

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

PAOLA DA SILVA BALIN

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO
ANTI-INFLAMATÓRIO IBUPROFENO: REPERCUSSÃO TARDIA
EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS MASCULINOS, EM RATOS**

Botucatu – SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

PAOLA DA SILVA BALIN

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO *IN UTERO* E LACTACIONAL AO
ANTI-INFLAMATÓRIO IBUPROFENO: REPERCUSSÃO TARDIA
EM PARÂMETROS REPRODUTIVOS MASCULINOS, EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Arielle Cristina Arena

*Coorientador: Dr. José de Anchieta de Castro e
Horta Júnior*

Botucatu – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Balin, Paola da Silva.

Influência da exposição in utero e lactacional ao anti-inflamatório ibuprofeno : repercussão tardia em parâmetros reprodutivos masculinos, em ratos / Paola da Silva Balin. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Arielle Cristina Arena

Coorientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Capes: 21007004

1. Agentes anti-inflamatórios. 2. Antiinflamatório não esteroide. 3. ibuprofeno. 4. Comportamento sexual. 5. Prostaglandinas.

Palavras-chave: Área pré-óptica; Comportamento sexual; Diferenciação sexual hipotalâmica; Núcleo sexualmente dimórfico; Prostaglandinas.

Dedicatória

*Aos meus pais, Onofre e Eraci, e ao meu marido Diego, pelo amor,
dedicação e suporte incondicional e por sempre me darem a
oportunidade de querer e poder chegar aos meus objetivos.*

Agradecimientos

A Deus, pela oportunidade da vida, sabedoria e força para superar as dificuldades.

Ao meu marido Diego, amigo, conselheiro, companhia de todas as horas. Palavras jamais serão suficientes para expressar a minha gratidão por todo o amor, paciência e compreensão. Esta conquista, sem dúvida, também é sua.

Aos meus pais, Onofre e Eraci, meus exemplos de amor, dedicação e perseverança. Obrigada por me ensinarem que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Amo vocês.

À minha orientadora Professora Doutora Arielle Cristina Arena e ao meu coorientador Professor Doutor José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, pela inestimável orientação, incentivos e por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências. A companhia de vocês me serviu de ponte para a aquisição contínua de sabedoria.

A todos os meus colegas do laboratório que durante esses dois anos foram minha convivência diária, obrigada pela amizade, parceria, conversas e apoio em todos os momentos desse período. Um agradecimento especial às alunas Bárbara, Flávia e Giovanna, que me auxiliaram diretamente na execução dos experimentos, foram muitos dias de trabalho

intenso, mas sempre com dedicação, risadas, muitas conversas e troca de experiências.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento (ReproTox), em especial à Cibele, pela troca de experiências, discussões e auxílio na execução de várias etapas desse trabalho.

Aos meus grandes amigos, Bruna e Vinicius, que me acompanham desde a graduação, por todos os momentos que enfrentamos juntos, fortalecendo ainda mais os laços de amizade que formamos, vocês são muito importantes na minha vida. Nem os Km de distância foram capazes de abalar nossa amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neuromorfologia, Carla, Isabella e Marina, pelos bons momentos compartilhados durante todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Erick José Ramo da Silva e ao aluno de IC Alan, do Laboratório de Farmacologia da Reprodução e Andrologia, pelo auxílio na execução do protocolo do CASA.

À Professora Doutora Eunice Oba, do Laboratório de endocrinologia e transferência de embriões, pelas dosagens hormonais.

Ao técnico de laboratório José Eduardo (Zé), pela ajuda na confecção das Lâminas histológicas, por ser sempre tão prestativo e divertido. Obrigada pela amizade, brincadeiras e conversas.

Aos professores Godinho, Raquel e Aline pelas contribuições na qualificação.

Aos membros Titulares e Suplentes da Banca, pela disponibilidade e por compartilhar seus conselhos e aprendizados.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

Muito Obrigada!

