

# **Estudo do efeito do Diclofenac e do Paracetamol na artéria aorta do rato**

Sara Maria Antunes Rebelo da Costa

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Medicina**  
(Mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutora Maria Elisa Cairrão Rodrigues Oliveira

**maio de 2020**



# Agradecimentos

A presente tese de mestrado constitui o corolário lógico de algumas horas de trabalho, pelo que quero exprimir a minha maior gratidão para com algumas pessoas que me acompanharam e ajudaram em mais esta importante etapa da minha vida.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Elisa Cairrão, a minha orientadora desta dissertação, pela paciência, disponibilidade, empenho, dedicação e rigoroso conhecimento científico transmitido, um inestimável contributo para a minha formação académica e humana.

Estendo o meu agradecimento, a todos os membros do laboratório, em especial à Margarida Lorigo pela ajuda, espírito de colaboração e abertura que sempre me concedeu.

À Faculdade de Ciências da Saúde e a todos os que, de alguma forma, contribuíram para que o meu percurso académico, durante estes seis anos, se concretizasse e, sobretudo, me proporcionassem um maior e melhor desenvolvimento pessoal, social e académico.

À minha família, em especial aos meus pais, os meus exemplos de tenacidade e perseverança, por tudo o que sempre me inculcaram ao longo da minha vida, pelo permanente apoio incondicional que me deram, sobretudo nos momentos de algum desânimo, incentivando-me no sentido de caminhar em busca dos meus sonhos.

À minha irmã e ao Nuno por todo o exemplo, apoio e incentivo que sempre me deram.

Ao João por toda a motivação, amizade, compreensão e companheirismo.

Aos meus amigos por todo apoio e motivação que sempre manifestaram.



# Resumo

**Introdução:** Os disruptores são compostos naturais ou sintéticos que podem perturbar a homeostasia do sistema endócrino em humanos e animais. Há alguns medicamentos definidos como possíveis disruptores endócrinos. O diclofenac (DCF) é um anti-inflamatório não esteroide (AINE) enquanto que o paracetamol (PAR) é um fármaco analgésico e antipirético, sendo dos medicamentos mais utilizados a nível mundial. Recentemente, alguns estudos sugeriram que o paracetamol e o diclofenac podem ter um potencial disruptor endócrino interferindo na homeostasia hormonal sexual. No entanto, seu efeito vascular enquanto disruptor endócrino nunca foi estudado.

**Objetivo:** Assim, o objetivo deste estudo é investigar os efeitos do paracetamol e do diclofenac nas células do músculo liso da aorta do rato, sem endotélio, a fim de analisar seus potenciais efeitos não genómicos independentes do endotélio.

**Material e Métodos:** Utilizando a técnica padrão de banho de órgãos, contraíram-se os anéis aórticos de ratos sem endotélio com noradrenalina (NA) a  $1\mu\text{M}$  e cloreto de potássio (KCl) a  $60\text{mM}$ . Os efeitos do paracetamol e do diclofenac foram analisados em diferentes concentrações crescentes.

**Resultados:** Os resultados preliminares demonstraram que o paracetamol induz um relaxamento da aorta, sendo este efeito vasorelaxante maior nas artérias previamente contraídas com NA do que com KCl. No que concerne ao diclofenac, os resultados demonstram uma menor atividade vasorrelaxante que o paracetamol. O efeito vasorelaxante significativo máximo foi observado nas artérias contraídas com KCl. Por outro lado, os resultados sugerem que o diclofenac não apresenta um efeito relaxante significativo nas aortas de ratos contraídas com NA.

**Discussão e Conclusão:** Os dois fármacos induzem a um relaxamento nas células do músculo liso vascular de rato sendo necessários mais estudos para esclarecer o seu modo de ação vascular. Estes efeitos parecem ser similares aos do estrogénio a nível vascular o que poderá corroborar os trabalhos de investigação que apontam estes fármacos como tendo uma ação disruptora endócrina estrogénica.

## **Palavras-chave**

Diclofenac; paracetamol; disruptor endócrino; células musculares lisas da aorta de rato; estrogénio.



# Abstract

**Introduction:** Endocrine disruptors are natural or synthetic compounds that can disturb the homeostasis of the endocrine system in humans and animals. There are a few drugs that have been defined as possible endocrine disruptors. Diclofenac (DCF) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) and Paracetamol (PAR) is an analgesic and antipyretic drug, both are among the most used drugs worldwide. Recently, some studies suggested that paracetamol and diclofenac can have endocrine disruptive potential through interference with sexual hormonal homeostasis. However, its vascular effect as an endocrine disruptor has never been analysed.

**Objective:** In this sense, the aim of this study is to analyse the Paracetamol and Diclofenac effects on the rat aortic smooth muscle cells without endothelium in order to analyse its potential non-genomic effects independent of endothelium.

**Material and Methods:** Using a standard organ bath technique, rat aortic rings without endothelium were contracted with noradrenaline (NA) at 1 $\mu$ M and Potassium chloride (KCl) at 60mM. The effects of Paracetamol and Diclofenac were analysed at different concentrations.

**Results:** Preliminary results indicated that Paracetamol induces aorta relaxation with a higher vasorelaxant effect in the arteries previously contracted with NA than with KCl. Regarding Diclofenac, our results demonstrate a lower vasorelaxant activity than paracetamol. The maximal significant vasorelaxant effect was observed in the arteries contracted with KCl. On the other hand, the results suggest that Diclofenac has no significant relaxant effect in rat aortas contracted with NA.

**Discussion and Conclusion:** The two drugs induce relaxation on rat vascular smooth muscle cells and further studies are needed to clarify their vascular mode of action. These effects appear to be similar to those of estrogen on vascular level, what can confirm the researches that suggest that these drugs can have an estrogenic endocrine disruptive action.

## **Keywords**

Diclofenac; paracetamol; endocrine disruptor; rat aortic smooth muscle cells; estrogen.



# Índice

1. Introdução	1
1.1 Enquadramento geral	1
1.2 Disruptores Endócrinos	1
1.2.1 Vias de Exposição	2
2. Efeitos ao nível da saúde	2
2.1.1 Mecanismos de Ação	3
2.2 Produtos Farmacológicos	4
2.3 Anti-Inflamatórios Não Esteroides	5
2.3.1 Mecanismo de ação	5
2.3.2 Diclofenac	8
Efeito disruptor endócrino	8
2.4 Paracetamol	10
Efeito disruptor endócrino	11
2.5 Células Musculares Lisas	12
2.6 Efeito do Estrogénio a nível Vascular	13
2.6.1 Efeitos Genómicos	14
2.6.2 Efeitos Não Genómicos	14
2.7 Motivação e objetivos	16
3. Materiais e Métodos	19
3.1 Extração e Preparação dos anéis da artéria aorta torácica do rato	19
3.2 Preparação das Soluções	19
3.3 Estudo de contratilidade arterial	20
3.4 Avaliação da Viabilidade celular (Ensaio MTT)	21
3.5 Análise Estatística	21
4. Resultados	23
4.1 Efeitos do diclofenac nas artérias contraídas com KCL e NA	23
4.1.1 Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis	24
4.2 Efeitos do paracetamol nas artérias contraídas com KCL e NA	25
4.2.1 Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis	26
4.3 Avaliação da Viabilidade Celular	27
5. Discussão	29
6. Conclusão	32
Referências Bibliográficas	35



# Lista de Figuras

Figura 1 - Via da COX e síntese de prostaglandinas, retirado de (Kawahara, K et al. 2015) <sup>(40)</sup> .....	7
Figura 2 - Estrutura química do Diclofenac, retirado (Klopčič , I et al. 2018) <sup>(13)</sup> .....	9
Figura 3 - Estrutura química do Paracetamol, retirado (Klopčič , I et al. 2018) <sup>(13)</sup> .....	11
Figura 4 - Efeitos genómicos e não genómicos do estrogénio no musculo liso vascular. (Orshal , JM et al. 2004) <sup>(66)</sup> .....	16



# Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com cloreto de potássio (KCl 60 mM)	23
Gráfico 2 - Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com noradrenalina (NA 1 $\mu$ M).	24
Gráfico 3 -Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com NA 1 $\mu$ M e com KCl 60 mM.	24
Gráfico 4 - Efeito vasorelaxante do PAR (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com Cloreto de Potássio (KCl 60 mM)	25
Gráfico 5 - Efeito vasorelaxante do PAR (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com noradrenalina (NA 1 $\mu$ M).	26
Gráfico 6 - Efeito vasorelaxante do PAR (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com NA 1 $\mu$ M e com KCl 60 mM.	26
Gráfico 7- Percentagem de viabilidade celular das células do musculo liso da artéria aorta do rato após exposição a DCF.	27
Gráfico 8- Percentagem de viabilidade celular das células do musculo liso da artéria aorta do rato após exposição a PAR.	28



## Lista de Acrónimos

4-HT	4-Hidroxitamoxifeno
5-HT	Serotonina
A7r5	Células do músculo liso da aorta torácica do rato
AA	Ácido Araquidónico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
AR	Recetor de androgénio
BK	Canais de potássio de elevada condutância ativados por cálcio
CaD	Caldesmona
CAM	Calmodulina
COX	Ciclooxigenase
CYP17	C17,20-liase
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DCF	Diclofenac
DE	Disruptor Endócrino
E2	Estradiol
EC <sub>50</sub>	Concentração que induz metade do efeito máximo
EGFR	Recetor do fator de crescimento epidérmico
eNOS	Oxido Nítrico sintetase endotelial
ER	Recetor de estrogénio

ERE	Elementos de resposta ao estrogénio
ERK	Cinases reguladas por sinais extracelulares
FDA	Food and Drug Administration
GF	Fator de crescimento
GH3	Células pituitárias de rato
GPER	Recetor de estrogénio acoplado a proteína G
GR	Recetor de glucocorticoide
H295R	Células do carcinoma adrenocortical humano
IC50	Concentração inibitória para 50%
IP3	Inositol trifosfato
KCl	Cloreto de potássio
LH	Hormona luteinizante
LT	Leucotrieno
LTCC	Canal de cálcio do tipo L
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MDA-kb2	Células do carcinoma mamário humano
ML	Cadeia leve de miosina
MLC	Cinase da cadeia leve de miosina
MLV	Musculo liso Vascular
NA	Noradrenalina
NCX	Transportador trocador de Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintetase
PAR	Paracetamol

PG	Prostaglandina
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLHC-1	Células de hepatocarcinoma de peixe
PRTH	Células de hepatócitos de truta
PMCA	Ca <sup>2+</sup> ATPase da membrana plasmática
RLC-18	Células hepáticas embrionárias de rato
ROC	Canal de cálcio operado por recetor
RPT	Recetor de potencial transitório
RS	Retículo sarcoplasmático
RYR	Recetor de rianodina
SERM	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénio
SERCA	Ca <sup>2+</sup> - ATPase do retículo sarcoplasmático
SOC	Canal operado por depósitos intracelulares
T47D	Células do carcinoma mamário humano
TR	Recetor de hormonas tiroideias
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VGCC	Canais de Ca <sup>2+</sup> dependentes de voltagem
VTG	Vitelogelina



# Capítulo 1

## 1. Introdução

### 1.1 Enquadramento geral

O desenvolvimento científico e tecnológico permitiu significativos avanços que vieram colmatar as necessidades médicas, científicas, agrícolas e industriais, possibilitando grandes benefícios na qualidade de vida, saúde e bem-estar do ser humano. No entanto, apesar dos impactos positivos inerentes ao referido desenvolvimento, estes avanços também trouxeram o chamado «reverso da medalha», isto é, efeitos negativos ao nível da saúde.<sup>(1)</sup>

Assim, nas últimas décadas, é cada vez maior a consciência e uma inerente preocupação, face ao potencial efeito disruptor endócrino de algumas substâncias e dos malefícios provocados à saúde humana e aos ecossistemas como consequência do aumento de patologias endócrino-mediadas.<sup>(2),(3)</sup>

Hoje, são conhecidas ou suspeitas cerca de 800 substâncias químicas, passíveis de interferir com a homeostasia endócrina. Contudo, apenas uma pequena fração destes produtos foi investigada em testes capazes de identificar efeitos endócrinos evidentes em humanos.<sup>(4)</sup>

O sistema endócrino é indispensável para a saúde de todos os seres vivos. É constituído por glândulas que secretam hormonas que atuam em pequenas concentrações e momentos precisos de forma a regular o crescimento e desenvolvimento do organismo, o seu metabolismo, imunidade e o próprio comportamento. Assim sendo, ínfimas alterações na homeostasia endócrina, poderão ter repercussões severas no mesmo organismo.<sup>(5)</sup>

### 1.2 Disruptores Endócrinos

Os Disruptores Endócrinos (DEs) são substâncias ou misturas exógenas que conseguem interferir com a ação fisiológica das hormonas endógenas e consequentemente exercer efeitos deletérios na saúde dos indivíduos expostos e à sua descendência.<sup>(6)</sup>

O tempo de latência entre a exposição a DEs e o surgimento de repercussões clínicas pode ser longo manifestando-se, muitas vezes, anos após a exposição ter cessado. O efeito dos DEs pode advir da ação de metabolitos primários e ou secundários, provenientes da metabolização do composto principal.<sup>(5)</sup> Os DEs englobam um grupo ubíquo e heterogéneo de compostos aos quais as pessoas estão expostas no seu quotidiano ocupacional, através da dieta ou no meio ambiente.

