

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
HELOÍSA GONÇALVES MELDOLA

EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO DICLOFENACO EM RATOS E SEUS EFEITOS  
NOS TESTES DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E PREFERÊNCIA AO  
PARCEIRO

CURITIBA

2019

HELOÍSA GONÇALVES MELDOLA

EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL AO DICLOFENACO EM RATOS E SEUS EFEITOS  
NOS TESTES DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO E PREFERÊNCIA AO  
PARCEIRO

Monografia apresentada à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II (Bmed006), Curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Joel Martino Andrade

CURITIBA

2019

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e proteção ao longo desse tempo, me auxiliando a chegar ao final da graduação, alcançando essa conquista.

Aos meus pais, Cássia e Gilberto, por todo apoio, suporte, carinho, preocupação, puxão de orelha, e principalmente paciência porque sabemos que eu não sou uma pessoa fácil, além de tantos outros motivos que só podem significar o amor que vocês têm por mim, e o mínimo que posso fazer agora é dizer obrigada.

À minha irmã, Mariana, que me aguentou extravasar nos momentos mais loucos e me ajudou a rir das situações de vergonha em que eu me enfiava.

À Mandy, minha amiga chiclete que grudou e nunca mais soltou, sempre ficou do meu lado disposta a me ouvir e dar suas opiniões malucas e verdadeiras, e não importa o caso, sempre sei que posso contar contigo.

À Larissa, Luana, Caroline, Khauan e Bruna, meus amigos de ensino médio, vocês foram as minhas constantes por 3 anos, e na graduação pensamos que nunca nos veríamos, mas estamos aí, alguns de nós já formados até e mantendo essa amizade mais que especial, nem consigo imaginar como teria sido essa experiência sem vocês.

Às agora biomédicas Amanda, Franciê e Nicoli, minhas parceiras do crime na graduação e que me aguentaram todos os dias, nos meus dias mais ranzinhas, desesperadores, alegres e engraçados do curso, vocês fizeram todo o percurso ser mais leve com a companhia e parceria de vocês, e não posso deixar de dizer que se cheguei hoje no final, vocês tiveram importantíssimo papel para isso.

Às maravilhosas integrantes do Laboratório de Toxicologia Reprodutiva da UFPR, Sara, Gabriela, Tatiana, Marcella, Giovanna e Nicole, que me acolheram e me deixaram fazer parte desse grupo diferente e doido, mas que me abriu oportunidades e proporcionou vivências que eu não imaginava que teria. À mestranda Daniele, um agradecimento especial, já que sem o seu projeto, seus animais, seu apoio e parceira, pouquíssimo desse trabalho teria sido feito.

Ao professor Paulo Roberto Dalsenter, sou grata, pois foi quem possibilitou que eu pusesse fazer parte desse laboratório, e deixou que eu utilizasse e bagunçasse seu laboratório para a execução desse trabalho.

Por fim, mas não menos importante, ao meu professor orientador, Dr<sup>o</sup> Anderson Joel Martino Andrade, que aceitou orientar esse trabalho de alguém com quem quase não tinha tido contato e que é meio difícil de trabalhar, sou muito grata por toda a ajuda, acompanhamento e oportunidade.

## RESUMO

Desreguladores endócrinos são substâncias que apresentam capacidade de causar alterações significativas no sistema endócrino de indivíduos expostos em diferentes fases da vida, incluindo o período gestacional. Podem ser substâncias como agrotóxicos, plastificantes e medicamentos, porém essa lista pode aumentar com antigas ou novas substâncias. Alguns efeitos adversos decorrentes da ação dessas substâncias podem estar relacionados com alterações na diferenciação sexual do sistema nervoso central. Recentemente, muitos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm sido identificados como agentes desreguladores endócrinos capazes de alterar a diferenciação sexual e causar distúrbios comportamentais em modelos animais. O diclofenaco é um dos AINEs mais utilizado no mundo, sendo de baixo custo e fácil acesso pela população em geral. A exposição pré-natal pode ocorrer pela prática da automedicação ou pela ingestão de alimentos e água contaminados. O presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto da exposição gestacional ao diclofenaco sobre aspectos comportamentais da prole, especialmente em relação a alguns comportamentos sexualmente dimórficos. Ratas Wistar prenhes foram separadas em diferentes grupos e expostas diariamente por via oral, do 10<sup>o</sup> ao 20<sup>o</sup> dia gestacional, a 3 diferentes doses de diclofenaco (5, 1 e 0,2 mg/kg/dia), uma dose por grupo, e a prole investigada quanto aspectos comportamentais na vida adulta. Não foram detectados sinais de toxicidade geral nas progenitoras e na prole. Após o 70<sup>o</sup> dia pós-natal foram executados os testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e preferência ao parceiro, de modo a verificar possíveis alterações em comportamentos tipo-ansiedade e na preferência/motivação sexual, respectivamente. Ao contrário do grupo controle, os animais expostos *in utero* ao diclofenaco não exibiram preferência pelo compartimento feminino no teste de preferência ao parceiro em nenhuma das doses testadas, indicando um possível prejuízo na preferência sexual. Quanto à ansiedade e à locomoção avaliadas pelo LCE não foram encontradas diferenças significativas. Em conjunto com resultados de outros estudos sobre os efeitos desreguladores endócrinos e alterações no neurodesenvolvimento de analgésicos e AINEs, nossos dados contribuem para alertar a comunidade médica acerca de possíveis novos riscos do uso gestacional dessa classe de medicamentos e a importância de seu uso racional. Estudos futuros devem ser conduzidos no sentido de ampliar o conhecimento sobre os efeitos neurocomportamentais desses medicamentos, bem como os mecanismos envolvidos.

Palavras-chave: desregulador endócrino, exposição pré-natal, diclofenaco, ratos, testes comportamentais

## ABSTRACT

Endocrine disruptors are substances that are capable of causing significant changes in the endocrine system of individuals exposed at different stages of life, including the gestational period. These may be substances such as pesticides, plasticizers and pharmaceuticals, but this list may increase with old or new substances. Some adverse effects resulting from the action of these substances may be related to changes in the sexual differentiation of the central nervous system. Recently, many analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been identified as endocrine disrupting agents capable of altering sexual differentiation and causing behavioral disorders in animal models. Diclofenac is one of the most widely used NSAIDs in the world, being inexpensive and easily accessible to the general population. Prenatal exposure may occur through self-medication or ingestion of contaminated food and water. The present study aims to evaluate the impact of gestational exposure to diclofenac on behavioral aspects of rat offspring, especially in relation to some sexually dimorphic behaviors. Pregnant Wistar rats were separated in different groups and exposed daily by oral route, from the 10th to the 20th gestational day, to 3 different doses of diclofenac (5, 1 and 0.2 mg/kg/day), one dose per group, and the offspring investigated for behavioral aspects in adulthood. No signs of general toxicity were detected in dams and offspring. After the 70th postnatal day, the elevated plus maze (EPM) and partner preference tests were performed to examine possible changes in anxiety-like behaviors and sexual preference/motivation, respectively. In contrast to the control group, animals exposed *in utero* to diclofenac showed no preference for the female compartment in the partner preference test at any tested doses, indicating a possible impairment in sexual preference. Regarding anxiety and locomotion evaluated by the EPM, no significant differences were found. Together with results from other studies on endocrine disrupting effects and changes in neurodevelopment of painkillers and NSAIDs, our data contribute to alert the medical community about possible new risks of gestational use of this class of drugs and the importance of their rational use. Future studies should be conducted to broaden the knowledge about the neurobehavioral effects of these drugs, as well as the mechanisms involved.

Keywords: endocrine disruptors, prenatal exposure, diclofenac, rats, behavior tests

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
2.1 Desreguladores endócrinos.....	8
2.2 Analgésicos e Anti-inflamatórios como desreguladores endócrinos.....	9
2.3 Diclofenaco.....	11
2.4 Influências sobre o comportamento .....	13
3 JUSTIFICATIVA .....	15
4 OBJETIVOS .....	16
4.1 Objetivos Gerais.....	16
4.2 Objetivos Específicos .....	16
5 METODOLOGIA.....	17
5.1 Plano experimental.....	17
5.2 Animais.....	17
5.3 Acasalamentos.....	17
5.4 Doses e tratamento .....	18
5.5 Dados gestacionais e da prole .....	19
5.6 Testes comportamentais .....	20
5.6.1 Labirinto em Cruz Elevado .....	20
5.6.2 Preferência ao parceiro .....	21
5.7 Análise estatística .....	22
6 RESULTADOS .....	23
6.1 Dados gestacionais e da prole .....	23
6.2 Testes comportamentais .....	24
6.2.1 Labirinto em Cruz Elevado .....	24
6.2.2 Preferência ao parceiro .....	25
7 DISCUSSÃO .....	27
8 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a utilização de diversos novos produtos sintéticos em diferentes áreas como agricultura, indústria e saúde, tem aumentado a exposição humana e de outros seres vivos a compostos químicos que podem promover efeitos adversos nesses organismos (DIAMANTIS-KANDARAKIS et al., 2009; FONTENELE et al., 2010; GORE et al., 2019). Alguns desses efeitos adversos podem ser observados somente depois de um longo período de exposição, o que pode significar um grande risco à saúde, já que podem levar muito tempo para serem percebidos e, portanto, a exposição não é cessada. Efeitos no sistema endócrino humano são exemplos de alterações que podem levar anos para serem identificadas, principalmente se a exposição a esses compostos se der durante a gestação e lactação, períodos críticos do desenvolvimento que são amplamente dependentes de sinalização hormonal (GHISELLI E JARDIM, 2007; MONNERET, 2017). Nesse caso, os efeitos geralmente começam a aparecer com o início da puberdade, quando há aumento da produção hormonal.