Epígrafe

*"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade
continua misterioso diante de meus olhos"*

(Isaac Newton)

Sumário

Resumo.....	14
Abstract.....	17
Introdução	20
1. Diferenciação Sexual Hipotalâmica.....	21
1.1 Núcleo Sexualmente Dimórfico da Área Pré-óptica (SDN-POA).....	26
2. Problemática do uso de medicamentos na gestação e lactação	29
3. Ibuprofeno.....	31
Justificativa.....	34
Objetivos	36
Objetivo Geral.....	37
Referências bibliográficas	38
Capítulo 1.....	46
Abstract.....	50
Introduction.....	51
Materials and Methods.....	53
Results.....	62
Discussion.....	64
References.....	68
Figures and Tables	76
Supplementary material	87
Conclusão.....	93
Apêndice	95

Resumo

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), entre eles o Ibuprofeno, são amplamente utilizados para o tratamento da dor e de processos inflamatórios, e estão entre as classes de medicamentos mais utilizadas por gestantes. Através da inibição da enzima ciclo-oxigenase, os AINEs inibem a síntese de prostaglandinas, compostos eicosanoides que atuam não somente como mediadores e moduladores inflamatórios, mas também em diversos processos fisiológicos do organismo, como no mecanismo de diferenciação sexual hipotalâmica. O processo de masculinização do hipotálamo é dependente de testosterona, que por ação da enzima citocromo P450 aromatase, é convertida em estradiol. Este hormônio regula positivamente a expressão da enzima ciclo-oxigenase no hipotálamo, aumentando a produção de prostaglandina do subtipo E₂ (PGE₂), que atua aumentando a formação de espinhas dendríticas no núcleo sexualmente dimórfico da área pré-óptica (SDN-POA). Em virtude da importância da PGE₂ no processo de diferenciação sexual hipotalâmica, torna-se preocupante o uso de anti-inflamatórios durante a gestação. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos resultantes da exposição *in utero* e lactacional ao ibuprofeno e suas repercussões tardias sobre parâmetros reprodutivos masculinos em ratos machos. Para tanto, ratas prenhes foram expostas a três doses de ibuprofeno (10; 30; 60 mg/kg) entre a última semana de prenhez (Dias gestacionais 15-21) até o final da lactação (Dias pós-natal 21) por gavagem. Durante o tratamento, foram monitorados o consumo de água e ração, massa corporal e comportamento materno das ratas expostas. Após o desmame, coletou-se o sangue das mães para análises bioquímicas e órgãos para registro do peso. Após o nascimento, os filhotes machos foram avaliados através dos seguintes parâmetros: massa corporal, distância anogenital e idades de descida testicular e separação prepucial. Na vida adulta, estes mesmos animais foram investigados em relação a parâmetros comportamentais (comportamento sexual masculino e feminino e preferência sexual), fertilidade,

parâmetros espermáticos (contagem, motilidade e morfologia espermática), pesos de órgãos reprodutores, dosagem hormonal, quantificação do volume do SDN-POA e histologia de testículo e epidídimo. O tratamento com ibuprofeno não alterou os parâmetros maternos avaliados. A prole masculina apresentou redução na massa corporal e na distância anogenital, bem como, atraso nas idades de descida testicular e separação prepucial. Na vida adulta, os animais apresentaram redução nos níveis séricos de testosterona e no volume do núcleo de célula de Leydig. A exposição ao ibuprofeno não alterou os pesos dos órgãos reprodutores, a contagem espermática, a fertilidade ou o número de células de Sertoli, entretanto causou diminuição no número de espermatozoides normais. Em relação aos parâmetros comportamentais, os animais expostos ao ibuprofeno apresentaram tanto comportamento sexual masculino quanto feminino, contudo não houve alteração em relação ao padrão de preferência sexual. O volume total do SDN-POA não foi alterado. Concluiu-se que o ibuprofeno, nestas condições experimentais, foi capaz de perturbar a programação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, afetou a maturação sexual e as funções reprodutivas masculinas.

Palavras chaves: Prostaglandinas, diferenciação sexual hipotalâmica, área pré-óptica, núcleo sexualmente dimórfico, comportamento sexual.