Os DEs podem ser classificados em compostos naturais tais como os fitoestrogénios, extratos de plantas ou fungos e em produtos sintéticos, na sua maioria, produzidos e libertados pela atividade humana para os ecossistemas.<sup>(7)</sup> O último grupo inclui químicos utilizados na agricultura e controlo de pragas (pesticidas, fungicidas, inseticidas), compostos utilizados na produção de plásticos, lubrificantes, metais pesados, aditivos e contaminantes alimentares, cosméticos e fármacos.<sup>(8),(9)</sup>

### **1.2.1 Vias de Exposição**

A exposição aos DEs pode dar-se por via inalatória, cutânea ou pela ingestão de produtos contaminados.<sup>(10)</sup> Estes compostos têm o potencial de atravessar a barreira placentária, sendo transmitidos por via vertical da mãe para o filho, ou de serem excretados no leite materno.<sup>(6)</sup>

O período durante o qual decorre a exposição aos DEs tem um impacto crucial na sua toxicidade. A sensibilidade à desregulação endócrina não é a mesma em todos os recetores, tecidos ou órgãos, sendo maior durante o desenvolvimento do tecido. Apesar de terem repercussões nefastas na saúde em todas as idades e géneros, as grávidas e os grupos etários mais jovens, são particularmente mais suscetíveis e sensíveis a estes xenobióticos.<sup>(9),(11)</sup>

A exposição a DEs durante o período embrionário, perinatal e em estádios de vida precoces comporta maiores riscos do que em idades adultas devido à maior plasticidade, turnover celular e imaturidade dos sistemas fisiológicos inerente a esses períodos de vida.<sup>(12),(13)</sup>

A exposição a DEs pode ter efeitos adversos cumulativos sobre as futuras gerações. Novas evidências sugerem que a exposição numa fase precoce da vida deixa marcas epigenéticas no genoma, o que poderá acarretar um maior risco de patologia oncológica<sup>(14)</sup> e cardiovascular em fases mais tardias da vida.<sup>(15),(16)</sup>

## **2. Efeitos ao nível da saúde**

Diferentes estudos indicaram a potencial relação dos disruptores endócrinos com distúrbios cardiovasculares, pulmonares, anomalias ao nível do sistema reprodutor, disfunção tiroideia, disfunção adrenal, patologia neurológica e desregulação imunitária.<sup>(17),(18),(19)</sup>

A interferência com diversos órgãos e sistemas demonstra que os DEs poderão estar associados a uma multiplicidade de patologias tais como, infertilidade, síndrome do ovário poliquístico, hipotireoidismo e patologias neurocognitivas como a doença de alzheimer e parkinson.<sup>(20)</sup>

Para além da infertilidade, os DEs também têm sido apontados como tendo efeitos deletérios ao nível do desenvolvimento do sistema reprodutivo masculino, incluindo defeitos congénitos como criptorquidia e hipospadias. <sup>(3)</sup> Vários estudos têm apontado alguns DEs como responsáveis pela desregulação do sistema imunitário e pelo desenvolvimento de alergias e patologias como a asma.<sup>(21)</sup>

A interferência ao nível da homeostasia tiroidea, para além de repercussões ao nível do metabolismo basal e no desenvolvimento de obesidade, poderá estar envolvida na génese de perturbações neurocomportamentais na infância, dado o papel crucial das hormonas tiroideas no neurodesenvolvimento.<sup>(22)</sup>

Estes xenobióticos, têm também, sido associados ao desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares tais como, obesidade visceral, dislipidemia e resistência à insulina, cuja coexistência pode culminar em síndrome metabólica.<sup>(6),(23)</sup> Em especial, estudos envolvendo reconhecidos DEs com uma ação moduladora seletiva dos recetores estrogénicos (SERM) têm demonstrado o potencial destes compostos em provocar desequilíbrios ao nível do sistema cardiovascular repercutindo-se no desenvolvimento de patologias como a hipertensão. Esta disrupção, poderá verificar-se durante períodos de maior plasticidade, como o período fetal, durante o qual a exposição a este DEs poderá repercutir-se em alterações genómicas no sistema cardiovascular, criando as condições para o desenvolvimento, durante a vida adulta de patologias como a hipertensão.<sup>(24)</sup>

No que concerne a patologias do foro oncológico a exposição a DEs poderá aumentar o risco de desenvolvimento de cancro ginecológicos hormono-dependentes, tais como os cancro da mama, do ovário e do endométrio e de tumores das células germinativas do testículo, nos homens.<sup>(25)</sup>

### **2.1.1 Mecanismos de Ação**

Estas moléculas têm características semelhantes às hormonas. Os mecanismos através dos quais desempenham a sua ação envolvem uma interferência no domínio da biossíntese hormonal, da ligação a proteínas e da sua distribuição no organismo, alterações ao nível do metabolismo, e também à ligação a recetores hormonais nucleares e não nucleares.

Os DEs podem exercer a sua ação através de via genómica ou de mecanismos não genómicos.<sup>(26)</sup>

No que respeita à via genómica, os seus efeitos decorrem da ligação a recetores nucleares (recetores de androgénio, de estrogénio, de progesterona, e de aril-hidrocarboneto), nos quais estes compostos vão exercer ações agonistas ou antagonistas, culminando na

estimulação ou inibição de mecanismos de transcrição ou pós transcrição celular e na subsequente alteração da expressão genética.

Relativamente aos efeitos relacionados com a via não genómica, estes podem ocorrer através da promoção de stress oxidativo, da ligação a recetores membranares de hormonas esteroides ou a recetores acoplados a proteína G produzindo alterações ao nível da sinalização intracelular a jusante.<sup>(11)</sup>

Os DEs interferem com os normais mecanismos epigenéticos, com repercussões ao nível da expressão genética.<sup>(7)</sup> Esta interferência ao nível da programação epigenética, durante o desenvolvimento, fomenta mecanismos moleculares que aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento de patologias em idades mais tardias.<sup>(27)</sup>

## **2.2 Produtos Farmacológicos**

Os medicamentos para além da ação farmacológica pretendida, não são desprovidos de efeitos adversos, sendo que alguns estudos têm demonstrado o potencial de alguns destes em exercerem ações disruptivas endócrinas. Alguns dos fármacos com este potencial, incluem anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), hormonas sexuais, glucocorticoides, antiarrítmicos, anti hipertensores, medicamentos antilipidémicos, antidepressivos e antipsicóticos.<sup>(18),(28),(29)</sup>

Apesar da crescente consciência do papel de alguns medicamentos na perturbação da homeostasia endócrina, o número de fármacos definidos como disruptores endócrinos, ainda é escasso em consequência da falta de realização de testes através dos métodos disponíveis.<sup>(13)</sup>

A problemática do efeito dos fármacos na disrupção endócrina não se restringe à administração destes em virtude da doença, mas também à sua perpetuação no meio ambiente numa espécie de ciclo vicioso, e à consequente entrada na cadeia alimentar. Alguns produtos farmacológicos constituem um grupo emergente de contaminantes ambientais. A capacidade de interferirem em mecanismos enzimáticos e metabólicos, de resistirem à degradação metabólica e de serem farmacologicamente ativos entre um elevado número de espécies, acrescida à capacidade de serem biologicamente ativos em baixas concentrações, exponencia o seu potencial deletério.<sup>(30)</sup>

Muitas vezes, as ações deletérias destes fármacos, em combinação, são superiores quando comparadas com os mesmos efeitos quando isolados.<sup>(31),(32)</sup>

## **2.3 Anti-Inflamatórios Não Esteroides**

Os AINEs são das classes farmacológicas mais utilizadas e prescritas no mundo. São um grupo muito heterogêneo de fármacos presentes no mercado global.

Configura-se como uma classe de medicamentos com excelente reputação no seio da população em geral, amplamente utilizados em contexto de automedicação e profilaxia, muitas vezes, de forma indiscriminada.<sup>(33).(34)</sup>

Os três principais efeitos terapêuticos desta classe de medicamentos são a ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. São fármacos considerados para tratamentos a curto prazo de condições dolorosas comuns, incluindo cefaleias, e para terapias de longo prazo, como sejam as patologias inflamatórias crônicas, incluindo a osteoartrite e a artrite reumatoide.

Neste grupo de fármacos, faz-se a distinção entre os AINEs não seletivos ou tradicionais e os AINEs seletivos para a COX-2.<sup>(34)</sup>

### **2.3.1 Mecanismo de ação**

Apesar de existirem diferenças estruturais, farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre os fármacos referidos, assume-se que os seus efeitos farmacológicos estão relacionados com um mecanismo similar, que consiste na inibição da ciclooxigenase (COX) e o consequente bloqueio da cadeia de conversão do ácido araquidónico em mediadores pro-inflamatórios.

Há pelo menos 2 isoformas conhecidas de COX, a COX-1 e a COX-2. Apesar de estarem relacionadas entre si e de catalisarem a mesma reação, estas enzimas divergem entre si na sua regulação e expressão em tecidos diversos. A enzima é bifuncional, com a atividade de ciclooxigenase de ácidos gordos. Aquela catalisa a conversão do ácido araquidónico em prostaglandina G<sub>2</sub>(PGG<sub>2</sub>) e a atividade de prostaglandina hidroxiperoxidase catalisando a conversão de PGG<sub>2</sub> em PGH<sub>2</sub>.<sup>(35)</sup>

A COX-1 é uma isoenzima constitutiva com funções preponderantes na manutenção da homeostasia dos tecidos. É responsável pela produção de prostaglandinas envolvidas na agregação plaquetária, homeostasia vascular, citoproteção gástrica, na modulação do fluxo sanguíneo renal e na perceção da dor. É a única isoforma expressa nas plaquetas.

Por sua vez, a COX-2 é uma enzima induzível geralmente ausente em condições basais na maioria dos tecidos normais. A sua expressão é geralmente induzida por mediadores inflamatórios (interferão- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1), hormonas, hipoxia tecidual catalisando a produção de prostaglandinas em contexto inflamatório e oncológico. É expressa

constitutivamente no cérebro, medula espinal ossos e rim. A sua atividade é importante na regulação do fluxo sanguíneo glomerular e no equilíbrio hidroeletrólítico.<sup>(33),(34)</sup>

O ácido araquidónico é um ácido gordo insaturado com 20 carbonos, produzido a partir dos fosfolípidos da membrana celular através da ação da fosfolipase A<sub>2</sub>. O metabolismo do ácido araquidónico (AA) dá-se através de duas vias enzimáticas principais: a da cicloxigenase que estimula a produção de prostaglandinas (PGs) e de tromboxano (TXA<sub>2</sub>) e a lipoxigenase responsável pela produção de leucotrienos e lipoxinas.<sup>(36)</sup>

A produção de prostaglandinas depende da atividade de ambas as isoformas da COX. Na primeira reação o ácido araquidónico é metabolizado em PGG<sub>2</sub>, que através da ação da peroxidase forma a PGH<sub>2</sub>. Esta é convertida por isomerases e sintetases específicas em cinco prostaglandinas biologicamente ativas: PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>α, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> E TXA<sub>2</sub>.<sup>(37)</sup>

A COX-1 induz à síntese de TXA<sub>2</sub> nas plaquetas, um potente agente vasoconstritor e indutor da adesão e agregação plaquetária, produzido através da ação da enzima tromboxano sintetase.