As substâncias capazes de promover esses efeitos adversos são denominadas desreguladores endócrinos, definidos como “agentes que interferem na síntese, na secreção, no transporte, na ligação e na eliminação de hormônios naturais do organismo responsáveis pela manutenção da homeostase, desenvolvimento, reprodução e/ou comportamento” (US EPA, 1997). O documento “*Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*”, de 2002 da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization (WHO)) define os desreguladores endócrinos como substâncias exógenas ou misturas que alteram funções do sistema endócrino causando efeitos adversos à saúde de um organismo ou da sua prole. Essas substâncias podem ser agrotóxicos, plásticos (bisfenol-A) e plastificantes (ftalatos), medicamentos, dentre outros produtos que são amplamente utilizados por diversas populações (BILA E DEZOTTI, 2007; MALLOZZI et al., 2016).

Como os organismos estão suscetíveis à exposição a essas substâncias em praticamente todas as etapas da vida, pode-se até mesmo encontrar indivíduos que apresentem alterações mesmo sem exposição direta no momento da manifestação de efeitos adversos, como, por exemplo, em organismos

expostos ainda nas fases fetais, durante o período gestacional (RIVOLLIER et al., 2019).

Pode-se encontrar uma gama ainda maior de substâncias com esse mesmo potencial de desregular o sistema endócrino já que, de acordo com estudos, até mesmo medicamentos comuns, muito utilizados entre a população, como analgésicos e anti-inflamatórios, podem apresentar atividade de desregulador endócrino (BEN MAAMAR et al., 2017; KRISTENSEN et al., 2011; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013).

Isso torna-se preocupante pelo fato de que essa exposição aos desreguladores endócrinos pode ocorrer tanto diretamente, através da ingestão intencional (farmacológica), quanto indiretamente, através de resíduos presentes na água e em alimentos. Portanto, pesquisas nessa área são de grande importância, de modo que se possa reduzir a exposição, tanto intencional quanto inadvertida, a essas substâncias e prevenir a ocorrência de diferentes efeitos adversos, principalmente em períodos críticos do desenvolvimento.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Desreguladores endócrinos

Os desreguladores endócrinos podem atuar diretamente em receptores hormonais, como agonistas ou antagonistas, ou indiretamente, interferindo com a disponibilidade (ex.: produção, armazenamento, transporte, metabolismo, sítio de ligação e eliminação) de hormônios endógenos. Tais efeitos podem ocasionar alterações em diversas funções do organismo, incluindo mudanças no metabolismo, na reprodução e no comportamento (KABIR et al., 2015; MONNERET, 2017). Sabe-se que os hormônios atuam em janelas específicas do desenvolvimento, especialmente nos períodos fetal, perinatal e pubertal dos indivíduos para promover diferenciação e crescimento de diferentes tecidos. Dessa forma, os efeitos adversos dos desreguladores endócrinos são mais severos quando organismos são expostos nessas fases, de modo que os efeitos podem se tornar permanentes e percebidos somente na vida adulta. Por outro lado, os efeitos resultantes de exposições em indivíduos adultos são aparentes geralmente enquanto durar a exposição (FONTENELE, 2010; RIVOLLIER et al., 2019).

A exemplo de como os desreguladores endócrinos podem causar alterações ainda período fetal, pode-se citar o uso do medicamento dietilestilbestrol (DES), um estrogênio sintético utilizado por mulheres grávidas entre as décadas de 1950 e 1970, com o intuito de prevenir abortos e partos prematuros. Posteriormente, verificou-se que parte das filhas dessas mulheres desenvolverem um tipo raro de câncer vaginal, além de diversas anormalidades do trato reprodutivo, sendo que algumas anormalidades reprodutivas também foram observadas nos descendentes masculinos (HERBST et al., 1971; GHISELLI, 2007; VEURINK et al., 2005). Outros estudos também apontam para os efeitos estrogênicos que o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), pesticida muito utilizado na agricultura no passado, provocou na fauna local nos EUA, promovendo alterações reprodutivas em mamíferos, aves e répteis (BURLINGTON E LINDEMAN, 1950; BILA E DEZOTTI, 2007).

Como a ação dos desreguladores endócrinos pode alterar as respostas fisiológicas de hormônios, interferindo na homeostase hormonal, pode-se

encontrar como efeitos adversos um desbalanço principalmente nos eixos hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas, ocasionando alterações no metabolismo, no qual os hormônios tireoidianos também têm papel essencial, no sistema reprodutor e no sistema nervoso central, o qual sofre grande influência dos hormônios já que é o responsável por manter o equilíbrio do organismo (KABIR et al., 2015).

Com isso, desbalanços hormonais, principalmente em períodos críticos do desenvolvimento, podem levar a futuras alterações comportamentais, por exemplo, por interferir na ação de hormônios que possuem papel importante na diferenciação sexual e cerebral de fetos masculinos e femininos. Entretanto, dependendo da ação hormonal dessas substâncias – (anti)estrogênica ou (anti)androgênica -, podem ocorrer distúrbios diferentes nos indivíduos masculinos e femininos expostos (KABIR et al., 2015). A previsão dos possíveis efeitos adversos desses compostos pode ser dificultada uma vez que um único desregulador endócrino pode ter ação antiandrogênica e estrogênica, por exemplo, ou então seus metabólitos podem apresentar diferentes propriedades (DIAMANTIS-KANDAKARIS, 2009).

Diversos estudos procuram encontrar relações entre a exposição aos desreguladores endócrinos e distúrbios no neurodesenvolvimento, conforme recentemente apontado por Rivollier e colaboradores (2019). Porém os dados encontrados na literatura são muito variados, tornando difícil uma imagem mais compreensiva sobre quais seriam as consequências da exposição a essas substâncias sobre o neurodesenvolvimento humano a longo prazo. Os autores ainda ressaltam a necessidade de mais estudos tanto epidemiológicos, em humanos, quanto experimentais, em animais, para promover a melhor compreensão sobre esse assunto.

## 2.2 Analgésicos e Anti-inflamatórios como desreguladores endócrinos

O mecanismo de ação dos analgésicos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) está relacionado com a inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e a conseqüentemente redução da produção de prostaglandinas (CHAHADE et al., 2008). Terapeuticamente, são utilizados, geralmente, para alívio da febre, inflamação e dor (ARSLAN, 2016). A venda desses

medicamentos é livre na maioria dos países, e seu uso é bastante difundido pela população, incluindo mulheres em idade fértil, gestantes e lactantes (BLOOR E PAECH, 2013). Além do uso terapêutico já comentado dos anti-inflamatórios, também são usados frequentemente no tratamento de doenças reumáticas, que podem ocorrer em mulheres em idade fértil (OSTENSEN, 1996), e seu tratamento pode ser ininterrupto durante uma eventual gestação. Além disso, o seu uso durante a gestação pode ocorrer como forma de tratamento para diversas condições que acontecem nessa fase, como aumento de dores de cabeça e musculares (NEZVALOVA-HENRIKSEN et al., 2013). Perante isso, entende-se que podem ocorrer exposições ainda *in utero* a esses medicamentos, já que esses compostos podem atravessar a barreira placentária e potencialmente afetar o desenvolvimento fetal (HURTADO-GONZALEZ et al., 2018).

Alguns estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram associações entre o uso desses medicamentos e efeitos adversos na gestação e nos descendentes expostos *in utero*, incluindo alguns desfechos relacionados com desregulação endócrina, assim como outras alterações (KRISTENSEN et al., 2011; MAZAUD-GUITTOT et al., 2013). Por exemplo, alguns estudos já demonstraram que há relação entre o uso de analgésicos nos segundo e terceiro trimestres gestacionais e efeitos adversos para o feto como baixo peso ao nascimento, defeitos cardíacos e asma. (NEZVALOVA-HENRIKSEN et al., 2013; ANTONUCCI et al. 2012). Outros estudos ainda sugerem que os analgésicos podem apresentar propriedades desreguladoras endócrinas capazes de alterar a função reprodutiva humana e animal em diferentes fases do desenvolvimento e em ambos os sexos. Além disso, agentes químicos industriais que atuam como desreguladores endócrinos anti-androgênicos, como determinados ftalatos, também são inibidores da síntese de prostaglandinas, assim como analgésicos e AINES (KRISTENSEN et al., 2011).

O ibuprofeno, um dos anti-inflamatórios mais utilizados durante a gestação, foi associado à redução dos níveis de testosterona em testículos fetais humanos cultivados *ex vivo* na presença de doses terapêuticas do fármaco (BEN MAAMAR et al., 2017). Nezvalova-Henriksen e colaboradores (2013) encontraram uma associação do uso do ibuprofeno na gestação com a ocorrência de sintomas de asma em crianças de 18 meses. Nesse estudo,

também foi encontrada uma associação do uso do ibuprofeno e do diclofenaco com o maior risco da redução do peso ao nascimento. Ainda pode ser encontrado maior risco de criptorquidismo (ausência da descida dos testículos para o escroto) em casos de exposição intrauterina ao paracetamol, como relata Mazaud-Guittot et al. (2013).

Apesar de diferentes estudos apontarem o risco do uso de medicamentos durante a gestação, esse tipo exposição pré-natal pode ocorrer de forma direta, principalmente quando avaliada por médicos como mais benéfica do que maléfica tanto para a mãe quanto para a criança (SERVEY E CHANG, 2014). Contudo, a exposição também pode ocorrer pela automedicação, baseada principalmente pelo não conhecimento dos possíveis efeitos adversos ou pela percepção equivocada sobre a segurança desses compostos (DAMASE-MICHEL, 2009). A forma indireta dessa exposição seria pela ingestão de água ou alimentos contendo resíduos desses compostos, já que alguns fármacos e seus metabólitos, quando chegam nas estações de tratamento de água e efluentes, podem não ser totalmente eliminados, podendo acarretar posteriormente na sua presença nos efluentes dessas estações, águas superficiais ou subterrâneas, ou até mesmo em águas potáveis (BIEL-MAESO, 2017).

