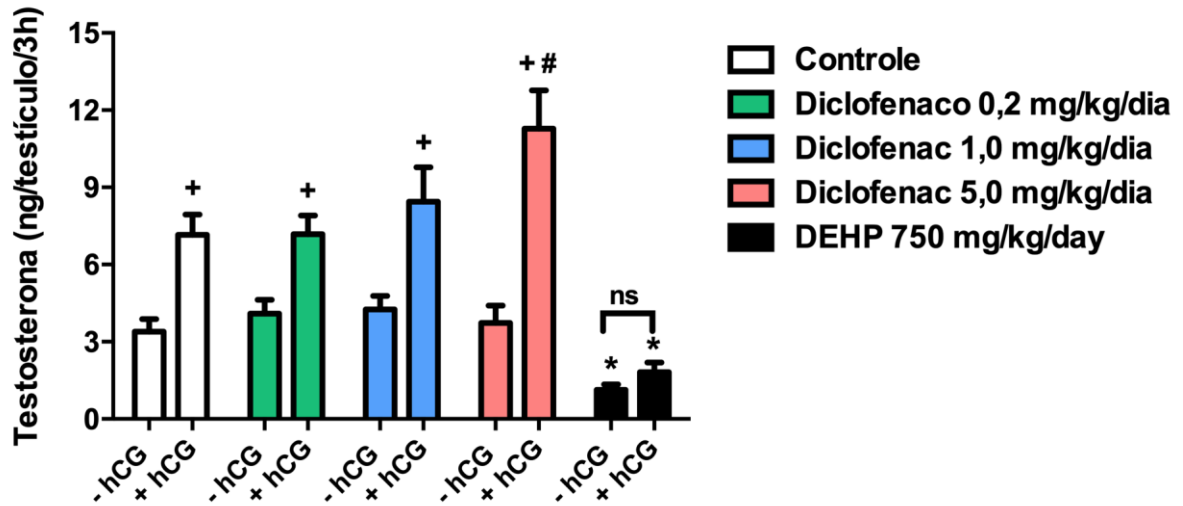


Figura 8: Produção *ex vivo* de testosterona basal e estimulada por hCG em testículos fetais de ratos expostos *in utero* ao diclofenaco e ao DEHP. ANOVA de duas vias. Houve efeitos significativos para os fatores tratamento ($p < 0,001$), estimulação por hCG ($p < 0,001$) e interação ($p = 0,027$). + indica diferença significativa em relação ao grupo sem hCG do mesmo tratamento (Bonferroni); * indica diferença significativa em relação aos respectivos grupos controle expostos ao veículo (Dunnett); # indica aumento na produção de testosterona estimulada por hCG em relação ao respectivo grupo controle exposto ao veículo ($p = 0,077$; Dunnett). ns = não significativo

A PGF2 α possui um papel importante na regulação da ação tanto do LH quanto do hCG no corpo lúteo ou nas células de Leydig. Acredita-se que o mecanismo das prostaglandinas seja na interferência da ação de gonadotrofinas em seus receptores nas células alvo, regulando negativamente a produção de hormônios esteroides (FUCHS, 1981). No testículo, as prostaglandinas atuam como reguladores locais da produção de testosterona. Nesse contexto, a inibição da produção de prostaglandinas por agentes anti-inflamatórios, como o diclofenaco, resultaria na inibição síntese de testosterona induzida por gonadotrofinas, como observado no nosso estudo. No entanto, a relação entre a inibição da síntese de prostaglandinas e a produção de testosterona testicular parece envolver outros fatores, como os tipos de prostaglandinas presentes em diferentes estágios de desenvolvimento. Sabe-se, por exemplo, que a expressão de SOX-9, um fator de transcrição essencial para a diferenciação testicular no início da gestação, é parcialmente

dependente de prostaglandina D2. Nesse sentido, foi postulada a hipótese de que analgésicos e anti-inflamatórios poderiam alterar a diferenciação gonadal *in utero* e ocasionar efeitos desreguladores endócrinos secundários ao desenvolvimento anormal das células de Sertoli e Leydig fetais. No entanto, é possível que os efeitos antiandrogênicos de algumas dessas drogas estejam relacionados a outros mecanismos de ação, independentes da inibição da síntese de prostaglandinas. Em relação ao diclofenaco, são necessários estudos complementares para determinar os efeitos da exposição *in utero* sobre o desenvolvimento e maturação de células germinativas nas gônadas fetais, assim como possíveis efeitos adversos sobre o desenvolvimento reprodutivo pós-natal.

O presente estudo demonstrou que a exposição *in utero* ao diclofenaco pode modificar a produção de testosterona *ex vivo* induzida por hCG em testículos fetais. As possíveis repercussões desse efeito pró-androgênico, assim como o impacto dessa droga sobre outros aspectos do desenvolvimento gonadal, devem ser examinados em estudos futuros.