Contrariamente, a COX-2 induz a síntese de PGI<sub>2</sub> nas células endoteliais através da prostaciclina-sintetase, responsável pela formação da PGI<sub>2</sub>, um vasodilatador e potente inibidor da agregação plaquetária. A PGI<sub>2</sub>, devido à inibição da atividade simpática ao nível do epicárdio, tem uma ação antiarrítmica endógena.<sup>(38)</sup>

As prostaglandinas e tromboxano, desempenham uma função crucial na manutenção da homeostasia e na mediação da resposta inflamatória. Exercem os seus efeitos através da ligação a recetores acoplados a proteína G.<sup>(39)</sup>

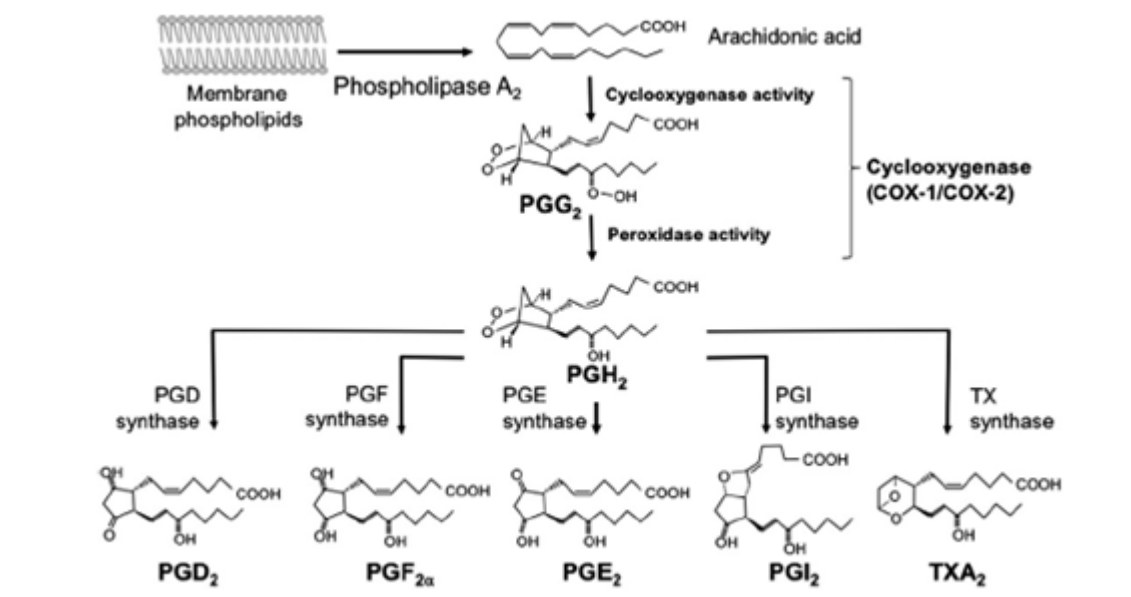


Figura 1 - Via da COX e síntese de prostaglandinas, retirado de (Kawahara et al., 2015) <sup>(40)</sup>

As ações farmacológicas dos AINEs, devem-se à inibição das enzimas COX e consequentemente ao decréscimo da síntese de PGs, culminando na redução da inflamação, dor e febre.

A PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> e a PGD<sub>2</sub>, (sendo esta última a principal prostaglandina produzida na via dos mastócitos), causam vasodilatação e edema. A ação anti-inflamatória destes fármacos deve-se essencialmente à diminuição da produção destas PGs. A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> medeiam as respostas nociceptivas centrais e periféricas, sendo que a inibição da sua síntese é o principal mecanismo responsável pelo efeito analgésico dos AINEs.

Num contexto febril, a PGE<sub>2</sub> está também aumentada provocando a elevação do set-point do termostato hipotalâmico. Assim, o efeito antipirético dos AINEs deve-se prioritariamente à inibição desta prostaglandina.

A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub>, protegem a mucosa gástrica contra os efeitos erosivos do ácido do estômago e são as prostaglandinas com funções renais mais bem estabelecidas, acreditando-se que incrementam a secreção de potássio devido à ativação do sistema Renina-Angiotensina e da secreção de Renina. A PGE<sub>2</sub> medeia a reabsorção de sódio no túbulo distal renal. Assim, a inibição destas prostaglandinas, fulcrais na proteção gástrica e na manutenção homeostasia, é responsável pelos efeitos deletérios a nível gástrico e renal, associados a esta classe de fármacos. <sup>(37),(39)</sup>

Para além do efeito tóxico renal e no domínio gastrointestinal, os AINEs, estão associados à ocorrência de eventos cardiovasculares. Os mecanismos relacionados com os possíveis efeitos deletérios no sistema cardiovascular incluem uma disfunção endotelial e a redução

da produção de óxido nítrico (NO) contribuindo para a aceleração da formação da placa aterosclerótica, uma interferência com a homeostasia renal e o consequente aumento da pressão arterial <sup>(37)</sup> e uma toxicidade dos cardiomiócitos devido ao dano oxidativo mediado por disfunção mitocondrial e dos proteossomas.<sup>(41)</sup>

### **2.3.2 Diclofenac**

O diclofenac é um AINE não seletivo derivado do ácido fenilacético com ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Ao contrário de outros AINEs, o diclofenac, é um inibidor mais potente da COX-2 do que da COX-1.<sup>(42)</sup>

O DCF é o AINE mais utilizado nos países de baixo, médio e alto rendimento.<sup>(38)</sup> É utilizado em diversas condições médicas, tais como no controlo da febre em quadros infecciosos, no tratamento sintomático da dor e inflamação em patologias osteoarticulares, na cólica renal, e no controlo da dor visceral no pós- parto e em contexto de patologia oncológica.<sup>(42)</sup>

Devido ao uso, muitas vezes indiscriminado, constitui um dos princípios ativos farmacológicos, comumente detetados nos ecossistemas aquáticos em todo o mundo.<sup>(43)</sup>

Tal como a maioria dos AINEs, o diclofenac inibe a síntese de prostaglandinas pro-inflamatórias e nociceptivas no sangue e nos tecidos. É um dos mais eficazes inibidores da produção da PGE<sub>2</sub>, tendo sido reportada, na sua capacidade de inibição COX, uma potência 3 a 1000 vezes em relação a outros AINEs.<sup>(44)</sup>

Alguns estudos demonstraram, que para além de inibir a produção de PGs, este fármaco reduz também a produção de leucotrienos, através da inibição da enzima lipoxigenase. Supõe-se que o seu mecanismo de ação englobe também a inibição da fosfolipase A2, sendo que estes mecanismos de ação adicionais poderão explicar a alta potência deste fármaco.<sup>(42)</sup>

Para além dos efeitos secundários inerentes ao seu mecanismo de ação farmacológica e comuns aos restantes fármacos do mesmo grupo, diversos estudos têm sugerido que o diclofenac possa atuar como disruptor endócrino com interferência, nomeadamente, na homeostasia hormonal sexual.

#### **Efeito disruptor endócrino**

Alguns estudos têm revelado um potencial efeito disruptor endócrino estrogénico, após exposição crónica a DCF, através de interferência com o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, patente pela redução da expressão de genes de hormonas pituitárias, como a hormona luteinizante (LH).<sup>(45)</sup>

Foi demonstrado em estudos in vivo, a capacidade do DCF em atuar como um indutor da biossíntese da proteína do ovo vitelogenina (VTG), um marcador clássico de atividade estrogénica, nos hepatócitos de *Oreochromis niloticus*<sup>(45)</sup>, e em *Xenopus laevis*. No mesmo estudo realizado em *X. Laevis*, a exposição a DCF conduziu a desequilíbrios das hormonas sexuais verificando-se uma redução da relação androgénio/estrogénio.<sup>(46)</sup>

Estudos in vitro realizados em peixes *Cyprinus carpio*, com o intuito de avaliar a interferência do DCF ao nível da síntese de androgénios, demonstraram a capacidade deste fármaco em inibir em 56% a atividade enzima C17,20-liase (CYP17) com concentrações de 1 mM. Esta enzima tem um papel chave na produção de androgénios sendo responsável pela conversão de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona em androstenediona.<sup>(47)</sup>

A ação do diclofenac em recetores de estrogénio foi estudada in vitro em linhas celulares do carcinoma mamário humano, T47D. Verificou-se uma ação antagonista nos recetores de estrogénio com uma concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) de 63,09. A sua capacidade de inibição dos recetores de estrogénio e testosterona foi avaliada em *Saccharomyces cerevisiae* tendo-se constatado um antagonismo dos respetivos recetores com um IC<sub>50</sub> de 9.45  $\mu$ M e de 17,6  $\mu$ M<sup>(28)</sup>

Em ensaios de luminescência da enzima luciferase em linhas celulares MDA-kb2, o DCF apresentou uma atividade antagonista nos recetores estrogénicos (ER) e uma ação agonista e antagonista mista dos recetores androgénicos.

Num estudo in vitro em linhas celulares do carcinoma humano que expressam recetores de androgénio e de glucocorticoides (MDA-kb2) e células pituitárias de rato (GH3) foi constatada ação antagonista do diclofenac nos recetores de glucocorticoides (GR) e em recetores tiroideios (TR) com IC<sub>50</sub> de 2,1 x10<sup>-5</sup> M e de 9,9 x 10<sup>-6</sup> M respetivamente.<sup>(43)</sup>

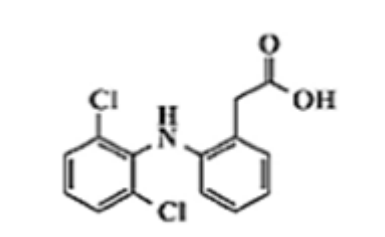


Figura 2 - Estrutura química do Diclofenac, retirado (Klopčič , I et al. 2018)<sup>(43)</sup>

## 2.4 Paracetamol

O Paracetamol é um derivado do para-aminofenol e constitui um dos fármacos mais utilizados à escala mundial, sendo uma terapêutica de primeira linha no tratamento da dor leve a moderada associada à osteoartrose.<sup>(27)</sup> Constitui, muitas vezes, o fármaco de eleição em doentes nos quais a administração de AINEs não é aconselhada como em doentes com bronquite asmática, em crianças com idade inferior a 12 anos e no contexto, por exemplo, de discrasias sanguíneas e de úlcera péptica.<sup>(48)</sup>

O perfil de segurança presumido do paracetamol tornou-o numa escolha popular de analgésicos entre mulheres grávidas. De facto, o paracetamol é o único analgésico que a U.S. Food and Drug Administration (FDA) considera seguro e recomendável durante a gravidez.<sup>(49)</sup>

Embora tenha sido descoberto há mais de 100 anos e amplamente utilizado há mais de 50, o seu mecanismo de ação ainda não se encontra totalmente desvendado.<sup>(35)</sup>

Alguns estudos sugerem que o paracetamol funciona como um inibidor da COX no sistema nervoso central e interage com as vias anti nociceptivas de sinalização endocanabinóide e vanilóide, o que poderá explicar o seu efeito sedativo moderado nas crianças.<sup>(50)</sup> Outros sugerem que o paracetamol exerça uma inibição preferencial da COX-2, o que pode explicar a diminuta toxicidade gastrointestinal exercida quando comparado com os AINEs. Esta inibição preferencial da COX-2 poderá estar implicada no aumento do risco cardiovascular verificado em estudos, inerente à utilização prolongada do fármaco <sup>(35)</sup>

O mecanismo de ação do paracetamol difere dos AINEs e dos inibidores seletivos da COX-2. Enquanto que os restantes fármacos inibem a atividade da COX através de inibição competitiva com o ácido araquidónico pelo sítio ativo da enzima, tem sido sugerido que o paracetamol atue como agente redutor na componente peroxidase da COX.