### 2.3 Diclofenaco

O diclofenaco (ácido 2-[2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético), derivado do ácido fenilacético, é outro anti-inflamatório, que, assim como outros AINES, é amplamente utilizado em todo o mundo no tratamento de dores articulares, principalmente pela sua capacidade de se concentrar no líquido sinovial (SCHOLER et al., 1986; MARCOLONGO et al., 1996).

Estudos de monitoramento ambiental demonstram que o diclofenaco está cada vez mais presente no ambiente, sendo considerado um dos contaminantes emergentes e incluído na lista de observação da União Europeia em 2015 (SATHISHKUMAR et al., 2019), reforçando a preocupação da exposição pré-natal de forma indireta. Ainda, Lonappan e colaboradores (2016) descobriram que a interação de metabólitos do diclofenaco com metais pode alterar completamente a sua ação, podendo adquirir ação antibacteriana e

potencial ação citotóxica por exemplo, sendo que essa interação ocorre principalmente em estações de tratamento de água, que por vezes acabam por liberá-las no ambiente. Essa liberação pode promover a exposição de diversos organismos a novos tipos de poluentes, cujos efeitos tóxicos ainda não foram estudados. Estudos já apontam o desenvolvimento de técnicas para eliminação de resíduos dessa substância nas estações de tratamento de água e efluentes (MURSHID E DHAKSHINAMOORTHY, 2019; PHASUPHAN et al., 2019), apesar de ainda faltarem dados que comprovem sua eficiência para implementação.

Devido ao seu mecanismo de ação de inibição da síntese de prostaglandinas, no caso de usos prolongados, o diclofenaco, assim como outros anti-inflamatórios, pode apresentar efeitos adversos cardiovasculares, gastrointestinais e hepáticos. No Brasil, ele está entre os 12 medicamentos mais utilizados por automedicação, tanto de forma isolada quanto em associação com outras substâncias (ARRAIS et al., 2016). Esse composto também se mostrou capaz de atravessar a barreira placentária durante o primeiro trimestre da gestação, apesar de não ter sido associado a presença de malformações congênitas (SIU et al., 2000).

Foram relatados dois casos de oligidrânio (diminuição na produção de líquido amniótico) durante o segundo trimestre de gestação, após exposição materna prolongada ao diclofenaco (SCHENECK et al., 2015). Nesses casos, após a interrupção da exposição houve a reversão dos quadros, indicando a causalidade. De acordo com a ANVISA (2016), não é recomendado o uso do diclofenaco nos dois primeiros trimestres de gestação devido à escassez de estudos acerca dos possíveis efeitos que esse medicamento pode ocasionar durante esse período.

Padberg e colaboradores (2018) investigaram a segurança do uso do diclofenaco durante a gestação em um estudo observacional de coorte prospectivo. Foram analisados casos onde houve o uso exclusivo de diclofenaco, já que em diversos estudos o medicamento faz parte do grupo de estudo, porém não é o único alvo investigado. De acordo com os resultados encontrados, não há indicações de que o uso do fármaco no primeiro trimestre tenha riscos de embriotoxicidade ou teratogenicidade, porém os autores recomendam mais estudos em relação à prescrição desse medicamento durante o primeiro trimestre de gestação.

Com relação ao terceiro trimestre de gestação, sabe-se que a utilização do diclofenaco, assim como de outros AINES, pode ser fetotóxico pela redução dos níveis de prostaglandinas fetais, podendo ocasionar também fechamento prematuro do ducto arterial e nefrotoxicidade (ANTONUCCI et al., 2012). Contudo, como salientado anteriormente, apesar das restrições de uso, sabe-se que o diclofenaco e outros AINES podem ser eventualmente utilizados nos três trimestres de gestação, seja por prescrição médica ou, principalmente, através da automedicação.

Ozyurt e colaboradores (2011) demonstraram que a exposição pré-natal ao diclofenaco alterou a histologia dos neurônios da medula espinhal cervical de ratos machos assim como a redução no número desses neurônios, indicando que a substância apresentou um perfil tóxico para o sistema nervoso. Ainda sobre o sistema nervoso, um estudo apontou a redução no número total de neurônios no hipocampo de ratos tratados ainda em fase gestacional (GOKCIMEN et al., 2007), indicando que essa substância poderia ter potencial de influenciar áreas do cérebro que trariam alterações no comportamento dos organismos expostos.

#### 2.4 Influências sobre o comportamento

Estudos comportamentais com peixes expostos em fases embrionárias a AINES relatam alterações no comportamento motor e no padrão de natação desses animais (DAVID E PANCHARTNA, 2009; XIA et al. 2017). Com esses resultados, pode-se perceber o potencial neurotóxico desses medicamentos, afetando principalmente o desenvolvimento dos animais. Em outro estudo, com camundongos expostos no período pré-natal ao paracetamol, demonstrou-se efeitos anti-androgênicos desse fármaco sobre os comportamentos dos machos (HAY-SCHMIDT et al., 2017). Um estudo com sapos adultos encontrou alterações nos padrões do comportamento sexual desses animais quando expostos por 8 dias ao diclofenaco (EFOSA et al., 2017). Nesse estudo, a exposição a esse composto promoveu um efeito estrogênico sobre os anfíbios, reduzindo a vocalização desses animais, além de reduzir o acasalamento, e, dessa forma, o sucesso reprodutivo. Em outro estudo, a dipirona já foi associada

com alteração do comportamento materno, assim como o comportamento tipo ansioso da prole (VERONESI et al., 2017).

Amateau e McCarthy (2004) demonstraram o aumento da presença de prostaglandina E2 no período perinatal atuando em áreas do sistema nervoso central que são essenciais na programação do comportamento sexual masculino em ratos. Dessa forma, a inibição da atividade das enzimas ciclooxigenases e a consequente diminuição de prostaglandinas durante esse período poderia interferir no desenvolvimento de determinadas regiões cerebrais (YURT E KAPLAN, 2018), podendo ocasionar em alterações no comportamento sexual desses animais.

Markovic e colaboradores (2019) investigaram o neurodesenvolvimento de aproximadamente 6800 crianças expostas ainda em fase gestacional a AINES em Roterdã, Holanda. Os autores examinaram se alterações no neurodesenvolvimento, tal como problemas de atenção e cognição, estavam relacionadas à exposição a esses medicamentos nessa fase. Concluiu-se que há evidências que indicam associações entre problemas de atenção e a exposição pré-natal a AINES.

A partir desses estudos, percebe-se a importância da investigação acerca dos possíveis efeitos que a exposição *in utero* a esses fármacos, amplamente utilizados entre a população, muitas vezes sem prescrição médica, podem ter a longo-prazo.

### 3 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da exposição aos desreguladores endócrinos, principalmente em fases críticas do desenvolvimento, como o período fetal, ocorre a preocupação em relação aos efeitos adversos que esses compostos podem causar no sistema endócrino. Estudos têm demonstrado que essas substâncias podem alterar eventos importantes do desenvolvimento pela sua interferência no sistema endócrino, podendo ocasionar distúrbios reprodutivos.

Mediante o crescimento do uso de analgésicos e anti-inflamatórios, muitas vezes de forma inadequada, em períodos como a gestação, verifica-se a necessidade de investigar os possíveis efeitos adversos que essas substâncias podem promover na saúde dos seres humanos a longo prazo, tanto em estudos epidemiológicos como em modelos animais. Dentre esses efeitos, pode-se citar alterações comportamentais, que podem ter relação com alterações hormonais causadas por desreguladores endócrinos.

O diclofenaco é um anti-inflamatório não esteroidal amplamente utilizado pela população, incluindo mulheres gestantes e lactantes. Apesar de não ser indicado durante a gestação, sabe-se que muitas mulheres fazem uso desse medicamento, incluindo casos em que há o desconhecimento do estado gestacional. Além da exposição direta, pode ocorrer a exposição inadvertida, por meio de água e alimentos contaminados. Portanto, observa-se a necessidade de mais estudos que investiguem os possíveis efeitos que a exposição pré-natal ao diclofenaco pode ocasionar em parâmetros reprodutivos e comportamentais em modelos animais, a fim de avaliar possíveis riscos para a saúde humana.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivos Gerais

Investigar alterações em aspectos comportamentais de ratos expostos *in utero* ao diclofenaco durante os dias 10-20 de gestação.

### 4.2 Objetivos Específicos

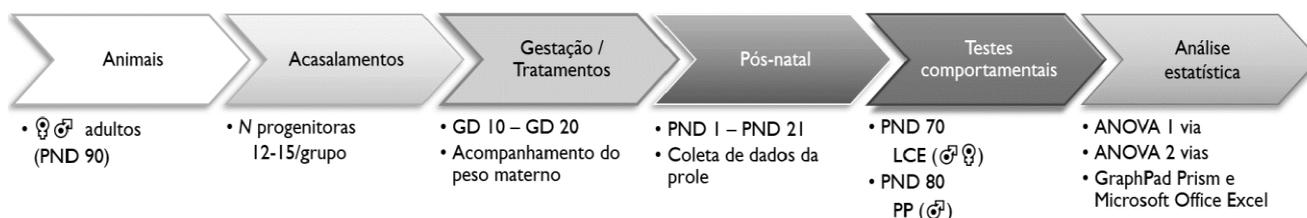
- Avaliar possíveis efeitos tóxicos maternos e sobre a prole decorrentes da exposição gestacional ao diclofenaco, por meio da avaliação do ganho de peso materno, número de filhotes ao nascer, perdas pós-implantes e viabilidade dos filhotes.
- Avaliar o comportamento tipo ansioso da progênie masculina e feminina por meio do teste de Labirinto em Cruz elevado.
- Avaliar a influência do diclofenaco na preferência sexual de ratos machos por meio do teste de preferência ao parceiro.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Plano experimental

O plano experimental seguido por esse trabalho ilustrado pela linha do tempo apresentada abaixo (FIGURA 1).