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), including Ibuprofen, are widely used in the treatment of pain and inflammatory processes, and are of the most commonly classes of drugs used by pregnant women. By inhibiting the cyclooxygenase enzyme (COX), NSAID inhibit the synthesis of prostaglandins, eicosanoids compounds that act not only as mediators and inflammatory modulators, but also in various physiological processes of the organism, such as in the mechanism of sexual hypothalamic differentiation. The hypothalamus masculinization process is testosterone dependent, which by action of the aromatase cytochrome P450 enzyme is metabolized to estradiol. This hormone upregulates the expression of COX enzyme in the hypothalamus, increasing the production of prostaglandin E₂, which acts by increasing the formation of dendritic spines in the neurons of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in males (SDN-POA). Due to the importance of prostaglandin E₂ in the process of hypothalamic sexual differentiation, the use of anti-inflammatory drugs during pregnancy is of concern. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible effects resulting from *in utero* and lactation exposure to non-steroidal anti-inflammatory ibuprofen and its late repercussions on male reproductive parameters in male rats. For this, pregnant rats were exposed to three doses of ibuprofen (10; 30; 60 mg/kg) between the last week of pregnancy (Gestational Days 15-21) until the end of lactation (Postnatal Days 21) by gavage. During treatment, water consumption, food intake, body weight and maternal behavior of the dams were monitored. After weaning, blood samples was collected for biochemical analyzes and organs for weight recording. After birth, male offspring were evaluated through the following parameters: body weight, anogenital distance and ages of testicular descent and preputial separation. In the adult life, these same animals were investigated in relation to behavioral parameters (male and female sexual behavior and sexual preference), fertility, sperm parameters (sperm count, sperm

motility and sperm morphology), reproductive organ weights, hormonal levels, volume of the SDN-POA and histology of testis and epididymis. Treatment did not affect any of the maternal parameters evaluated. Male offspring presented reduction in body weight and anogenital distance, as well as delay in the ages of testicular descent and preputial separation. In adulthood, these animals showed reduced serum testosterone levels and the volume of Leydig cell nucleus. Exposure to ibuprofen did not alter reproductive organ weights, sperm count, fertility or the number of Sertoli cells; however it resulted in a decrease in the number of normal sperm. Regarding the behavioral parameters, the animals exposed to ibuprofen presented both male and female sexual behavior, but there was no change in relation to the pattern of sexual preference. The total volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area was not altered. It was concluded that ibuprofen, under these experimental conditions, was able to disturb the hypothalamic-pituitary-gonadal axis programming, affected sexual maturation and male reproductive functions.

Key words: Prostaglandins, hypothalamic sexual differentiation, preoptic area, sexually dimorphic nucleus, sexual behavior.

Introdução

1. Diferenciação Sexual Hipotalâmica

Cérebro e gônadas são órgãos bipotenciais durante o desenvolvimento embrionário, e as sinalizações hormonais são responsáveis por diferenciá-los em femininos ou masculinos (Schwarz & McCarthy, 2008). Assim, no início do desenvolvimento, os mamíferos precisam passar pelo processo de determinação sexual, em que o sexo genético (cromossômico) determinará o sexo gonadal, e de diferenciação sexual, no qual os hormônios gonadais determinarão o sexo do cérebro (McCarthy & Arnold, 2011).

Em machos (XY), o desenvolvimento dos testículos está condicionado a presença do gene SRY, localizado no braço curto do cromossomo Y, responsável pela síntese do fator determinante de testículos (Koopman et al., 1990). Em fêmeas (XX), a ausência desse gene faz com que a gônada bipotente torne-se um ovário (Sinclair et al., 1990). Depois de desenvolvidos, os testículos começam a produzir quantidades significativas de testosterona (Weisz & Ward, 1980; Rhoda et al., 1984), a qual induzirá a formação do epidídimo, ducto deferente, glândulas sexuais acessórias e pênis (Jost, 1947). Em um determinado momento, no encéfalo a testosterona é convertida a estradiol, responsável por induzir mudanças em regiões hipotalâmicas, determinando assim a diferenciação sexual do cérebro, garantindo que o sexo gonadal seja o mesmo do cérebro (Figura 1) (Schwarz & McCarthy, 2008).