Ao atuar como agente redutor do catião protoporfirina IX de ferro ( $Fe^{4+}=OPP^*$ ) vai provocar uma diminuição do radical tirosil-385, crucial na conversão do ácido araquidónico a  $PGG_2$ . A redução deste radical repercute-se na redução da produção de  $PGG_2$ . Como os hidroperóxidos oxidam a porfirina no local da peroxidase, a inibição da COX pelo paracetamol é reduzida por altos níveis de peróxido.

Apesar de ter propriedades analgésicas e antipiréticas como os AINEs, este medicamento difere dos fármacos pertencentes a este último grupo, pois apresenta um limitado poder anti-inflamatório e uma baixa incidência dos efeitos colaterais gastrointestinais nas doses terapêuticas recomendadas. A sua fraca ação anti-inflamatória pode dever-se às altas

concentrações extracelulares de ácido araquidônico e peróxido nos tecidos inflamatórios o que diminui a ação do referido fármaco.<sup>(48)</sup>

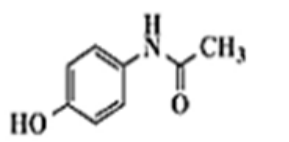


Figura 3 - Estrutura química do Paracetamol, retirado (Klopčič, I et al. 2018) <sup>(13)</sup>

### **Efeito disruptor endócrino**

Estudos *in vitro*, em linhas celulares MDA-Kb2, utilizando o ensaio de luciferase demonstraram a atividade agonista do paracetamol nos recetores androgénicos e nos recetores de glucocorticoides, com  $EC_{50}$  de  $1,7 \times 10^{-7}$  e de  $1,4 \times 10^{-4}$  M respetivamente. Foi também verificado um efeito antagonista nos recetores androgénicos com concentração menor de  $IC_{50}$   $1,2 \times 10^{-10}$ M. No mesmo estudo constatou-se, também, uma atividade antagonista nos recetores das hormonas da tiroide com  $IC_{50}$  de  $6,6 \times 10^{-6}$  M. <sup>(13)</sup>

Por outro lado, em experiências *in vivo* realizadas em peixes *Rhamdia quelen* foi verificado um aumento dos níveis de estradiol nos peixes submetidos à concentração de 2,5 ug/L de paracetamol durante 21 dias e redução dos níveis de testosterona de 58,4 % e de 70,7 % nos peixes expostos a concentrações de 0,25 e 2,5 ug/L, respetivamente. No mesmo estudo verificou-se, também, um aumento dos níveis dos neurotransmissores dopamina (DA) e serotonina (5-HT) com a concentração de 0,25 ug/L, que têm uma ação inibitória e estimuladora do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal respetivamente.<sup>(51)</sup>

Num outro trabalho de investigação realizado em ratos transplantados com células testiculares humanas, que foram sujeitos a doses de paracetamol equivalentes às utilizadas por humanos, de 60 mg/Kg/dia durante um período de 7 dias foi reportado um decréscimo do nível de testosterona fetal.<sup>(52)</sup>

Ensaio realizados em células de leydig fetais de rato expostas a várias concentrações de paracetamol demonstraram uma redução da produção de testosterona. Estes resultados foram significativos após 24 horas de exposição à concentração de 100  $\mu$ M, após 48 horas de exposição a concentrações de 1  $\mu$ M e de 100  $\mu$ M e após 72 horas com concentrações de 0,5, 1 e 10  $\mu$ M.<sup>(53)</sup>

Em linhas celulares do adenocarcinoma humano (H295R), expostas durante 48 horas à concentração de 100 mg/L de paracetamol, ficou patente um aumento significativo da produção de estradiol (E2) em detrimento da redução dos níveis de testosterona. Verificou-se, após exposição à concentração de 100 mg/L, um aumento da transcrição do gene CYP19, responsável pela codificação da enzima aromatase. Constatou-se também, um aumento da síntese da proteína vitelogenina em peixes macho *Oryzias latipes* expostos a concentrações de 0.95 mg/L de paracetamol.<sup>(54)</sup>

Experiências realizadas em linhas celulares humanas adrenocorticais (NCI-H295R), confirmaram uma redução da produção de testosterona quando as células foram submetidas a concentrações de  $10^{-5}$  e  $10^{-4}$  M durante 48h e 24 horas respetivamente.<sup>(55)</sup>

## 2.5 Células Musculares Lisas

As artérias e as arteríolas são fulcrais para a homeostasia cardíaca através da manutenção da resistência vascular, contribuindo para a regulação da pressão arterial e perfusão dos diferentes órgãos e tecidos, de forma a suprir as suas demandas metabólicas.

O cálcio atua como mensageiro intracelular das células musculares lisas que compõem a túnica média das artérias. É um íão fundamental na excitação, contração e proliferação das células do músculo liso vascular. A manutenção do tónus vascular faz-se através do controlo da atividade da miosina-quinase da cadeia leve e do grau de fosforilação das cadeias leves de miosina de 20 kD.

As células musculares lisas expressam vários canais tais como os canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCCs), canais de  $K^+$ , recetores de potencial transitório (RPT) e canais  $Cl^-$ .<sup>(56)</sup>

Os VGCCs da membrana plasmática e as reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (RS) constituem as fontes primárias do catião  $Ca^{2+}$ .

O cálcio extracelular entra nas células por intermédio de VGCCs, ativados pela despolarização da membrana plasmática, nomeadamente através dos canais de cálcio do tipo L (LTCC), dos canais de cálcio operados por recetor (ROC) e dos canais operados por depósitos intracelulares (SOC). O  $Ca^{2+}$  das reservas intracelulares é libertado do retículo sarcoplasmático (RS) através dos recetores de rianodina (RyR) e dos recetores do trifosfato de inositol (IP3R), o que conduz à ativação de canais de potássio de elevada condutância ativados por cálcio (BK). A abertura dos BK leva ao efluxo do  $K^+$ , provocando a hiperpolarização da célula e conseqüentemente o encerramento dos VGCC. Tal efeito limita a contração celular através da redução dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares.<sup>(57)</sup>

Inversamente, o encerramento dos canais de  $K^+$  conduz à despolarização da célula, o que leva à abertura dos VGCC, e se repercute num aumento do  $Ca^{2+}$  intracelulares e, consequentemente, em vasoconstrição celular. <sup>(58)</sup>

Os mecanismos de remoção de  $Ca^{2+}$  reduzem a concentração de  $Ca^{2+}$  livre citosólico. Aqueles incluem a  $Ca^{2+}$ -ATPase da membrana plasmática (PMCA), o trocador de  $Na^+ / Ca^{2+}$  (NCX) que transportam  $Ca^{2+}$  para fora da célula. O retículo sarcoplasmático possui bombas  $Ca^{2+}$  - ATPase (SERCA) que transportam ativamente o cálcio contra o gradiente eletroquímico, fazendo com que o íão seja acumulado no seu interior e volte aos seus níveis basais. <sup>(57),(59)</sup>

## **2.6 Efeito do Estrogénio a nível Vascular**

Os estrogénios endógenos são essenciais em muitos processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento sexual e reprodutivo, o metabolismo lipídico e dos hidratos de carbono, na cognição, no comportamento e na regulação do sistema muscular esquelético. No que concerne ao sistema cardiovascular, estas hormonas são fulcrais na manutenção da homeostasia cardiovascular, interferindo no desenvolvimento de patologias como a hipertensão e a doença arterial coronária. O estrogénio pode atuar no sistema cardiovascular através de ações diretas ao nível das células vasculares, tais como as células endoteliais, as células do músculo liso vascular e cardiomiócitos, ou indiretamente através de efeitos sistémicos antioxidantes e anti-inflamatórios. Esta hormona, tem ações moduladoras ao nível da inflamação que constitui, muitas vezes, o gatilho para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares.

Para além dos recetores de estrogénio clássicos  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  que são conhecidos mediadores dos efeitos vasculares dependentes de estrogénio, mais recentemente, foi identificado também um recetor transmembranar intracelular de estrogénio acoplado à proteína G (GPER) também expresso no sistema cardiovascular. <sup>(60)</sup>

Os recetores  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  são expressos no núcleo e citoplasma das células, onde funcionam como fatores de transcrição, mas também na membrana citoplasmática das células musculares lisas e das células endoteliais <sup>(61)</sup>, e na membrana de organelos tais como a membrana mitocondrial e do retículo endoplasmático. Ambos os recetores são expressos no tecido adiposo e no sistema cardiovascular sendo o  $ER\alpha$  amplamente expresso no sistema nervoso central e em tecidos periféricos tais como o tecido adiposo, o sistema cardiovascular, o músculo esquelético e as células imunes (células dendríticas, monócitos, macrófagos). O  $ER\beta$  é expresso primordialmente nos ovários, pulmão, bexiga, células hematopoiéticas e no trato gastrointestinal.

Embora os estrogénios mediem muitos dos seus efeitos biológicos através de recetores que atuam no domínio da expressão genética, sabe-se que também ativam as vias não genómicas, através de recetores expressos na membrana plasmática, responsáveis pelos seus efeitos rápidos.<sup>(62)</sup> Hoje, sabe-se que os recetores citosólicos para além de respostas genómicas podem também ser responsáveis por efeitos não genómicos dos estrogénios.<sup>(61)</sup>

### **2.6.1 Efeitos Genómicos**

No que concerne à via genómica, o estrogénio liga-se ao ER $\alpha$  e ER $\beta$  intracelulares, formando um complexo que dimeriza e entra no núcleo. Uma vez no núcleo, o mesmo liga-se a elementos de resposta ao estrogénio (ERE) e a fatores de transcrição na região promotora do gene para regular a expressão de genes alvo no núcleo, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).

Assim, o estrogénio aumenta ou diminui a expressão de genes alvo através da interação com locais específicos do DNA e com proteínas co reguladoras incluindo co ativadoras e co repressoras.<sup>(63)</sup>

### **2.6.2 Efeitos Não Genómicos**

Os efeitos não genómicos, são respostas rápidas independentes da expressão genética e da síntese proteica que envolvem a modulação de proteínas membranares e citoplasmáticas. Estes efeitos vasculares ocorrem em minutos ou segundos e envolvem a ativação de cinases, do óxido nítrico sintetase (NOS), da enzima adenilato ciclase, fosfatases e alteração do fluxo iónico através das membranas.<sup>(64),(65)</sup>

Os efeitos vasculares rápidos, podem dividir-se em efeitos vasorelaxantes dependentes do endotélio que incluem vias mediadas por óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e fatores hiperpolarizantes e mecanismos independentes do endotélio envolvendo essencialmente a modulação do fluxo membranar de iões de Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) e Potássio (K<sup>+</sup>).<sup>(66),(67)</sup>

Os efeitos diretos cardioprotetores do estrogénio englobam ações da hormona ao nível dos ERs membranares e citosólicos clássicos, mas também no recetor GPER. O recetor GPER foi descoberto mais recentemente do que os ER e consiste num recetor acoplado à proteína com 7 domínios transmembranares.<sup>(57)</sup>

A ativação do GPER pode mediar múltiplos efeitos cardiovasculares protetores, através da via do NO. Estudos têm demonstrado que a ativação do GPER é fulcral para a produção de NO endotelial, sendo que esta ação é dependente da ativação da cascata intracelular c-Src /EGFR/ PI3K /ERK. Pensa-se que cerca de 50% da ação vasodilatadora dependente do endotélio do estrogénio seja mediada por este recetor.<sup>(68)</sup>

A ligação do E2 a ERs na membrana plasmática conduz à ativação das vias de PI3K / Akt e MAPK, aumentando rapidamente a fosforilação de eNOS e a produção de NO, um potente vasodilatador. Os recetores nucleares ER $\alpha$  e ER $\beta$  também têm sido implicados na síntese de NO.<sup>(69)</sup> O E2 também se liga a ERs localizados na membrana mitocondrial, contribuindo um aumento da sobrevivência celular através da redução do stress oxidativo celular.<sup>(63)</sup>

A contração do músculo liso implica a ligação de agonistas, tal como noradrenalina, ao seu recetor. Esta ligação estimula a ativação da fosfolipase C (PLC) que catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para produzir dois segundos mensageiros intracelulares, o inositol1,4,5-trifosfato (IP3) e o diacilglicerol (DAG).