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.
- ALTMAN, R. et al. Advances in NSAID development: evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. **Drugs**, v. 75, n. 8, p. 859-77, Mai 2015.
- ANDERSEN, J. T. et al. Diclofenac/misoprostol during early pregnancy and the risk of miscarriage: a Danish nationwide cohort study. **Arch Gynecol Obstet**, v. 294, n. 2, p. 245-50, Ago 2016.
- BEN MAAMAR, M. et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. **Sci Rep**, v. 7, p. 44184, Mar 2017.
- BERKOWITZ, G. S.; LAPINSKI, R. H. Risk factors for cryptorchidism: a nested case-control study. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v. 10, p. 39–51, Jan 1996.
- BROWN J. et al. **Endocrine Manual for the Reproductive Assessment of Domestic and Non-domestic Species**. Virginia: Conservation and Research Center, Smithsonian's National Zoological Park Front Royal, 2004.
- DANIELSSON, B.R. Maternal toxicity. **Teratogenicity Testing**, v. 947, p. 331-325, Out 2012.
- CASSINA, M. et al. First trimester diclofenac exposure and pregnancy outcome. **Reproductive Toxicology**, v. 30, Nov 2010.
- CHAUVIGNÉ, F. et al. Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. **Environ Health Perspect**, v. 117, n. 4, p. 515-21, Apr 2009.
- CHAUVIGNÉ, F. et al. Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Directly Alters the Expression of Leydig Cell Genes and CYP17 Lyase Activity in Cultured Rat Fetal Testis. **Plos One**, v. 6(11), Nov 2011.
- DEAN, A. et al. Analgesic exposure in pregnant rats affects fetal germ cell development with inter-generational reproductive consequences. **Sci Rep**, v. 6, p. 19789, Jan 2016.
- EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines and Inspections. **Committee for veterinary medicinal products – Diclofenac**, Set 2003.
- GAUDRIAULT, P. et al. Endocrine Disruption in Human Fetal Testis Explants by Individual and Combined Exposures to Selected Pharmaceuticals, Pesticides, and Environmental Pollutants. **Environ Health Perspect**, v. 125, Ago 2017.
- FUCHS, A.; CHANTHARAKSRI, U. Prostaglandin F_{2α} regulation of LH-stimulated testosterone production in rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 492-501, Out 1981.
- FRIEDMAN, K. P. et al. A predictive data-driven framework for endocrine prioritization: a triazole fungicide case study. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 46, p. 735-833, Jun 2016.

FRUNGIERI, M. B. et al. Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin F₂ α in Syrian Hamster Leydig Cells: Inhibitory Role on Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin-Stimulated Testosterone Production. **Endocrinology**, v. 147, p. 4476-4485, Set 2006.

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, Ago 2014.

GRAY, L. E. et al. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **ILAR Journal**, v. 45(4), p. 425, 2004.

GRÖNER, F. et al. Chronic diclofenac exposure affects gill integrity and pituitary gene expression and displays estrogenic activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 166, p. 473-481, Jan 2017.

JOBLING, M. S. et al. Effects of di(n-butyl) phthalate exposure on foetal rat germ-cell number and differentiation: identification of age-specific windows of vulnerability. **International Journal of Andrology**, v. 34, Out 2011.

KABIR, E. R. et al. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 40, p. 241-258, Jul 2015

KLOPČIČ, I. et al. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. **Toxicology Letters**, v. 294, p. 95-104, Set 2018.

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.

KRISTENSEN, D. M. et al. Analgesic use - prevalence, biomonitoring and endocrine and reproductive effects. **Nat Rev Endocrinol**, v. 12, n. 7, p. 381-93, Jul 2016.

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.

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.

MCKENNA, L.; MCINTYRE, M. What over-the-counter preparations are pregnant women taking? A literature review. **J Adv Nurs**, v. 56, n. 6, p. 636-45, Dez 2006.

ROMANELLI, F. M. et al. Arachidonic acid and its metabolites effects on testosterone production by rat Leydig cells. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 18, p. 186-193, Mar 1995.

MUNRO, C. J. et al. Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay. **Clin Chem**, v. 37, n. 6, p. 838-44, Jun 1991.

PASSONI, M. T. et al. Assessment of the analgesic dipyron as a possible (anti)androgenic endocrine disruptor. **Toxicology Letters**, v. 285, p. 139-147, Mar 2018.

SHARPE, R. M. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinisation. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, p. 91-110, Mar 2006.

SHASTRI, A. T. et al. Maternal Diclofenac Medication in Pregnancy Causing in Utero Closure of the Fetal Ductus Arteriosus and Hydrops. **Pediatric Cardiology**, v. 34, p. 1925–1927, Dez 2013.

SIU, S. S. et al. A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. **Hum Reprod**, v. 15, n. 11, p. 2423-5, Nov 2000.

SKAKKEBAEK, N.E. et al. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 55-97, Nov 2015.

TALSNESS, C. E. et al. Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 364(1526), p. 2079–2096, Jul 2009.

WILSON, V. S. et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. **Toxicol Lett**, v. 146, n. 3, p. 207-15, Fev 2004.