FIGURA 1: LINHA DO TEMPO DO PLANO EXPERIMENTAL



FONTE: A autora (2019)

### 5.2 Animais

Nesse experimento foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), da variedade Wistar, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Durante o período de experimentação os animais foram mantidos em salas com controle de temperatura ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), obedecendo a um ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 7 às 19 horas), alojados em caixas de polipropileno nas salas de experimentação do biotério da UFPR, recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os estudos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (número 1163).

### 5.3 Acasalamentos

Ratas Wistar adultas (90 dias) foram acasaladas com ratos machos adultos durante as últimas 3 horas da fase escura do ciclo de luz, na proporção de um macho para três fêmeas. Foram realizados esfregaços vaginais de cada fêmea ao final do período de acasalamento para verificar a presença de espermatozoides, confirmando a cópula. Esses lavados foram realizados com auxílio de uma micropipeta por meio de lavagens vaginais com 50  $\mu\text{l}$  de salina e

posterior avaliação, a fresco, em microscopia ótica. O dia de detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foi considerado como dia gestacional (GD) 0. As fêmeas que não apresentaram espermatozoides no lavado vaginal foram novamente acasaladas até a obtenção de um número suficiente de progenitoras para o experimento (n=12-15/grupo).

As fêmeas prenhes foram mantidas em caixas coletivas, separadas por tratamento, em número de quatro por caixa, até o 18º dia de gestação (GD 18), e então foram separadas e mantidas individualmente até o momento do parto. A ocorrência dos partos foi observada duas vezes ao dia (início da manhã e final da tarde). O dia do parto foi considerado o dia pós-natal (PND) 1. Os filhotes foram mantidos juntos até o final do período de lactação (PND 21). Após esse período, as progenitoras foram eutanasiadas, os filhotes foram separados em machos e fêmeas, distribuídos e alojados em caixas coletivas (n=4/caixa), sendo mantidos juntos os animais com o mesmo tratamento pré-natal.

#### 5.4 Doses e tratamento

A seleção das doses de diclofenaco foi baseada nos dados de uso terapêutico em humanos (com extrapolação alométrica para ratos) e em dados de toxicologia reprodutiva, particularmente dados de toxicidade materna e fetal, que constituem os alvos mais sensíveis do presente estudo.

Levando-se em consideração que a dose máxima diária de diclofenaco em humanos é de 150 mg, obtém-se uma dose ajustada de 2,14 mg/kg/dia (considerando um peso corporal de 70 kg). A dose alométrica correspondente, em ratos, foi calculada conforme a fórmula apresentada a seguir:

**Diclofenaco** (2,14 mg/kg x paciente de 70 kg = 150 mg/dia):

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

Considerando o peso médio do animal-alvo de 250 g, a dose correspondente foi de aproximadamente 9 mg/kg/dia de diclofenaco. Contudo, de acordo com estudos reprodutivos, a dose oral máxima de diclofenaco que não

causa toxicidade materna e fetal (NOAEL - No Observed Adverse Effect Level) em ratos é de 5 mg/kg/dia (EMEA, 2003). Com base no cálculo alométrico para dose terapêutica em ratos, dados de toxicidade reprodutiva (NOAEL), e a fim de se obter uma curva dose resposta, foram utilizadas três doses, sendo a maior dose igual a 5 mg/kg/dia (próxima a dose alométrica terapêutica e que não causa toxicidade materna), e duas doses abaixo, 1 e 0,2 mg/kg/dia.

O tratamento foi via gavagem, do 10<sup>o</sup> (GD 10) ao 20<sup>o</sup> (GD 20) dia de gestação. Para a realização do experimento foram formados 5 diferentes grupos experimentais, apresentados abaixo, com número de 12-15 ratas prenhes por grupo, com exceção do grupo tratado com di-2-(etilhexil) ftalato - DEHP (n=8-10), que foi utilizado como controle positivo para efeitos antiandrogênicos. O volume de administração foi de 2 ml/kg para todos os tratamentos e foram testadas as doses de 0,2, 1,0 e 5 mg/kg/dia de diclofenaco.

Grupo 1 (controle negativo) – 5 ml/kg de água destilada;

Grupo 2 – 0,2 mg/kg/dia de diclofenaco;

Grupo 3 – 1,0 mg/kg/dia de diclofenaco;

Grupo 4 – 5 mg/kg/dia de diclofenaco;

Grupo 5 (controle positivo) – 750 mg/kg/dia de DEHP.

O período de tratamento foi selecionado a fim de incluir as fases de diferenciação sexual gonadal e fenotípica. Em ratos, a diferenciação gonadal ocorre entre os GD 10-14, enquanto a diferenciação fenotípica, dependente de androgênios e outros hormônios, ocorre na parte final da gestação, a partir do GD 14.

### 5.5 Dados gestacionais e da prole

As progenitoras foram pesadas diariamente do dia gestacional 10 até o parto, a fim de avaliar o ganho de peso durante o período de exposição e verificar possíveis sinais de toxicidade do diclofenaco. O número de filhotes nascidos, as perdas pós-implante (número total de implantes – número de filhotes vivos ao nascer / número total de implantes) e a sobrevivência durante a lactação (índices de viabilidade e desmame) foram registrados. Os índices de viabilidade e desmame correspondem, respectivamente, ao número de filhotes vivos nos PND 4 e 21 dividido pelo número de filhotes vivos ao nascimento.

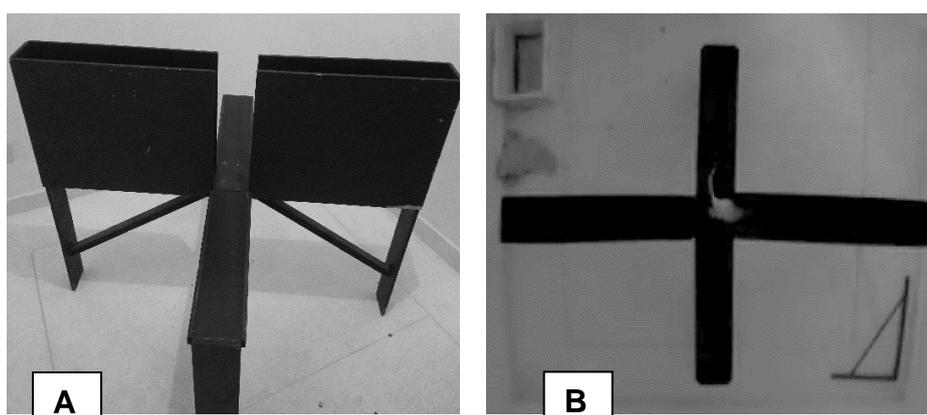
## 5.6 Testes comportamentais

### 5.6.1 Labirinto em Cruz Elevado

Esse teste foi feito a partir do PND 70 com 2 animais de cada ninhada, 1 macho e 1 fêmea. Foram feitos lavados vaginais diários nas fêmeas para verificação do ciclo estral, e foram selecionadas as fêmeas em pró-estro para o teste em cada dia (adaptado de MARCONDES et al., 2002). Durante esse estágio do ciclo, as fêmeas apresentam menor comportamento tipo ansioso em comparação com os demais estágios do ciclo (DATTA, 2019; WALF et al., 2009).

O aparato desse teste consiste em uma estrutura em formato de cruz na horizontal, no qual dois braços opostos são fechados por paredes e os outros dois são abertos, elevada a 50 cm centímetros do solo (FIGURA 2). Os animais foram colocados no meio do labirinto com a face voltada para um dos braços abertos, e foram filmados por 5 minutos. Entre a troca dos animais, o aparato era limpo utilizando uma solução etílica 10%, e aguardado 30 segundos antes de posicionar o próximo animal. Posteriormente foi computado o número de entradas e o tempo de permanência em cada braço por cada animal. Foi eliminado o tempo percorrido no compartimento central do aparelho e calculado o percentual da permanência e entradas nos braços. (PELLOW et al, 1985).

FIGURA 2: APARATO DO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



FONTE: A autora (2019)

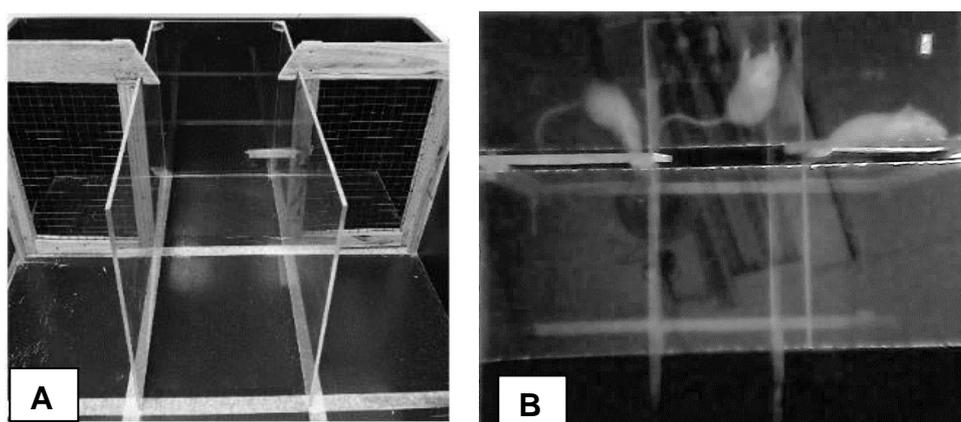
LEGENDA: (A) Vista frontal do aparato. (B) Vista superior do aparato em uso.

### 5.6.2 Preferência ao parceiro

Esse teste foi feito a partir do PND 80 com 2 espécimes machos de cada ninhada. Para cada sessão de teste, foram selecionados do grupo controle um macho e uma fêmea em estro, confirmado pelo exame citológico do lavado vaginal, para atuarem como animais-estímulo.