O IP3 vai provocar um aumento do Ca<sup>2+</sup> do sarcoplasma, através da ligação a recetores específicos de IP3 (RIP3) localizados na membrana do retículo sarcoplasmático, provocando uma alteração da conformação do recetor e formando um canal que permite a libertação controlada do Ca<sup>2+</sup> das reservas intracelulares no sarcoplasma.

O Ca<sup>2+</sup>, por sua vez, liga-se à calmodulina (CAM) que ativa a proteína cinase da cadeia leve de miosina (MLC), a qual fosforila a cadeia leve de miosina e inicia a contração do MLV.

O DAG em conjunto com o Ca<sup>2+</sup> ativa a proteína cinase C (PKC), que aumenta a sensibilidade do miofilamento ao Ca<sup>2+</sup> mantendo a contração vascular.

Os possíveis efeitos diretos vasorelaxantes não genómicos, independentes de endotélio, do estrogénio ao nível do músculo liso são mediados através de ERs da membrana plasmática, inibindo os mecanismos de contração do músculo liso ativados por agonistas como a NA. Aqueles incluem a ativação dos canais de K<sup>+</sup>, levando à hiperpolarização celular com consequente inibição dos VGCC, o que se repercute na inibição da entrada de Ca<sup>2+</sup>. Tais efeitos têm como consequência a inibição da fosforilação da MLC dependente de Ca<sup>2+</sup> e consequentemente a inibição da contração do músculo liso vascular. O estrogénio pode também inibir a PKC e / ou a via da MAPK e assim inibir a contração do músculo liso vascular.<sup>(66)</sup>

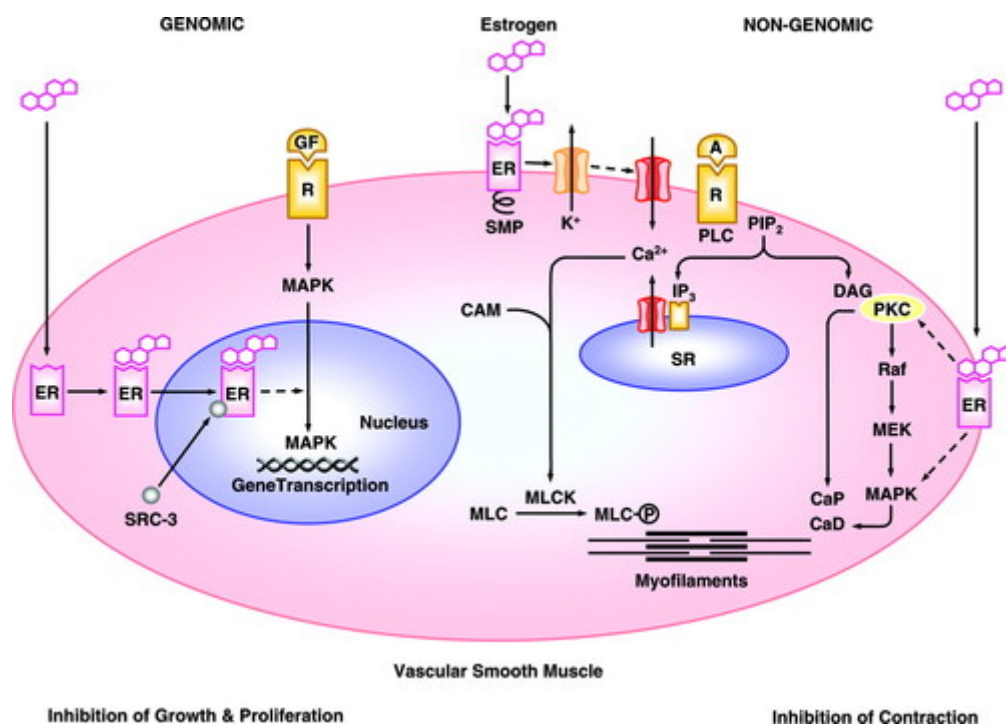


Figura 4 - Efeitos genômicos e não genômicos do estrogênio no músculo liso vascular. PLC: fosfolipase C; CAM: calmodulina; PKC: proteína cinase C, ER: receptor de estrogênios; SR: retículo sarcoplasmático; MLCK:, cinase das cadeias leves de miosina; ML: cadeias leves de miosina; GF: fator de crescimento; R, receptor; CaD, caldesmona. Retirado de (Orshal JM et al. 2004) <sup>(66)</sup>

## 2.7 Motivação e objetivos

O conceito de disruptor endócrino passou de um tema obscuro para algo bastante presente na atualidade científica. A consciência crescente das suas repercussões nefastas ao nível do organismo e do seu impacto no desenvolvimento de patologias relevantes na mortalidade e morbidade mundiais tais como hipertensão, diabetes mellitus, obesidade, cancro e infertilidade, tornou este tema objeto de estudo atual.

Em consequência, têm sido identificadas diversas moléculas como tendo propriedades disruptoras endócrinas, sendo que alguns fármacos são apontados como tendo também a capacidade de interferir com a homeostasia endócrina.

O diclofenac e o paracetamol são fármacos utilizados à escala mundial e as suas potenciais propriedades disruptoras endócrinas foram demonstradas em estudos recentes, nomeadamente através da interferência da homeostasia hormonal sexual.

Contudo, a sua interferência ao nível do sistema cardiovascular, ainda não foi investigada. Ora, sendo as doenças cardiovasculares a principal causa de mortalidade no mundo, trata-se de um objeto de estudo de especial relevância.

Pelo exposto, o objetivo deste trabalho de investigação é estudar os efeitos não genómicos do diclofenac e do paracetamol no sistema cardiovascular utilizando, para isso, a artéria aorta do rato.



## Capítulo 2

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Extração e Preparação dos anéis da artéria aorta torácica do rato

Como modelo animal foram utilizados ratos da estirpe Wistar (Charles-River, Barcelona, Espanha), adultos de 2 meses, com o peso mediando entre os 400 e os 500g. Os animais foram mantidos em condições apropriadas e aclimatizados durante um período de pelo menos uma semana com ciclos de luz/escuro de 12 horas diárias. A alimentação e a água foram fornecidas *ad libitum*.

Posteriormente os animais foram eutanasiados em camara de CO<sub>2</sub> e submetidos a toracotomia através da qual se removeu a artéria aorta torácica.

O segmento torácico da artéria foi cuidadosamente dissecado e imerso em meio de Krebs modificado e termostatizado (37°C) seguindo o protocolo padrão usado no laboratório de fisiologia. A composição da solução modificada de Krebs foi (mmol / L): NaCl(119), KCl(5), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O(2,5), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O(1,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(1,2), NaHCO<sub>3</sub>(25), EDTA-Na<sub>2</sub>(0,03), ácido L-(+)-ascórbico(0,6) e glucose(11)-(pH 7,4).

A artéria foi isolada e limpa, sendo removida a gordura e o tecido conjuntivo. O endotélio vascular, foi removido mecanicamente através de fricção suave com introdução de uma haste fina de metal através do lúmen arterial.

A aorta extraída e posteriormente imersa em solução de Krebs, foi cortada em segmentos que tinham entre 4 e 5 mm de comprimento.

Todos os procedimentos foram executados em conformidade com as leis e diretrizes europeias (diretiva 86/609) e nacionais (Decreto-Lei nº113/2013, de 7 de agosto), para garantir a conformidade ética e o cumprimento das regras relativas ao bem-estar animal na investigação.<sup>(67)</sup>

#### 3.2 Preparação das Soluções

Foi preparada uma solução stock de diclofenac (0,1 M) e de paracetamol (1 M) dissolvida em etanol puro.

As soluções de diclofenac (0,1 nM – 100 µM) e de paracetamol (0,1 nM – 1 mM) testadas foram preparadas diariamente através de diluições sucessivas, a partir da solução stock, utilizando uma solução de Krebs modificada para banho de órgãos como solvente.

### **3.3 Estudo de contratilidade arterial**

Os anéis da artéria aorta foram suspensos no banho de órgãos (LEO1.004, Leticia) preenchido com 10 ml solução de Krebs modificada a 37°C gaseificada continuamente com carbogénio.

A medição de tensão em gramas (g) foi realizada utilizando transdutores isométricos (TRI201, Panlab SA, Espanha), interface PowerLab / 4SP (ML750, ADInstruments) e sistema computadorizado com software Chart5 PowerLab (ADInstruments).

A tensão da parede vascular foi normalizada sendo estabilizada a uma tensão ideal de repouso (2 g). Durante este período, os tecidos foram lavados a cada 15 min com solução de Krebs modificada.

Terminado o período de estabilização e das várias lavagens, os anéis aórticos foram primeiramente contraídos com noradrenalina a 1µM (NA) de forma a testar a viabilidade das artérias e a ausência de endotélio foi confirmada pela ausência de relaxamento em resposta à administração de acetilcolina (ACh).

Após a confirmação da viabilidade e da ausência de endotélio, as artérias foram lavadas três vezes durante 15 minutos com uma solução modificada de Krebs.

45 minutos depois, os anéis foram então contraídos com NA a 1 µM. Quando se alcançou um patamar estável de contração máxima, analisaram-se os efeitos do diclofenac na mesma contração. Foram testadas concentrações cumulativas (0,1 nM-100 µM) de amostras de DCF dissolvidas em etanol adicionadas em concentrações crescentes.

Os anéis arteriais e o sistema foram lavados com solução modificada de Krebs 3 vezes durante 15 min. Após estas lavagens, durante um período de aproximadamente 45 min, foi adicionado outro agente contrátil, KCl 60mM. Posteriormente, foram adicionadas as mesmas concentrações cumulativas de DCF testadas anteriormente, para avaliar os seus efeitos nas artérias. Em todas as experiências, realizaram-se procedimentos de controlo em paralelo usando a mesma quantidade de etanol usada para preparar cada amostra de solução experimental.

As mesmas experiências foram realizadas com o Paracetamol, testando concentrações cumulativas numa faixa de 0,1 nM- 1 mM em artérias previamente contraídas com NA 1  $\mu$ M e KCl 60 mM.

### **3.4 Avaliação da Viabilidade celular (Ensaio MTT)**

O MTT consiste num teste colorimétrico que permite avaliar a viabilidade celular e a proliferação *in vitro* de uma população celular. Este teste mede a capacidade de as células viáveis reduzirem o sal tetrazólio (MTT) a formazan de cor púrpura, mediante a atividade das enzimas desidrogenase mitocondriais.

A capacidade da produção de formazan funciona como marcador de viabilidade celular, sendo diretamente proporcional a esta.

As células confluentes do musculo liso da aorta torácica do rato (A7r5) foram expostas a diferentes concentrações de Paracetamol (0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM) e de Diclofenac (0,1 nM, 1nM, 10 nM, 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM) e incubadas durante um período de 24 horas.

Após este período, adicionaram-se 200  $\mu$ L de solução de MTT (0,5 mg / mL) a cada poço e após 3 h (37 ° C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) a solução MTT foi removida. De seguida, pipetaram-se 200  $\mu$ l de DMSO a cada poço para solubilizar os cristais de MTT formados.

As quantidade relativa de produção de formazan foi medida num fotómetro (EZ Read 400, Leitor de Microplacas, Biochrom) num comprimento de onda de 595 nm.<sup>(70)</sup>

### **3.5 Análise Estatística**

A resposta vasorelaxante do diclofenac e do paracetamol foi expressa como uma percentagem (%) da contração máxima alcançada pelos agentes contráteis (NA e KCl). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de *n* experiências. O *n* consiste no número de experiências realizadas.