Antes do período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica, definido como uma janela em que o cérebro está particularmente sensível a ação hormonal, o hipotálamo de mamíferos está organizado intrinsecamente do tipo feminino, o que irá determinar na vida adulta, um comportamento sexual típico de fêmea e um padrão cíclico de secreção gonadotrofinas. Nos machos, para que ocorra o comportamento sexual tipicamente masculino e apareça o padrão tônico de secreção de gonadotrofinas,

o hipotálamo precisa ser masculinizado (Maclusky & Naftolin, 1981). Sendo assim, a diferenciação do sistema nervoso central (SNC) em machos é determinada por dois processos distintos: a defeminização e a masculinização. Em modelos experimentais, o processo de defeminização compreende a indução de esterilidade anovulatória e a redução da capacidade de apresentar lordose, já a masculinização é definida como a capacidade de apresentar comportamento de monta (McEwen, 1977).

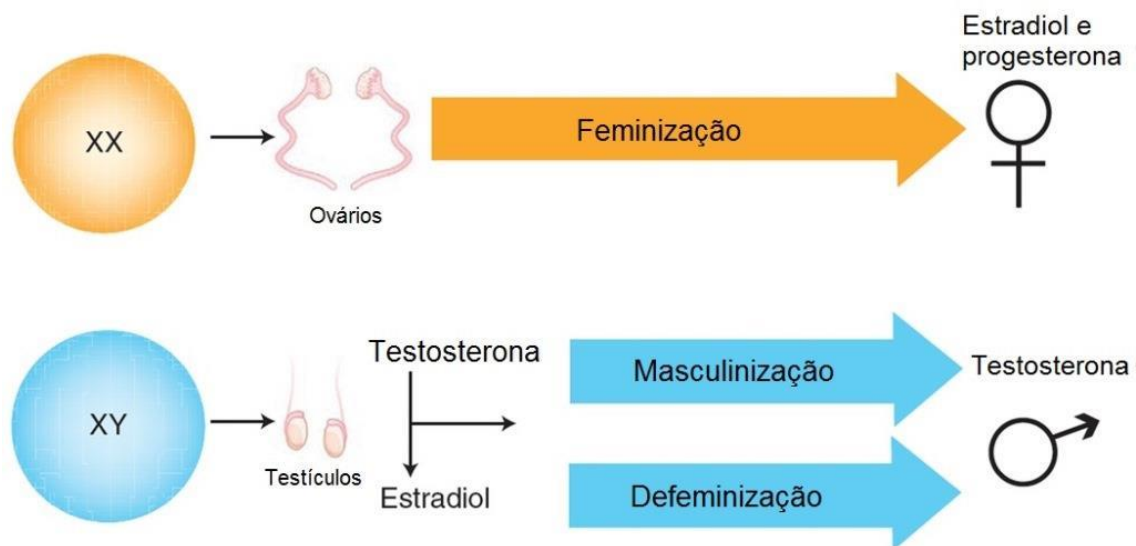


Figura 1- Visão linear do processo de diferenciação sexual, em que o sexo cromossômico determina sexo gonadal, que determina o sexo cerebral (Adaptado de McCarthy & Arnold, 2011).

O processo de masculinização do hipotálamo é dependente de testosterona, que por ação da enzima citocromo P450 aromatase, é metabolizada originando estrógeno no SNC (Rhoda et al., 1984; Erskine et al., 1988). O estrógeno liga-se a dois subtipos de receptores, o receptor de estrógeno α , envolvido com o processo de masculinização, e o receptor β , que tem maior função no processo de defeminização (Kudwa et al., 2006).

O momento exato do processo de masculinização cerebral em humanos ainda não está completamente elucidado (McCarthy et al., 2009). Sabe-se que a primeira “onda” de testosterona proveniente da gônada masculina ocorre entre a sexta e oitava

semanas de gestação e é responsável pela diferenciação da genitália (Auyeung et al., 2009). Uma segunda “onda” de esteroides sexuais ocorre na puberdade, sendo considerada uma fase de “refinamento” da diferenciação sexual e nesse momento, ocorre a organização dos circuitos neurais sexuais no cérebro do adolescente em desenvolvimento, facilitando a expressão do comportamento sexual (Schulz et al., 2009). Já em ratos, a elevação dos níveis de testosterona gonadal, relacionados ao mecanismo de diferenciação sexual hipotalâmica, ocorre no final da gestação e nos dez primeiros dias de vida pós-natal, apresentando dois picos, o primeiro no 18º e 19º dia de gestação (Weisz & Ward, 1980; McCarthy et al., 2009), e o segundo durante as primeiras horas após o nascimento (Corbier et al., 1978; Baum et al., 1988; Lalau et al., 1990; McCarthy et al., 2009). Corbier et al. (1992), em estudo comparativo, demonstraram que ocorre também uma elevação nos níveis de testosterona, após as primeiras horas do nascimento, numa variedade de mamíferos machos, como camundongos, cavalos e humanos, corroborando a importância dos andrógenos na diferenciação sexual do SNC desta classe de vertebrados.