O aparelho de teste consiste em uma caixa-teste quadrada com três câmaras definidas por divisórias de acrílico transparentes, uma câmara maior em formato de T para permitir que o animal-teste se movimente livremente de um lado ao outro da caixa-teste, onde estão localizadas duas câmaras menores, uma oposta a outra (FIGURA 3). O animal-teste foi habituado, sozinho, no aparelho por 5 minutos e, logo após, os animais-estímulos (um macho e uma fêmea em estro) eram introduzidos nas câmaras menores, as quais apresentam uma barreira com malha de arame, que permite ao animal-teste o contato indireto com os animais-estímulos. O comportamento do macho teste foi filmado durante 10 minutos, observando-se o tempo gasto na área feminina ou masculina (adaptado de HOUSTMULLER et al., 1994). O percentual de preferência pelo compartimento feminino e masculino foram calculados excluindo-se o tempo percorrido no compartimento central, concentrando o tempo efetivamente de preferência por cada estímulo.

FIGURA 3: APARATO DO TESTE DE PREFERÊNCIA AO PARCEIRO



FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: (A) Vista frontal do aparato. (B) Vista superior do aparato em uso.

## 5.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade das variâncias e submetidos a análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, a diferença entre os grupos foi determinada pelo teste de Dunnett (comparações múltiplas entre o grupo controle e os grupos tratados).

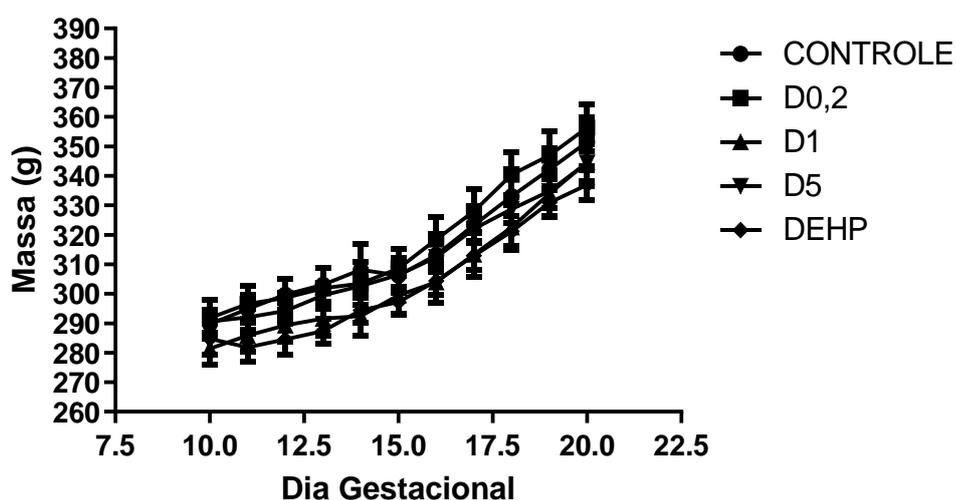
No teste de labirinto em cruz elevado, utilizamos ANOVA de duas vias, tendo tratamento e sexo dos animais teste como fatores principais. No caso da análise do teste de preferência ao parceiro foi utilizada a ANOVA de uma via e, alternativamente, a ANOVA de duas vias, tendo o tratamento e o sexo dos animais estímulo como fatores principais. Para a análise estatística e confecção dos gráficos foram utilizados os programas Graphpad Prism e Microsoft Office Excel. O nível de significância estatística adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados gestacionais e da prole

Não foram encontrados sinais de toxicidade materna e fetal, avaliados, respectivamente, por meio do acompanhamento do ganho de peso diário das progenitoras do GD 10 ao GD 20 (FIGURA 4) e pelos índices de viabilidade e desmame (TABELA 1). Durante o trabalho, em nenhum dos grupos houve ocorrências de morte materna ou das ninhadas (abortos espontâneos). Os índices de viabilidade e desmame encontrados foram de 100% para todos os grupos, ou seja, os filhotes que nasceram vivos no PND1 sobreviveram durante todo o período de lactação. Demais dados sobre a gestação e prole, tal como peso dos órgãos das progenitoras e prole, parâmetros fisiológicos do desenvolvimento e histologia, foram analisados em estudo paralelo a este trabalho, e não apontaram diferenças ou efeitos significativos (dados não publicados).

FIGURA 4: ACOMPANHAMENTO DIÁRIO DO GANHO DE PESO DAS PROGENITORAS DO 10º DIA GESTACIONAL AO 20º (GD10-GD20)



FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Resultados expressos em média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ , analisados por *One-Way* ANOVA, seguido de Dunnet.

TABELA 1: DADOS GERAIS DA GESTAÇÃO DAS PROGENITORAS

Grupos	Dados da gestação						
	Progenitoras (N)	Nº de filhotes vivos PND1	Nº de filhotes mortos PND1	Nº de implantes	Perdas pós-implante (%)	Índice de viabilidade	Índice de desmame
Controle	13	10,15 ± 0,72	1,38 ± 0,68	11,92 ± 0,42	13,7 ± 6,04	1	1
D0,2	14	9,21 ± 0,87	0,57 ± 0,31	11,07 ± 0,75	18,44 ± 5,18	1	1
D1	11	10,27 ± 1,42	0,18 ± 0,4	11 ± 0,47	6,4 ± 1,96	1	1
D5	11	10 ± 0,56	0,33 ± 0,19	11,25 ± 0,59	10,38 ± 3,27	1	1
DEHP	9	8 ± 0,94	1,11 ± 0,42	10,44 ± 0,44	24,39 ± 7,77	1	1

FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Resultados expressos como média ± EPM.

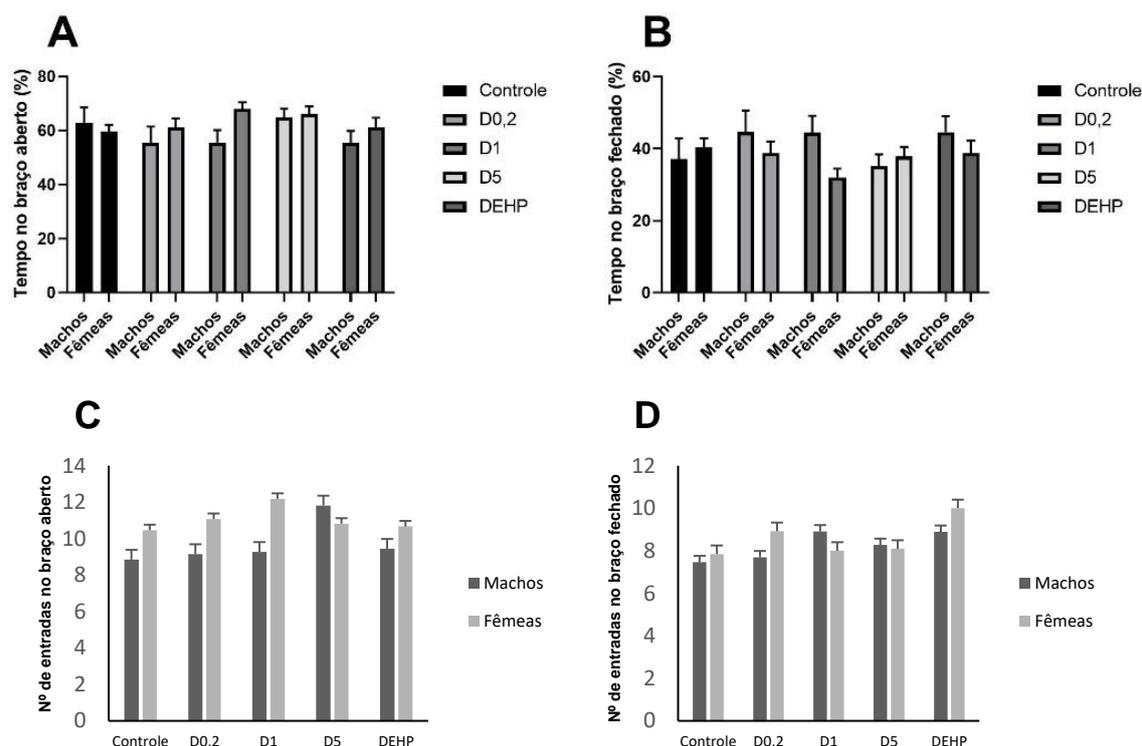
## 6.2 Testes comportamentais

### 6.2.1 Labirinto em Cruz Elevado

Não foram observadas alterações significativas em relação aos fatores tratamento e sexo e tampouco interações em relação ao tempo de permanência em cada braço (FIGURA 5 A e B). A locomoção dos animais foi analisada pelo quantidade de entrada no braço fechado (FIGURA 5 D), a qual também não apresentou diferenças significativas em nenhum fator ou interações.

Nota-se que o grupo exposto ao diclofenaco 1mg/kg/dia (D1) foi o grupo com maior diferença entre machos e fêmeas em todos os aspectos. Contudo, novamente, nenhuma dessas observações apresentou diferenças estatisticamente significativas.

FIGURA 5 – TEMPO DE PERMANÊNCIA E QUANTIDADE DE ENTRADAS EM CADA BRAÇO DO TESTE DE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO



FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Permanência nos braços aberto (A) e fechado (B), quantidade de entradas nos braços aberto (C) e fechado (D). Resultados expressos em média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ , analisados por *Two-way* ANOVA seguido de Sidak.