Os dados foram analisados utilizando o programa de estatística SIGMASTAT versão 3.5 (Systat Software, London UK). A significância estatística entre o grupo diclofenac e paracetamol com os respetivos controles (etanol) foi analisada recorrendo ao teste T de Student. A comparação entre vários grupos de dados foi realizada segundo o One-Way ANOVA, seguido do teste post-hoc de Tukey , Dunnett e de Dunn para determinar as diferenças significativas entre médias.

As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## Capítulo 3

### 4. Resultados

#### 4.1 Efeitos do diclofenac nas artérias contraídas com KCL e NA

Os resultados obtidos demonstram que o diclofenac exerceu um efeito vasorelaxante nas artérias previamente contraídas com KCL 60 mM, sendo que esta ação foi concentração-dependente, com um efeito relaxante máximo baixo de 17,3 % obtido com a concentração mais alta testada (100  $\mu$ M). Obtiveram-se diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , teste T student) entre o grupo de artérias em contacto com o diclofenac e o grupo de controlo na concentração de 100  $\mu$ M. O efeito relaxante do diclofenac com esta última concentração foi significativamente diferente dos verificados com as restantes concentrações ( $p < 0,05$ , teste one-way ANOVA com teste post hoc Tukey) (Gráfico 1).

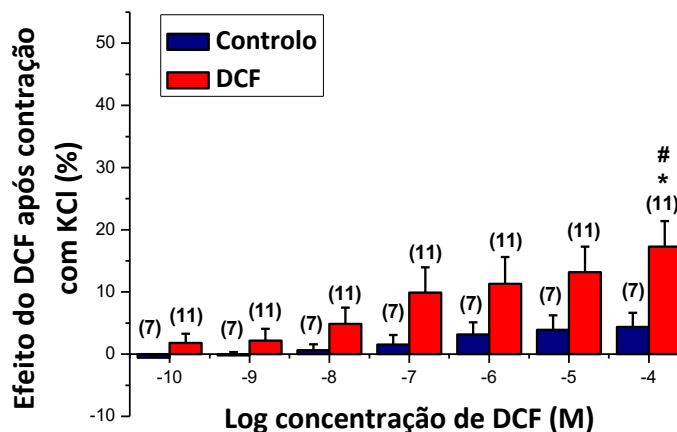


Gráfico 1 - Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com cloreto de potássio (KCl 60 mM). As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. Os efeitos são expressos em percentagem de relaxamento sobre a área inicial. # $p < 0,05$  entre os efeitos do diclofenac e o respetivo controlo (Etanol), teste T de student. \*  $p < 0,05$  entre os efeitos das diferentes concentrações de diclofenac, teste one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey.

No que diz respeito às artérias previamente contraídas com NA 1 $\mu$ M, verificou-se um efeito vasorelaxante máximo baixo, de aproximadamente 10% com a concentração mais alta testada. O mesmo efeito vasorelaxante foi demonstrado nas artérias submetidas ao respetivo controlo, sendo que não foram registadas diferenças estatisticamente

significativas entre os resultados obtidos nas artérias em contacto com o diclofenac e as artérias do grupo de controlo ( $p > 0,05$ , teste T student).

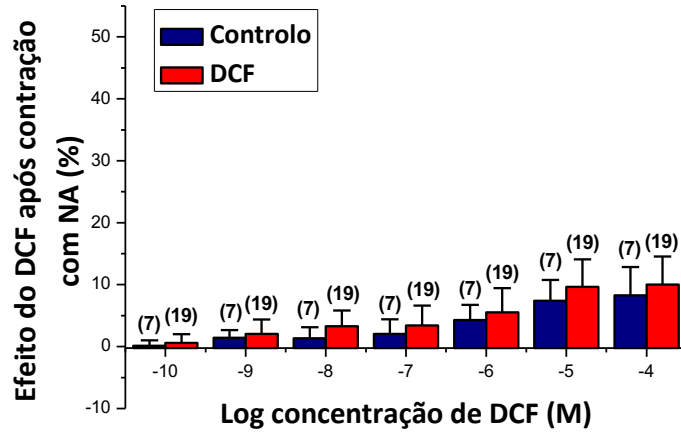


Gráfico 2 - Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com noradrenalina (NA 1µM). As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. Os efeitos são expressos em percentagem de relaxamento sobre a área inicial.

#### 4.1.1 Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis

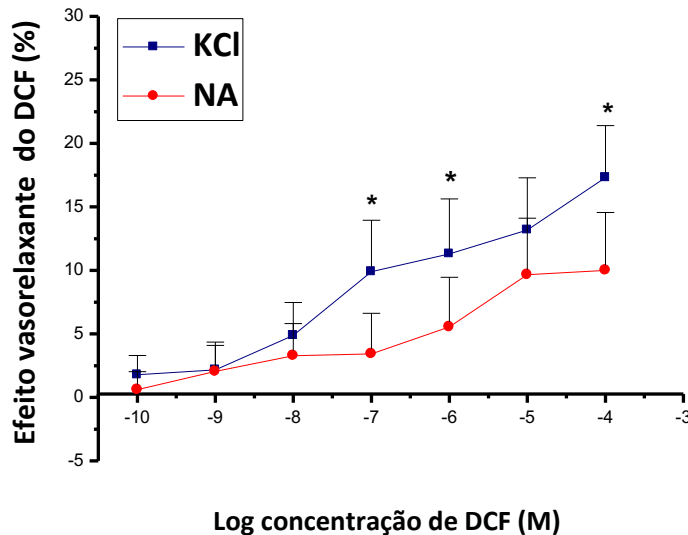


Gráfico 3 - Efeito vasorelaxante do DCF (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com NA 1µM (n=19) e com KCl 60 mM (n=11). Cada ponto representa a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. \* $p < 0,05$  entre os efeitos do diclofenac com NA e com KCl, teste T de student.

A percentagem de relaxamento obtida com o diclofenac, após a contração com KCl, foi superior em comparação com o vasorelaxamento verificado após a contração com NA em todas as concentrações testadas. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas com as concentrações de 0,1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M e 100  $\mu$ M. O efeito vasorelaxante máximo foi obtido com a concentração máxima testada de diclofenac (100  $\mu$ M).

#### 4.2 Efeitos do paracetamol nas artérias contraídas com KCl e NA

Relativamente ao paracetamol, foi constatado um efeito relaxante nas artérias previamente contraídas com KCl 60 mM, sendo o efeito vasorelaxante máximo de aproximadamente 22,5% obtido com a maior concentração testada (1mM). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de artérias submetidas ao paracetamol e o grupo de controlo ( $p < 0,05$ , teste T student), como pode ser demonstrado no gráfico 4.

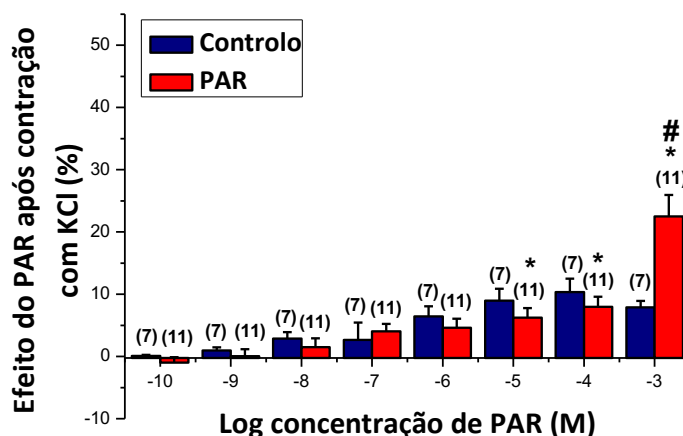


Gráfico 4 - Efeito vasorelaxante do PAR (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com cloreto de potássio (KCl 60 mM). As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. Os efeitos são expressos em percentagem de relaxamento sobre a área inicial. #  $p < 0,05$  entre os efeitos do paracetamol e o respetivo controlo (Etanol), teste T de student. \*  $p < 0,05$  entre os efeitos das diferentes concentrações de paracetamol, teste one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey.

O paracetamol exerceu uma ação vasorelaxante máxima de 45% nas artérias contraídas com NA 1 $\mu$ M, como está evidenciado no gráfico 5. Este efeito foi concentração-dependente e estatisticamente significativo, com a concentração máxima testada de 1 mM ( $p < 0,05$ , teste T de student). Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as concentrações de 10  $\mu$ M e de 100  $\mu$ M. O efeito vasorelaxante do paracetamol com a concentração de 1 mM revelou-se estatisticamente diferente das restantes concentrações ( $p < 0,05$ , teste one-way ANOVA com teste post hoc Tukey).

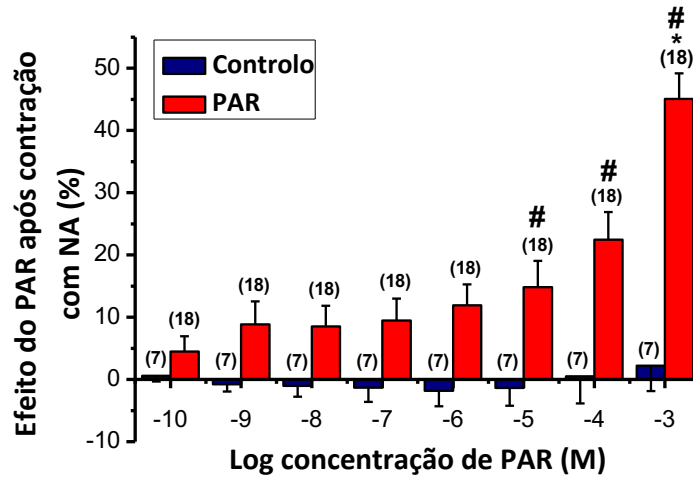


Gráfico 5 - Efeito vasorelaxante do PAR (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com Noradrenalina (NA 1 $\mu$ M). As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. Os efeitos são expressos em percentagem de relaxamento sobre a área inicial. #p < 0,05 entre os efeitos do paracetamol e o respetivo controlo (Etanol), teste T de student. \* p < 0,05 entre os efeitos das diferentes concentrações de paracetamol, teste one-way ANOVA seguido pelo teste post hoc de Tukey.

#### 4.2.1 Comparação do vasorelaxamento entre os dois agentes contráteis

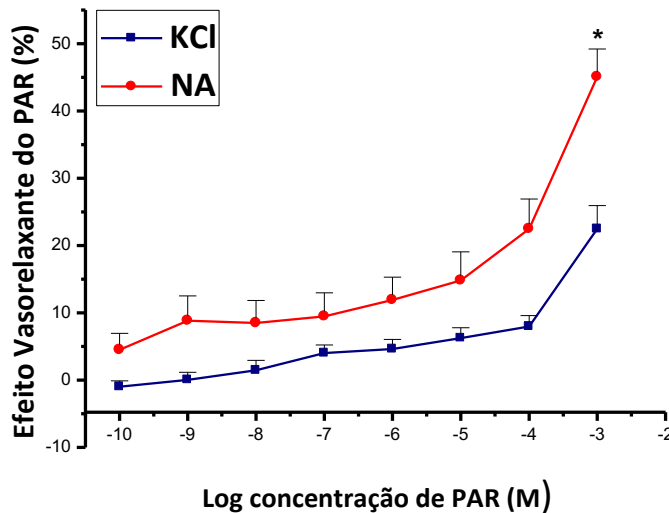


Gráfico 6 - Efeito vasorelaxante do paracetamol (%) na artéria aorta do rato sem endotélio após contração com NA 1 $\mu$ M (n=18) e com KCl 60 mM (n=11). Cada ponto representa a média e as linhas verticais o erro padrão, de (n) experiências. \*p < 0,05 entre os efeitos do Paracetamol com NA e com KCl, teste T de student.

Como se pode constatar, através da análise do gráfico 6, a percentagem de relaxamento obtida com o paracetamol após a contração com a noradrenalina foi bastante superior comparativamente com o vasorelaxamento verificado após a contração com KCl. O efeito vasorelaxante máximo foi obtido com a concentração máxima de paracetamol testada (1mM), tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas.