Evidências sugerem que a conversão de testosterona a estradiol pela aromatase neural é o mecanismo responsável por regular diversos processos fisiológicos e comportamentais, como a ativação do comportamento sexual masculino, a diferenciação sexual hipotalâmica e efeitos na retroalimentação negativa sobre a secreção de gonadotrofinas (Balthazart & Ball, 1998). Dessa forma, substâncias capazes de suprimir ou retardar o pico de testosterona neonatal podem alterar o processo de masculinização e/ou defeminização do hipotálamo (Gore, 2010).

Para garantir o dimorfismo sexual cerebral, a aromatização da testosterona é um evento necessário, e o estrógeno resultante é o responsável por atuar nos núcleos hipotalâmicos para garantir a masculinização do SNC de roedores (Naftolin et al.,

1975). Através de mecanismos distintos, o estradiol induz mudanças permanentes em diferentes regiões do cérebro durante o período crítico de desenvolvimento (Figura 2). Alguns dos mecanismos relacionados à masculinização do hipotálamo são: indução de apoptose celular, gerando diferenças sexuais volumétricas nos núcleos hipotalâmicos; alteração da função neurotransmissora no hipotálamo mediobasal; aumento na expressão de enzimas envolvidas na síntese do ácido gama-aminobutírico (GABA), aumentando a complexidade dos astrócitos no núcleo arqueado de machos, e também a indução de diferença sexual morfológica e volumétrica nos neurônios e astrócitos do núcleo sexualmente dimórfico da área pré-optica (SDN-POA) via prostaglandina E₂ (PGE₂), sendo esta via prostanoide a mais importante relacionada ao processo de masculinização e defeminização de machos (Schwarz & McCarthy, 2008).