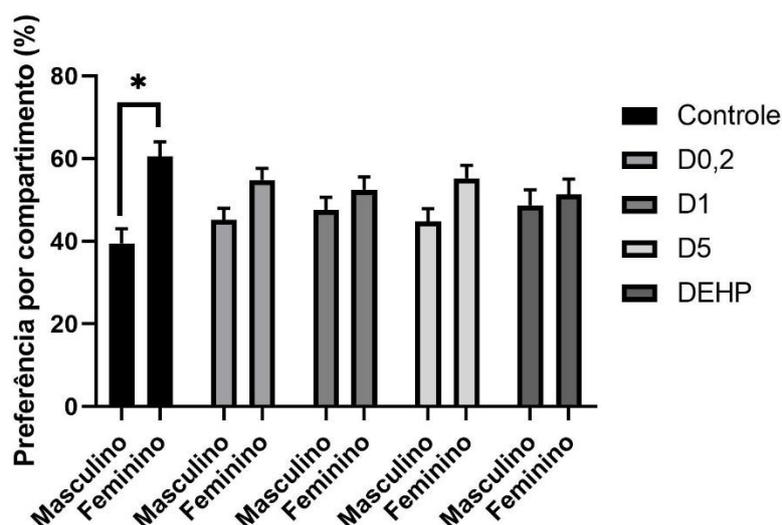
### 6.2.2 Preferência ao parceiro

Quanto a preferência ao parceiro, nota-se uma redução no percentual de tempo passado no compartimento da fêmea pelos grupos experimentais quando comparado com o grupo controle, apesar dessa redução não ter sido significativa. Nos grupos expostos a diclofenaco, a dose de 1 mg/kg/dia foi a que apresentou maior redução na preferência feminina, com consequente aumento na preferência masculina.

Na análise de ANOVA de duas vias, houve efeito significativo do fator sexo do animal estímulo ( $p < 0,001$ ) e na interação ( $p = 0,05$ ) entre os fatores tratamento e sexo do animal estímulo. A análise do pós-teste de Sidak revelou que apenas no grupo controle houve diferença significativa entre o tempo percentual que o animal teste passou nos compartimentos masculinos e

femininos, sendo esse tempo maior no compartimento feminino. Ao contrário do grupo controle, no entanto, todos os grupos expostos ao diclofenaco assim como o grupo exposto ao DEHP não houve diferença no percentual de tempo gasto entre os dois compartimentos. (FIGURA 6).

FIGURA 6 – PERCENTUAL DE PREFERÊNCIA POR COMPARTIMENTO DO TESTE DE PREFERÊNCIA AO PARCEIRO



FONTE: A autora (2019)

LEGENDA: Resultados expressos em média  $\pm$  EPM, analisados por *Two-way* ANOVA seguido de Sidak. \* $p < 0,0001$ .

## 7 DISCUSSÃO

O diclofenaco vem sendo considerado um contaminante emergente, o que resulta na preocupação em se saber os possíveis efeitos adversos que essa exposição pode causar nos organismos expostos a ele. Efeitos como alteração do peso do feto e alterações no líquido amniótico já foram relatadas sob o uso de diclofenaco de modo contínuo da gestação (SCHERNECK et al., 2015; ANTONUCCI et al., 2012), implicando que essa substância tem capacidade de causar influências durante a gestação. Nesse trabalho, entretanto, não foram encontrados sinais de toxicidade materna e fetal, avaliados, respectivamente, por meio do acompanhamento do ganho de peso diário das progenitoras do GD 10 ao GD 20 e pelos índices de viabilidade e desmame.

Neste trabalho, quanto ao comportamento de preferência ao parceiro, observamos ausência de preferência pelo compartimento feminino nos machos testes expostos às três doses do diclofenaco avaliadas, bem como nos machos expostos ao DEHP (controle positivo). Em contraste, no controle negativo, os machos testes exploraram significativamente mais o compartimento feminino se comparado com o compartimento masculino, indicando uma preferência por fêmeas.

Essa preferência pelo compartimento feminino demonstrada pelos machos do grupo controle corrobora com o estudo de AGO et al., 2015, que demonstrou que ratos machos mostram uma preferência significativa para o encontro feminino, independentemente da fase do ciclo estral da fêmea.

A escolha do macho-teste em procurar e permanecer com a fêmea-estímulo pode se relacionar com a atividade de áreas cerebrais sexualmente dimórficas, como por exemplo o núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica presente no hipotálamo. Esse núcleo se apresenta maior em machos do que em fêmeas (GORSKI et al., 1980), sendo esse dimorfismo causado pela ação hormonal (JACOBSON et al., 1981; HOUSTMULLER et al., 1994) e pela atividade de prostaglandinas em períodos críticos do desenvolvimento (AMATEAU E MCCARTHY, 2004). Em estudo anterior, Amateau e McCarthy (2002) relatam que mecanismos envolvendo a plasticidade de dendritos e expressão de proteínas específicas da área pré-óptica são induzidos pela ação de

prostaglandinas. Assim, essas regiões hipotalâmicas dimórficas, ao sofrer influências de substâncias desreguladoras endócrinas, podem ocasionar na alteração de comportamentos, principalmente relacionados à cópula. Contudo, estudos adicionais são necessários para determinar se a exposição gestacional ao diclofenaco pode causar alterações morfológicas em áreas cerebrais sexualmente dimórficas bem como possíveis relações entre essas eventuais alterações morfológicas e os dados comportamentais de preferência ao parceiro demonstrados no presente trabalho.

Os resultados encontrados nesse trabalho são semelhantes a de outros estudos que demonstraram uma redução da preferência pela fêmea em machos expostos durante a gestação a substâncias que alteram a sinalização hormonal (BRAND et al., 1991; HOUSTMULLER et al., 1994). Inclusive, a exposição pré-natal a betametasona, um fármaco anti-inflamatório, também foi capaz de reduzir o tempo que os ratos exploraram o compartimento feminino no teste de preferência a parceiro (PIFFER et al., 2009), sendo esse comportamento relacionado com a redução da testosterona.

O desbalanço das atividades das prostaglandinas provocado pelo uso do diclofenaco neste trabalho, podem então ter causado alterações nessa área devido ao seu mecanismo de ação, impedindo o desenvolvimento adequado da área pré-óptica, ocasionando na ausência de preferência já citada.

Nos estudos sobre alterações nos comportamentos sexuais, o principal causador dessas alterações são componentes que interferem diretamente com a síntese ou mecanismo de ação dos hormônios esteroidais, consistente com o que se sabe sobre a influência e importância dessas substâncias no desenvolvimento do sistema nervoso central (HENLEY et al., 2011). Entretanto, novos estudos apontam que outras substâncias podem apresentar potenciais efeitos que levam a alterações comportamentais, como os AINES. Estudos apontam que a dipirona, por exemplo, altera comportamentos maternos assim como o comportamento tipo ansioso da prole em ratos (VERONESI et al., 2017), e que o paracetamol provocou efeitos anti-androgênicos no comportamento de camundongos machos (HAY-SCHMIDT et al., 2017).

Sobre o diclofenaco, já foi descoberto que ele pode ser neurotóxico em períodos críticos do desenvolvimento, principalmente pelo seu papel na inibição da COX, o que ocasiona um aumento do estresse oxidativo (YURT E KAPLAN,

2018). Essa neurotoxicidade ocorrendo também pela alteração da morfologia de neurônios da medula espinhal de ratos no segmento cervical (OZYURT et al., 2011), apesar de não alterar neurônios no segmento torácico (RAGBETLI et al., 2018), e de neurônios do hipocampo (GOKCIMEN et al., 2007). Nesses três estudos, foram estudados unicamente os efeitos referentes a dose de 1 mg/kg/dia de diclofenaco.

A perda da preferência pela fêmea em estro observada nos grupos tratados com diclofenaco neste trabalho, pode ter sido causado por alterações em regiões hipotalâmicas envolvidas na motivação sexual do macho. Mais estudos focando no papel das prostaglandinas na diferenciação sexual cerebral devem ser realizados, para que se consiga distinguir os efeitos da prostaglandina dos efeitos hormonais. Ainda, a redução da motivação sexual encontrada nos machos tratados com diclofenaco deve ser melhor investigada.

O teste de labirinto em cruz elevado é utilizado para medir a ansiedade do animal, uma vez que o aparato evoca no animal tanto a curiosidade quanto o medo (HANDLEY E MITHANI, 1984). Se o medo/ansiedade for prevalente, os animais tendem a passar mais tempo explorando o braço fechado, onde se sentem seguros. Por outro lado, quanto menor a ansiedade e, por conseguinte, maior a curiosidade, maior o tempo explorando o braço aberto, o qual é desprotegido, aversivo. Além disso, é um teste que, sob condições experimentais, pode ser sexualmente dimórfico, com menor aversão ao braço aberto pelas fêmeas (MARCONDES et al., 2001, ZIMMERBERG E FARLEY, 1993). Esse teste também pode medir o nível de atividade do animal, ao se analisar o número de entradas em cada braço (JOHNSTON E FILE, 1991). Essa análise é importante e foi realizada para descartar problemas locomotores, o que influenciaria o resultado de outros parâmetros desse teste, podendo levar a uma falsa conclusão acerca do comportamento tipo-ansiedade.

Nesse trabalho, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais no tempo de permanência e número de entradas em cada braço do aparato indicando que o diclofenaco não tem efeitos sobre a ansiedade e locomoção dos animais. Esses resultados corroboram com os encontrados por Elibol et al. (2019), no qual também não foram encontradas evidências de alteração na ansiedade pelo labirinto em cruz elevado em ratas expostas no período pré-natal ao diclofenaco, sendo que nesse estudo também foram

encontradas alterações em funções motoras sensoriais e funções cognitivas não avaliadas nesse estudo.