### 4.3 Avaliação da Viabilidade Celular

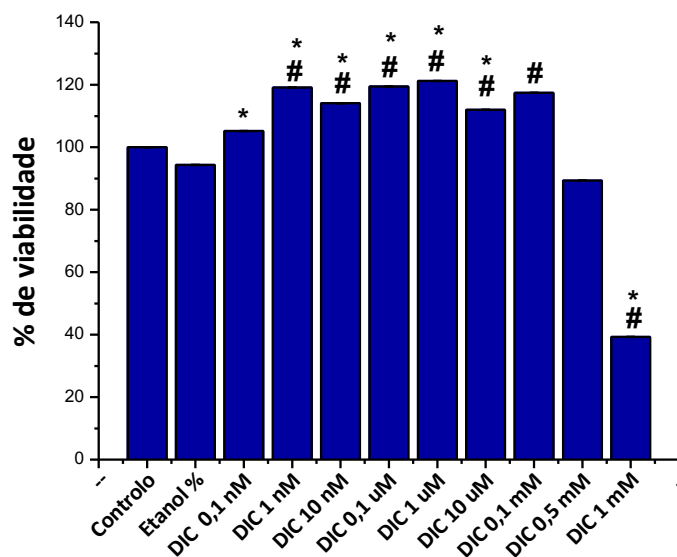


Gráfico 7: Percentagem de viabilidade celular das células do musculo liso da artéria aorta do rato após exposição a DCF. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de 3 culturas diferentes, em triplicado #p < 0,05, one-way ANOVA com teste de Dunnett em relação ao controlo \*p<0,05 one-way ANOVA com teste de Dunnett em relação ao etanol.

Analisando-se o gráfico 7, relativo à ação do diclofenac, os resultados demonstram que este exerceu uma maior toxicidade celular com a concentração máxima testada de 1 mM. Tal traduziu-se numa viabilidade celular de 39,26%, sendo este resultado estatisticamente significativo quando comparado com o controlo (p < 0,05, One way ANOVA com teste de Dunnett). Com a concentração de 0,5 mM a letalidade verificada foi baixa, apresentando uma viabilidade celular de 89,3%, não sendo estatisticamente significativa quando comparada com o controlo. As restantes concentrações testadas não foram letais para as células, pelo contrário, apresentaram uma viabilidade celular superior a 100%. Registraram-se diferenças estatísticas entre as concentrações de 1nM -1mM e o controlo, com exceção da concentração de 0,5 mM como atrás referido. Quando comparado com o solvente, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas com as concentrações de 0,1 nM-

1mM, sendo que as concentrações de 0,1 mM e de 0,5 mM não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

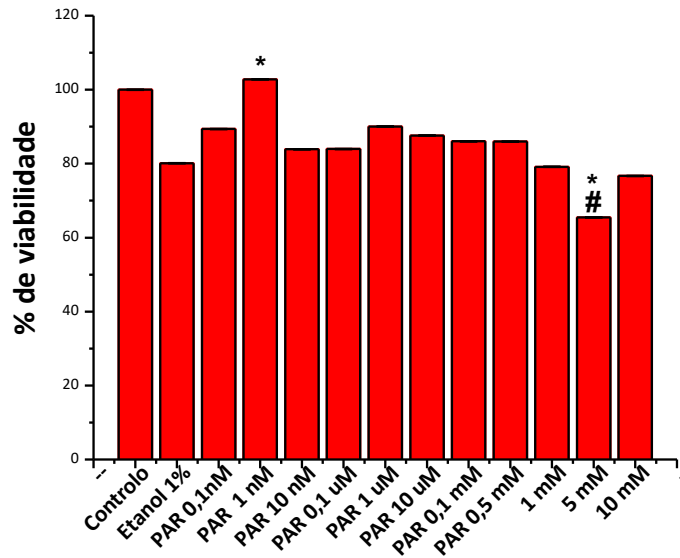


Gráfico 8: Percentagem de viabilidade celular das células do musculo liso da artéria aorta do rato após exposição a paracetamol. As barras representam a média e as linhas verticais o erro padrão, de 3 culturas diferentes em triplicado. #p < 0,05, one-way ANOVA com teste de Dunn em relação ao controlo e \*p<0,05 one-way ANOVA com teste de Dunn em relação ao etanol.

Relativamente ao Paracetamol, os resultados demonstraram que, na maioria das concentrações testadas, a viabilidade celular foi elevada, superior a 70 %. Porém, com a concentração de 5 mM, constatou-se uma viabilidade celular inferior, de 65,44%, sendo este valor estatisticamente significativo quando comparado quer com o controlo quer com o etanol ( $p < 0,05$ , One way ANOVA com teste de Dunn). Com a concentração de 1 nM, registou-se a maior viabilidade, superior a 100 %, sendo estatisticamente significativo quando comparado com o etanol.

## Capítulo 4

### 5. Discussão

O diclofenac e o paracetamol são fármacos utilizados mundialmente numa panóplia de patologias quer agudas quer crónicas. O paracetamol constitui o fármaco de eleição em quadros algícos nas grávidas. Recentes estudos sugeriram uma potencial interferência destes fármacos na homeostasia endócrina, embora os seus efeitos, ao nível cardiovascular, ainda não foram estudados.

O principal objetivo deste projeto de investigação focou-se no estudo dos efeitos rápidos não genómicos independentes do endotélio, do paracetamol e do diclofenac no sistema cardiovascular. Com este intuito, foram utilizadas artérias aorta de rato desprovidas de endotélio previamente contraídas com NA 1  $\mu$ M e KCl 60 mM, às quais foram adicionadas concentrações cumulativas de diclofenac e de paracetamol. A NA e o KCl atuam através de mecanismos distintos. Estas duas moléculas induzem à contração celular através da ligação direta a recetores de membrana (NA) e mediante a despolarização da membrana (KCl).<sup>(71)</sup>

Os resultados obtidos demonstram que ambos os fármacos exercem um efeito vasorelaxante nas artérias, sendo os efeitos concentração dependentes.

O paracetamol apresentou um maior efeito vasorelaxante nas artérias anteriormente contraídas com NA do que nas artérias previamente contraídas com o KCl. O facto de o paracetamol ter um efeito relaxante após a contração induzida por NA e KCl sugere uma possível interferência ao nível dos canais  $Ca^{2+}$  ligados a recetores e canais  $Ca^{2+}$  operados por voltagem que medeiam o tónus vascular.

Em relação ao diclofenac, os resultados demonstram uma menor atividade vasorelaxante do que a do paracetamol. O efeito máximo significativo foi observado nas artérias contraídas com KCl. Por outro lado, os resultados sugerem que o diclofenac não apresenta um efeito relaxante significativo comparativamente com o respetivo controlo nas aortas de ratos contraídas com NA. Assim o efeito vasorelaxante do diclofenac parece ser apenas devido à inibição dos canais  $Ca^{2+}$  operados por voltagem.

Tendo em conta os dados obtidos, coloca-se a hipótese de que estes fármacos possam desencadear um vasorelaxamento das artérias de uma forma similar ao estradiol, através de um mecanismo não genómico e independente da via do óxido nítrico.

O potencial efeito disruptor endócrino estrogénico destes fármacos, tem sido documentado por alguns autores, sendo que, em muitos estudos, foram testados efeitos genómicos, não imediatos.

Trabalhos de investigação *in vitro* realizados em machos adultos *Xenopus laevis* expostos a concentrações de DCF de 29,6 ng/L e 2961,4 ng/L durante um período de 8 dias, demonstraram uma indução da biossíntese da proteína do ovo vitelotelina, um marcador clássico de atividade estrogénica.<sup>(46)</sup> O mesmo efeito indutor do DCF na biossíntese da VTG, foi constatado num outro estudo em hepatócitos de *Oreochromis niloticus*, no qual foi verificado um aumento da expressão de mRNA de VTG com a concentração de 1 ug/L, e uma redução da expressão do gene de hormona luteinizante (LH) após 80 dias de exposição. Estes resultados são sugestivos de um potencial feedback negativo do DCF no eixo das gonadotropinas pituitárias devido a um mecanismo de ação estrogénico.<sup>(45)</sup>

Em fêmeas de *Mytilus galloprovincialis*, que foram expostas à concentração de 250 ng/L durante 15 dias de DCF constatou-se um aumento da fosfatase alcalina, um produto da hidrólise alcalina de vitelotelina e a estimulação da enzima acetilcolinesterase (AChE) cuja indução de ação foi verificada em estudos prévios através da ligação de isoflavonas (fitoesteroides) aos recetores de estrogénio. Estes resultados sugerem uma ação de disrupção endócrina estrogénica.<sup>(72)</sup>

Existem, contudo, estudos que contrariam a tese de que o DCF poderá atuar como DE mediante um efeito agonista estrogénico. Esses estudos apontam para uma ação antagonista estrogénica. Com efeito, num estudo *in vitro* realizado em linhas celulares T47D, o diclofenac inibiu a produção de CXCL-12, uma quimiocina cuja síntese é induzida pelo estrogénio. Tal efeito é sugestivo de uma ação antagonista ao nível do recetor de estrogénio.<sup>(28)</sup> Foi documentado em investigações *in vitro* utilizando o ensaio YES/YAS em *S. Cerevisiae*, atividade antagonista do DCF nos recetores estrogénicos (ER), com um IC<sub>50</sub> de 3,8 e<sup>-5</sup>M. Este efeito foi, contudo, menos potente do que o controlo 4- hidroxitamoxifeno (4-HT) com IC<sub>50</sub> de 8,8e<sup>-8</sup>M.

No que concerne ao Paracetamol, experiências *in vivo* realizadas em peixes *Rhamdia quelen* demonstraram um aumento dos níveis de estradiol de 635,8% nos peixes expostos à concentração de 2.5 µg/L durante um período de 21 dias.<sup>(43)</sup>

Num estudo *in vitro*, utilizando linhas celulares H295R ficou demonstrado o potencial deste fármaco em alterar a homeostasia hormonal sexual através da interferência no funcionamento da via estrogénica. Este efeito foi constatado em células expostas a uma concentração de 100 mg/ L durante 48 horas, nas quais se verificou um aumento

significativo da produção de 17 $\beta$ -estradiol. Também foi verificado um aumento da transcrição de dois genes, CYP11B2 e CYP19, o último responsável pela codificação da enzima aromatase responsável pela conversão de androgénios em estrogénios. Neste mesmo estudo verificou-se um aumento do rácio E<sub>2</sub>/Testosterona com concentrações superiores a 10 mg/L de paracetamol.<sup>(54)</sup>

Num outro trabalho de investigação constatou-se que a exposição intrauterina a doses de paracetamol 50 mg/kg/dia e de 150 mg/kg/dia desde o sétimo dia de gestação até ao nascimento, de fêmeas de rato grávidas resultou na redução da distância anogenital da sua descendência feminina, sendo que efeitos semelhantes foram reportados em estudos utilizando fitoesteroides, estradiol, e bisfenol A um disruptor endócrino estrogénico.<sup>(73)</sup>

Relativamente ao ensaio de MTT, constatou-se uma letalidade superior a 60% quando as células foram expostas à concentração de 1 mM de diclofenac, sendo a percentagem de viabilidade celular obtida de 39,26%. Este valor é estatisticamente significativo quando comparado com o controlo e com o etanol. Contudo, nas restantes concentrações testadas e nas concentrações utilizadas no banho de órgãos, a viabilidade celular foi superior a 80%, sendo que, na máxima concentração testada de 0,1 mM, a viabilidade foi superior a 100%. Estes resultados estão concordantes com os obtidos no banho de órgãos, pois as células, mesmo após exposição ao DIC, contraíram após a adição dos agentes contráteis o que implica uma viabilidade celular subjacente.