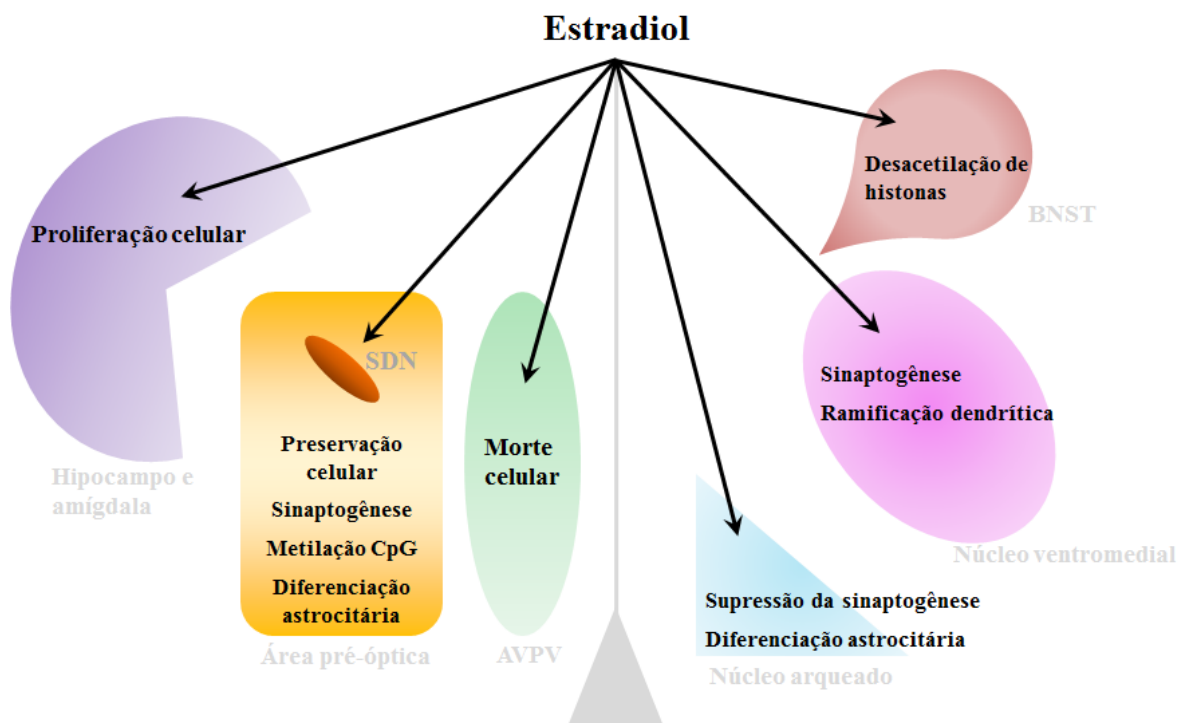


Figura 2 - Múltiplos mecanismos de diferenciação induzidos pelo estradiol (Adaptado de McCarthy & Arnold, 2011).

Existem vários tipos conhecidos de prostaglandinas (PG), com subtipos e padrões de receptores distribuídos no organismo. As prostaglandinas são compostos

eicosanoides que atuam não somente como mediadores e moduladores inflamatórios, mas também estão implicados em diversos processos fisiológicos do organismo (Rang et al., 2012; Smyth et al., 2012), como por exemplo, no mecanismo de diferenciação sexual hipotalâmica (Amateu & McCarthy, 2004). Uma evidência de que a PGE₂ é um regulador potente do desenvolvimento normal do sexo masculino foi demonstrada por Todd et al. (2005). Neste estudo, ratos machos tratados ao nascer com Indometacina, um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) inibidor seletivo da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (enzima responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas), não exibiram comportamento sexual masculino ou feminino na idade adulta, indicando que eles foram completamente defeminizados, mas não masculinizados, demonstrando o papel chave da PGE₂ no processo de masculinização do hipotálamo mediado pelo estradiol.

Enquanto o processo de diferenciação sexual em machos é bastante estudado e conhecido, o mesmo nas fêmeas ainda é pouco elucidado. Por muito tempo acreditou-se que o processo de feminização do cérebro feminino ocorria de forma passiva, na ausência de qualquer secreção hormonal. Entretanto, este conceito vem sendo contestado, pois há indícios de que este também seja um processo ativo dependente de estradiol (Toran-Allerand, 1976; Döhleret et al., 1984; Mack et al., 1993). Sabe-se que a alfa-fetoproteína (AFP), uma glicoproteína plasmática produzida em grandes quantidades durante a vida fetal pelas células da endoderme do saco vitelino, pelos hepatócitos e, em menor quantidade, pelo trato gastrointestinal, protege o cérebro fetal feminino da exposição a estrógenos circulantes maternos, pois se liga com elevada afinidade ao estrógeno não permitindo que este atinja o hipotálamo. A síntese de AFP diminui acentuadamente logo após o nascimento e apenas quantidades traços são detectadas em adultos (Bakker et al., 2006; Bakker & Baum, 2008).

Contudo, os dados existentes na literatura não identificaram até o momento em qual estágio do desenvolvimento (embrionário, pós-natal, pré-púbere ou pós-púbere), ocorre a janela crítica para diferenciação sexual hipotalâmica em fêmeas.

Devido ao fato do processo de diferenciação sexual hipotalâmica ser controlado por diferentes mecanismos, estudos demonstram que o estresse, a exposição a contaminantes ambientais, bem como a administração de medicamentos durante seu período crítico podem comprometer esse processo, acarretando em alterações na fisiologia reprodutiva e no comportamento sexual (Arena & Pereira, 2002; Pereira & Piffer, 2005; Negri-Cesi, 2015), as quais muitas vezes somente serão detectadas mais tarde, na vida adulta reprodutiva.

Conclusão

Nossos resultados demonstraram, neste modelo experimental, que a exposição *in utero* e lactacional ao anti-inflamatório ibuprofeno foi capaz de desencadear efeitos adversos sobre o desenvolvimento sexual inicial, parâmetros reprodutivos e comportamentais da prole masculina, indicando que o ibuprofeno pode afetar a programação fetal se for utilizado durante o período crítico de diferenciação sexual hipotalâmica.