Esse teste foi selecionado para esse trabalho já que alguns estudos indicam dimorfismos sexuais, sendo que as fêmeas passam mais tempo explorando os braços abertos se comparado aos machos (ZIMMERBERG E FARLEY, 1992; JOHNSON E FILE, 1991), como mencionado anteriormente. Ainda, outros estudos indicam que esse dimorfismo sexual ocorre de forma mais pronunciada durante a fase de pró-estro nas fêmeas, devido à alta concentração de hormônios (MARCONDES et al., 2001; DATTA et al., 2019; WALF et al., 2009). Portanto, nessa fase do ciclo, as fêmeas passam mais tempo no braço aberto, indicando um menor nível de ansiedade. Entretanto, no presente trabalho, ao contrário de alguns outros artigos citados, não foram encontradas diferenças significativas entre machos e fêmeas nem mesmo entre os animais do grupo controle. Vale ressaltar, contudo, que sobre esse aspecto do teste, são encontrados estudos que trazem resultados variados, quanto a idade em que o teste é feito e a variação existente entre os estágios do ciclo estral das fêmeas (IHMOF et al., 1993; MARCONDES et al., 2001). Desse modo, os resultados obtidos podem somente indicar que a exposição pré-natal ao diclofenaco nessas doses não altera a ansiedade do animal e nem causa prejuízos locomotores.

Estudos toxicológicos com AINEs em diferentes espécies já relataram alterações em comportamentos reprodutivos e motores (BENESOVA et al., 2001; HAY-SCHMIDT et al., 2017; EFOSA et al., 2017). Essas alterações podem ser menos marcantes do que alterações provocadas por compostos como o bisfenol A, ftalatos e pesticidas, substâncias já bem conhecidas como desreguladores endócrinos, e cujos efeitos adversos são amplamente estudados (MALLOZZI et al., 2016; GORE et al., 2019). Entretanto, ainda são efeitos que podem trazer prejuízos à saúde dos organismos, e, dessa forma, novos estudos sobre os potenciais efeitos adversos dos AINEs tornam-se importantes. No ambiente, onde essas substâncias encontram-se juntas e em diferentes concentrações, seus efeitos adversos podem ser ainda mais graves, sendo que o meio aquático é o principal ambiente no qual esse encontro de substâncias pode ocorrer (LONAPPAN et al., 2016; SATHISKUMAR et al., 2019).

Uma preocupação da presença do diclofenaco no ambiente foi apontada por Lee et al. (2011), já que existe potencial de bioacumulação da substância

devido a sua lipofilicidade, principalmente nos ambientes aquáticos. Em ambiente aquático, Gröner e colaboradores (2017), observaram que em uma população de tilápias a concentração ambientalmente relevante de 1 µg/L de diclofenaco apresentou efeitos estrogênicos, modificando expressão de LH e de vitelogenina nos indivíduos. Sathishkumar et al. (2019) também sugerem que o diclofenaco e seus metabólitos no ambiente poderiam, em contato com outros contaminantes, levar ao desenvolvimento de microrganismos resistentes à drogas e ainda a novos poluentes.

Dessa forma, a exposição a esse fármaco pode representar novos riscos para as futuras gerações tanto em populações humanas quanto em organismos de vida livre. Como comentado anteriormente, os desreguladores endócrinos podem exercer efeitos mesmo em doses baixas, principalmente se considerarmos os efeitos combinados de múltiplos agentes químicos e medicamentos. No caso de medicamentos, a exposição é ainda mais preocupante uma vez que, além da exposição ambiental, há a possibilidade de exposição a altas doses por conta do uso farmacológico. Com isso, estudos futuros devem investigar outros efeitos da exposição ao diclofenaco e a AINEs de maneira a geral, a fim de avaliar potenciais efeitos desreguladores endócrinos e repercussões sobre comportamentos e alterações morfológicas e funcionais no sistema nervoso central, particularmente após a exposição durante períodos críticos, como a gestação.

## 8 CONCLUSÃO

Mediante as observações obtidas nesse trabalho, pode-se concluir que a exposição pré-natal ao diclofenaco, nas doses de 5, 1 e 0,2 mg/kg/dia não foi capaz de causar efeitos significativos sobre aspectos gerais da gestação e viabilidade da prole e tampouco sobre o comportamento tipo ansiedade nos animais na idade adulta testados no teste do labirinto em cruz elevado. Por outro lado, a exposição *in utero* ao diclofenaco parece ter alterado aspectos de preferência sexual, como demonstrado pela ausência de preferência pelo compartimento feminino no teste de preferência ao parceiro, nos animais expostos às três doses de diclofenaco do presente trabalho.

Esses dados corroboram, portanto, a crescente preocupação em relação ao uso de analgésicos e AINEs durante o período gestacional, ainda mais quando ocorrido por automedicação e por meio da exposição inadvertida, com a ingestão de água ou alimentos que apresentem resíduos dessa substância.

Dessa forma, pode-se entender a necessidade de investir na conscientização quanto aos perigos da prática da automedicação, principalmente durante a gestação, devido aos potenciais efeitos adversos. Percebe-se também a importância da continuação dos estudos de monitoramento do diclofenaco no ambiente, assim como o desenvolvimento de meios de retenção do fármaco nas estações de tratamento de água e efluentes, de modo a reduzir a presença do diclofenaco no ambiente. Ainda, o crescente número de estudos acerca de efeitos endócrinos, reprodutivos e comportamentais decorrentes da exposição *in utero* a analgésicos e AINEs serve de alerta para a comunidade médica em relação ao uso racional desses medicamentos na gestação.

## REFERÊNCIAS

AGO, Y.; HASEBE, S.; NISHIYAMA, S. et al. The female encounter test: a novel method for evaluating reward-seeking behavior or motivation in mice. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 11, p. pyv062, 2015.

AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. A novel mechanism of dendritic spine plasticity involving estradiol induction of prostaglandin-E2. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 19, p. 8586-8596, 2002.

AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. Induction of PGE 2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 643, 2004.

ANTONUCCI, R.; ZAFANELLO, M.; PUXEDDU, E. et al. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 4, p. 474-490, 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Voltaren – Novartis Biociências S.A.** Indústria Brasileira, São Paulo – SP, 2016

ARRAIS, P. S. D. FERNANDES, M. E. P.; PIZZOL, T. S. D. et al. Prevalência da automedicação no Brasil e fatores associados. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p. 13s-13s, 2016.

ARSLAN, H.; AKTAŞ, A.; ELIBOL, E.; ESENER, O. B. B. et al. Effects of prenatal diclofenac sodium exposure on newborn testis: a histomorphometric study. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 91, n. 4, p. 277-282, 2016.

BEN MAAMAR, M.; LESNÉ, L.; HENNIG, K. et al. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. **Scientific reports**, v. 7, p. 44184, 2017.

BENEŠOVÁ, O.; TEJKALOVA, H.; KRIŠTOFIKOVÁ, Z.; HUŠEK, P.; NEDVÍDKOVÁ, J.; YAMAMOTOVA, A. Brain maldevelopment and neurobehavioural deviations in adult rats treated neonatally with indomethacin. **European Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 5, p. 367-373, 2001.

BIEL-MAESO, M.; CORADA-FERNÁNDEZ, C.; LARA-MARTÍN, P. A. Monitoring the occurrence of pharmaceuticals in soils irrigated with reclaimed wastewater. **Environmental pollution**, v. 235, p. 312-321, 2018.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.

BLOOR, M.; PAECH, M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the initiation of lactation. **Anesthesia & Analgesia**, v. 116, n. 5, p. 1063-1075, 2013.

BRAND, T.; KROONEN, J.; MOS, J.; SLOB, A.K. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Hormones and Behavior*, v. 25, n. 3, p. 323-341, 1991.

BURLINGTON, H.; LINDEMAN, V. Effect of ddt on testes and secondary characters of white leghorn cockerels **Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine**, v. 74, p. 48-51, 1950.

CHAHADE, W. H.; GIORGI, R. D. N.; SZAJUBOK, J. C. M. Antiinflamatórios não hormonais. **Einstein**, v. 6, n. Supl 1, p. S166-S74, 2008.

DAMASE-MICHEL, C.; CHRISTAUD, J.; BERREBI, A.; LCAROIX, I.; MONTASTRUC, J. What do pregnant women know about non-steroidal anti-inflammatory drugs?. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 18, n. 11, p. 1034-1038, 2009.

DATTA, S., SAMANTA, D., TIWARY, B., CHAUDHURI, A. G., CHAKRABARTI, N. Sex and estrous cycle dependent changes in locomotor activity, anxiety and memory performance in aged mice after exposure of light at night. **Behavioural brain research**, v. 365, p. 198-209, 2019.

DAVID, A.; PANCHARATNA, K. Developmental anomalies induced by a non-selective COX inhibitor (ibuprofen) in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 390-395, 2009.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.; GIUDICE, L. C. et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine reviews**, v. 30, n. 4, p. 293-342, 2009.

EFOSA, N. J.; KLEINER, W.; KLOAS, W.; HOFFMANN, F. Diclofenac can exhibit estrogenic modes of action in male *Xenopus laevis*, and affects the hypothalamus-pituitary-gonad axis and mating vocalizations. **Chemosphere**, v. 173, p. 69-77, 2017.

ELIBOL, B.; OĞUR, B.; DOĞRU, H. Prenatal exposure of diclofenac sodium alters the behavioral development of young Wistar rats. **Turkish Journal of Biology**, v. 43, n. 5, p. 305-313, 2019.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Veterinary Medicines and Inspections. **Committee for veterinary medicinal products – Diclofenac**, Sep 2003

FONTENELE, E. G. P.; MARTINS, M. R. A.; QUIDUTE, A. R. P.; JUNIOR, R. M. M. Contaminantes ambientais e os interferentes endócrinos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 54, n. 1, p. 6-16, 2010.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química nova**, v. 30, n. 3, p. 695-706, 2007.

GOKCIMEN, A.; RAĞBETLI, M. Ç.; BAŞ, O.; TUNC, A. T.; ASLAN, H.; YAZICI, A. C.; KAPLAN, S. Effect of prenatal exposure to an anti-inflammatory drug on neuron number in cornu ammonis and dentate gyrus of the rat hippocampus: a stereological study. **Brain research**, v. 1127, p. 185-192, 2007.

GORE, A. C.; KRISHNAN, K.; REILLY, M. P. Endocrine-disrupting chemicals: effects on neuroendocrine systems and the neurobiology of social behavior. **Hormones and behavior**, 2018.

GORSKI, R. A.; HARLAN, R. E.; JACOBSON, C. D.; SHRYNE, J. E.; SOUTHAM, A. M. "Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, v. 193, n. 2, p. 529-539, 1980.

GRÖNER, F.; HÖHNE, C.; KLEINER, W.; KLOAS, W. 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, 2017.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 327, n. 1, p. 1-5, 1984.

HAY-SCHMIDT, A.; FINKIELMAN, O. T. E.; JENSEN, B. A. H.; HØGSBRO, C. F. et al. Prenatal exposure to paracetamol/acetaminophen and precursor aniline impairs masculinisation of male brain and behaviour. **Reproduction**, v. 154, n. 2, p. 145-152, 2017.

HENLEY, C. L.; NUNEZ, A. A.; CLEMENS, L. G. Hormones of choice: the neuroendocrinology of partner preference in animals. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 32, n. 2, p. 146-154, 2011.

HERBST A. L.; ULFELDER, H. POSKANZER, D.C. Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal diethylstilbestrol therapy with tumor appearance in young women. **New England Journal of Medicine** v. 284, n. 15, p. 878-881, 1971.

HOUTSMULLER, E. J.; BRAND, T; DE JONGE, F. H. et al. SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. **Physiology & behavior**, v. 56, n. 3, p. 535-541, 1994.

HURTADO-GONZALEZ, P. ANDERSON, R. A.; MACDONALD, J.; VAN DEN DRIESCHE, S. et al. Effects of exposure to acetaminophen and ibuprofen on fetal germ cell development in both sexes in rodent and human using multiple experimental systems. **Environmental health perspectives**, v. 126, n. 4, p. 047006, 2018.

IMHOF, J. T.; COELHO, Z. M.; SCHMITT, M. L.; MORATO, G. S.; CAROBREZ, A. P. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. **Behavioural brain research**, v. 56, n. 2, p. 177-180, 1993.

JACOBSON, C. D.; CSERNUS, V. J.; SHRYNE, J. E.; GORSKI, R. A. The influence of gonadectomy, androgen exposure, or a gonadal graft in the neonatal rat on the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *The Journal of Neuroscience*, v. 1, n. 10, p. 1142-1147, 1981.

JOHNSTON, A. L.; FILE, S. E. Sex differences in animal tests of anxiety. **Physiology & behavior**, v. 49, n. 2, p. 245-250, 1991.

KABIR, E. R.; RAHMAN, M. S.; RAHMAN, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 40, n. 1, p. 241-258, 2015.

KRISTENSEN, D. M.; HASS, U., LESNE, L.; LOTTRUP, G.; JACOBSEN, P. R. et al. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. **Human Reproduction**, v. 26, n. 1, p. 235-244, 2010.

LEE, J.; JI, K.; KHO; Y. L.; KIM, P.; CHOI, K. Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and Japanese medaka. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 5, p. 1216-1225, 2011.

LONAPPAN, L., BRAR, S. K.; DAS, R. K.; VERMA, M.; SURAMPALLI, R. Y. Diclofenac and its transformation products: environmental occurrence and toxicity-a review. **Environment International**, v. 96, p. 127-138, 2016.

MALLOZZI, M.; BORDI, G.; GARO, C.; CASERTA, D. The effect of maternal exposure to endocrine disrupting chemicals on fetal and neonatal development: A review on the major concerns. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 108, n. 3, p. 224-242, 2016.

MARCOLONGO, R.; BARRECA, C.; COCCO, R.; MINARI, C.; BIASI, G.; CHINDAMO, D.; TOFI, C.; PALAZZINI, E. Efficacy of a prolonged-release dosage form of diclofenac sodium in some rheumatic diseases. **Current therapeutic research**, v. 57, n. 9, p. 711-719, 1996.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K. J.; MELO, L. L.; SPADADI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

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

MARKOVIC, M.; SWANSON, S. A.; STRICKER, B. H.; JADDOE, V. W.; VERHULST, F. C.; TIEMEIER, H.; EL MARROUN, H. Prenatal exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and neurodevelopmental outcomes in children. **Pharmacoepidemiology and drug safety**, v. 28, n. 4, p. 452-459, 2019.

MAZAUD-GUITTOT, S. NICOLAZ, C. N.; DESDOITS-LETHIMONIER, C.; COIFFEC, I. et al. Paracetamol, aspirin, and indomethacin induce endocrine disturbances in the human fetal testis capable of interfering with testicular descent. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 11, p. E1757-E1767, 2013.

MONNERET, C. What is an endocrine disruptor?. **Comptes rendus biologies**, v. 340, n. 9-10, p. 403-405, 2017.

MURSHID, S.; DHAKSHINAMOORTHY, G. P. Biodegradation of Sodium Diclofenac and Mefenamic Acid: Kinetic studies, identification of metabolites and analysis of enzyme activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 144, p. 104756, 2019.

NEZVALOVÁ-HENRIKSEN, K.; SPIGSET, O.; NORDENG, H. Effects of ibuprofen, diclofenac, naproxen, and piroxicam on the course of pregnancy and pregnancy outcome: a prospective cohort study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 120, n. 8, p. 948-959, 2013.

ØSTENSEN, M. E. Safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and lactation. **Inflammopharmacology**, v. 4, n. 1, p. 31-41, 1996.

ÖZYURT, B.; KESICI H., ALICI, S. K., YILMAZ S., ODACI E., ASLAN H., RAĞBETLI, M. Ç., KAPLAN, S. Prenatal exposure to diclofenac sodium changes the morphology of the male rat cervical spinal cord: a stereological and histopathological study. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 2, p. 282-287, 2011.

PADBERG, S.; TISSEN-DIABATÉA, T.; DATHEA, K.; HULTZSCHA, S.; MEIXNER, K. et al. Safety of diclofenac use during early pregnancy: A prospective observational cohort study. **Reproductive Toxicology**, v. 77, p. 122-129, 2018.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PHASUPHAN, W.; PRAPHAIRAKSIT, N.; IMYIM, A. Removal of ibuprofen, diclofenac, and naproxen from water using chitosan-modified waste tire crumb rubber. **Journal of Molecular Liquids**, v. 294, p. 111554, 2019.

PIFFER, R. C.; GARCIA, P. C.; PEREIRA, O. C. M. Adult partner preference and sexual behavior of male rats exposed prenatally to betamethasone. *Physiology & behavior*, v. 98, n. 1-2, p. 163-167, 2009.

RAGBETLI, M. Ç.; KARA, M.; ÇÖLÇİMEN, N.; KOYUN, N.; ÇAKMAK, G.; AKYOL, V.; DENİZ, O. G.; YURT, K. K. Prenatal exposure to low-dose diclofenac sodium does not affect total neuron numbers in spinal segment T13 in rats. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 87, p. 49-53, 2018.

RIVOLLIER, F.; KREBS, M.; KEBIR, O. Perinatal Exposure to Environmental Endocrine Disruptors in the Emergence of Neurodevelopmental Psychiatric Diseases: A Systematic Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 16, n. 8, p. 1318, 2019.

SATHISHKUMAR, P.; MEENA, R. A. A.; PALANISAMI, T.; ASHOKKUMAR, V.; PALVANNAN, T.; GU, F. L. Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota-a review. **Science of The Total Environment**, p. 134057, 2019.

SAYIN, A.; DERİNÖZ, O.; YÜKSEL, N.; ŞAHİN, S.; BOLAY, H. The effects of the estrus cycle and citalopram on anxiety-like behaviors and c-fos expression in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 124, p. 180-187, 2014.

SCHERNECK, S.; SCHÖPAB, F. L.; ENTEZAMIC, M.; KAYSERA, A.; WEBER-SCHOENDORFERA, C.; SCHAEFER, C. Reversible oligohydramnios in the second trimester of pregnancy in two patients with long-term diclofenac exposure. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 61-64, 2015.

SCHOLER, D. W.; KU, E. C.; BOETTCHER, I.; SCHWEIZER, A. Pharmacology of diclofenac sodium. **The American journal of medicine**, v. 80, n. 4, p. 34-38, 1986.

SERVEY, J.; CHANG, J. Over-the-counter medications in pregnancy. **American family physician**, v. 90, n. 8, 2014.

SIU, S. S. N.; YEUNG, J. H. K.; LAU, T. K. A study on placental transfer of diclofenac in first trimester of human pregnancy. **Human Reproduction**, v. 15, n. 11, p. 2423-2425, 2000.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US EPA). **EPA/630/R-96/012**: Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis. Washington, 1997.

VERONESI, V. B.; BATISTA, T. H.; RIBEIRO, A. C. A. F.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal dipyrrone treatment during lactation in mice reduces maternal behavior and increases anxiety-like behavior in offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 58, p. 74-81, 2017.

VEURINK, M.; KOSTER, M.; JONG-VAN DER BERG, L. T. W. The history of DES, lessons to be learned. **Pharmacy World and Science**, v. 27, n. 3, p. 139-143, 2005.

WALF, A. A., KOONCE, C., MANLEY, K., FRYE, C. A. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. **Behavioural brain research**, v. 196, n. 2, p. 254-260, 2009.

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

XIA, L.; ZHENG, L.; ZHOU, J. L. Effects of ibuprofen, diclofenac and paracetamol on hatch and motor behavior in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 182, p. 416-425, 2017.

YURT, K. K., KAPLAN, S. As a painkiller: a review of pre-and postnatal non-steroidal anti-inflammatory drug exposure effects on the nervous systems. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 15-28, 2018.

ZIMMERBERG, B.; FARLEY, M. J. Sex differences in anxiety behavior in rats: role of gonadal hormones. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 6, p. 1119-1124, 1993.