Em estudos anteriores, foi demonstrada a toxicidade celular do DIC, mas em linhas celulares diferentes e em concentrações inferiores. Verificou-se citotoxicidade em células de hepatocarcinoma de peixe (PLHC-1) e em células de hepatócitos de truta (PRTH) com EC-50 de 19  $\mu$ M e de 500  $\mu$ M respetivamente.<sup>(74)</sup>

No que diz respeito ao paracetamol, os resultados demonstraram que, com todas as concentrações testadas, a mortalidade celular foi modesta, não ultrapassando os 40%. A concentração mais letal, foi de 5 mM. Nesta verificou-se uma viabilidade celular de 65,44%, sendo este resultado estatisticamente significativo quando comparado quer com o grupo de controlo quer com o solvente etanol. O facto da maioria da população celular permanecer viável após contacto com o paracetamol, vai de encontro aos resultados obtidos no banho de órgãos, pois, após o contacto com as diferentes concentrações de paracetamol, as células continuavam a contrair quando expostas aos agentes contráteis. Em estudos anteriores, realizados em culturas celulares de células hepáticas embrionárias de rato (RLC-18), submetidas a concentrações de 6 e 15 mmol/l durante 24h foi constatada uma viabilidade celular de 80% e 50% respetivamente.<sup>(75)</sup>

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos, neste estudo, sugerem que ambos os fármacos exercem um efeito vasorelaxante, sendo o efeito do paracetamol de maior magnitude do que o do diclofenac.

A ação patente destes fármacos, no referido domínio vascular, é similar à do estrogénio, pelo que reforça a teoria de que aqueles poderão exercer efeitos disruptores endócrinos estrogénicos, tal como é proposto em outros estudos.

Porém, este projeto consiste num estudo preliminar que avalia o efeito rápido, não genómico, dos referidos fármacos nas células musculares lisas do rato. A utilização da aorta do rato constitui o modelo standard in vitro utilizado no estudo dos efeitos de substâncias vasoativas. Trata-se de um método não muito complexo, com resultados reprodutíveis, o que possibilita o estudo e compreensão da relação dose resposta, permitindo a obtenção rápida de resultados que podem ser extrapolados para os seres humanos.<sup>(60)</sup> No entanto, mesmo com as vantagens elencadas, para uma melhor compreensão dos efeitos destes medicamentos para a saúde humana, seria importante realizar estudos em tecidos ou células humanas. Também é relevante confirmar e avaliar as respostas moleculares, iónicas inerentes ao vasorelaxamento.

A capacidade dos DEs em interferirem com a expressão génica e em mediar alterações epigenéticas, tem vindo a ser estudada, podendo fornecer um substrato molecular que condicionará o desenvolvimento de patologias na idade adulta, como doenças oncológicas, e cardiovasculares, duas grandes causas de morbilidade e mortalidade na sociedade atual.

De facto, vários trabalhos de investigação evidenciaram a capacidade dos disruptores endócrinos estrogénicos em interferirem nos mecanismos epigenéticos e com a transcrição de genes envolvidos na homeostasia cardiovascular, em fetos expostos a estes xenobióticos. Estas alterações genéticas, poderão ser peças chave no desenvolvimento de patologias como a hipertensão na idade adulta.<sup>(24)</sup>

Assim, apesar de os resultados obtidos serem promissores e de reforçarem a tese de que os fármacos em apreço poderão atuar como DEs, já que, ao invés de terem um efeito neutro no sistema cardiovascular, como seria expectável, apresentam uma ação vasorelaxante, é fulcral, em estudos futuros, avaliar-se os seus efeitos genómicos para uma melhor compreensão da forma como o seu consumo abusivo poderá influenciar negativamente a saúde cardiovascular humana.

Relativamente ao paracetamol, o problema é ainda mais ambíguo já que é dos poucos fármacos considerados seguros durante a gravidez, sendo comum as grávidas socorrerem-

se deste medicamento em quadros álgicos. Aquele é considerado, pela FDA um fármaco de classe "B" no que respeita ao risco, durante os três trimestres de gravidez. Ora, tal significa que os estudos em animais não demonstraram um risco de defeitos congénitos. Porém, tais efeitos, em mulheres grávidas, não foram estudados ou não foram confirmados. Deste modo, a sua inocuidade durante o período pré-natal não se encontra completamente comprovada. De facto, estudos atuais sugerem uma correlação positiva entre a toma de paracetamol durante a gravidez e o desenvolvimento de patologias como a asma, perturbações do espectro de autismo, perturbações da hiperatividade e défice de atenção nos filhos de mães que tomaram este fármaco durante o referido período.<sup>(49)</sup> A capacidade dos DEs em provocarem alterações epigenéticas e de influenciarem a herança epigenética transgeracional <sup>(27)</sup>, com o uso recorrente do paracetamol durante a gravidez, aliado à crescente questionabilidade da sua inocuidade, e a possibilidade de este poder ter implicações nefastas no sistema cardiovascular, tal como outros DEs estrogénicos, torna ainda mais imperativo o estudo dos seus efeitos genómicos. Assim poder-se-á perceber o impacto que aquele poderá ter no desenvolvimento de patologias cardiovasculares nas gerações atuais e futuras.

Mediante os resultados, será obrigatória, impõe-se uma reflexão médica, que se prende com a seguinte questão: “Até que ponto se deve aconselhar e prescrever estes fármacos com a frequência com que são prescritos?”.

Dado que são fármacos, muitas vezes, utilizados sem recurso a receita médica, e mediante as conclusões obtidas, será também imperativo, consciencializar os potenciais utilizadores no sentido de alterarem o paradigma da sua utilização.



## Referências Bibliográficas

1. Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: Their effects on humans and wildlife. *Environ Int* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2018 Oct 3];76:78–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014003699>.
2. Slama R, Vernet C, Nassan FL, Hauser R, Philippat C. Characterizing the effect of endocrine disruptors on human health: The role of epidemiological cohorts. *Comptes Rendus - Biologies*. 2017. 40(9-10):421-431.
3. Lymperi S, Giwercman A. Endocrine disruptors and testicular function. *Metabolism*. 2018.86:79-90.
4. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller R. *Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. World Heal Organ. 2013.
5. Monneret C. What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus - Biologies*. 2017. 340(9-10):403-405.
6. Petrakis D, Vassilopoulou L, Mamoulakis C, Psycharakis C, Anifantaki A, Sifakis S, et al. Endocrine disruptors leading to obesity and related diseases. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2017. 14(10).
7. Hampl R, Kubátová J, Stárka L. Steroids and endocrine disruptors - History, recent state of art and open questions. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2016. 155(Pt B):217-23.
8. Khalil N, Chen A, Lee M. Endocrine disruptive compounds and cardio-metabolic risk factors in children. *Curr Opin Pharmacol*. 2014. 19: 120-124.
9. Kabir ER, Rahman MS, Rahman I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2015. 40(1):241-58.
10. 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*. 2016. 108(3):224-242.

11. Scsukova S, Rollerova E, Bujnakova Mlynarcikova A. Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reproductive Biology*. 2016. 16(4):243-254.
12. Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V. Prenatal phthalate exposure: epigenetic changes leading to lifelong impact on steroid formation. *Andrology*. 2016. 4(4):573-84.
13. Klopčič I, Markovič T, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicol Lett*. 2018. 294:95-104.
14. Pup L Del, Mantovani A, Cavaliere C, Facchini G, Luce A, Sperlongano P, et al. Carcinogenetic mechanisms of endocrine disruptors in female cancers (Review). *Oncology Reports*. 2016. 36(2): 603–612.
15. Heindel JJ, Newbold R, Schug TT. Endocrine disruptors and obesity. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015. 11(11):653-61.
16. Beszterda M, Franski R. Endocrine disruptor compounds in environment: As a danger for children health. *Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism*. 2018. 24(2):88-95.
17. Bansal A, Henao-Mejia J, Simmons RA. Immune system: An emerging player in mediating effects of endocrine disruptors on metabolic health. *Endocrinology*. 2018. 159(1):32-45.
18. Sabir S, Akhtar MF, Saleem A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019.
19. Gutleb AC, Cambier S, Serchi T. Impact of endocrine disruptors on the thyroid hormone system. *Hormone Research in Paediatrics*. 2016. 86:271-278.
20. Avecilla A, Doke M, Jovellanos J, Avecilla V. Contribution of Inhibitor of Differentiation and Estrogenic Endocrine Disruptors to Neurocognitive Disorders. *Med Sci*. 2018. 6(3): 61.

21. Robinson L, Miller R. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Current environmental health reports*. 2015. 2(4):379-87.
22. De Oliveira M, Rodrigues BM, Castro Olimpio RM, Graceli JB, Gonçalves BM, Barneze Costa SM, et al. Disruptive effect of organotin on thyroid gland function might contribute to hypothyroidism. *International Journal of Endocrinology*. 2019.
23. Han C, Hong YC. Bisphenol A, Hypertension, and Cardiovascular Diseases: Epidemiological, Laboratory, and Clinical Trial Evidence. *Current Hypertension Reports*. 2016. 18(2):11.
24. Wehbe Z, Nasser SA, El-yazbi A, Nasreddine S, Eid AH. Estrogen and Bisphenol A in Hypertension. 2020; 22(3):23.
25. Yang O, Kim HL, Weon J-I, Seo YR. Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev*. 2015. 20(1):12-24.
26. Tavares RS, Escada-Rebelo S, Correia M, Mota PC, Ramalho-Santos J. The non-genomic effects of endocrine-disrupting chemicals on mammalian sperm. *Reproduction*. 2016. 151(1):R1-R13.
27. Skinner MK. Endocrine disruptors in 2015: Epigenetic transgenerational inheritance. *Nature Reviews Endocrinology*. 2016. 12. 68–70.
28. Ezechiáš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z, Cajthaml T. Widely used pharmaceuticals present in the environment revealed as in vitro antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere*. 2016. 152:284-91.
29. Noutsopoulos C, Koumaki E, Mamais D, Nika MC, Bletsou AA, Thomaidis NS. Removal of endocrine disruptors and non-steroidal anti-inflammatory drugs through wastewater chlorination: The effect of pH, total suspended solids and humic acids and identification of degradation by-products. *Chemosphere*. 2015. 119:109-14.

30. Ebele AJ, Abou-Elwafa Abdallah M, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*. 2017. 3(1):1-16
31. Nunes B, Antunes SC, Santos J, Martins L, Castro BB. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2018 Sep 23];107:178–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014765131400236X?via%3Dihub>.
32. Ruhí A, Acuña V, Barceló D, Huerta B, Mor JR, Rodríguez-Mozaz S, et al. Bioaccumulation and trophic magnification of pharmaceuticals and endocrine disruptors in a Mediterranean river food web. *Sci Total Environ*. 2016. 540:250-259
33. Rang, Humphrey P, Dale MM, Ritter JM FR. Rang and Dale's pharmacology. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2016.
34. Pereira-Leite C, Nunes C, Jamal SK, Cuccovia IM, Reis S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Therapy: A Journey Toward Safety. *Medicinal Research Reviews*. 2017. 37(4):802-859.
35. Hinz B, Brune K. Paracetamol and cyclooxygenase inhibition: Is there a cause for concern? *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2012. 71(1):20-5.
36. Meek IL, van de Laar MAFJ, Vonkeman HE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: An overview of cardiovascular risks. *Pharmaceuticals*. 2010. 3(7): 2146–2162.
37. Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical Pharmacology of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: A Review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2012. 11(1):52-64.
38. Schmidt M, Sørensen HT, Pedersen L. Diclofenac use and cardiovascular risks: Series of nationwide cohort studies. *BMJ*. 2018.
39. Walker C, Biasucci LM. Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs revisited. *Postgraduate Medicine*. 2018. 130(1):55-71.
40. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-

- induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2015.
41. Ghosh R, Goswami SK, Feitoza LFBB, Hammock B, Gomes A V. Diclofenac induces proteasome and mitochondrial dysfunction in murine cardiomyocytes and hearts. *Int J Cardiol*. 2016. 223:923-935.
  42. Ulubay M, Yurt KK, Kaplan AA, Atilla MK. The use of diclofenac sodium in urological practice: A structural and neurochemical based review. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2018. ;87:32-36.
  43. Guiloski IC, Stein Piancini LD, Dagostim AC, de Moraes Calado SL, Fávoro LF, Boschen SL, et al. Effects of environmentally relevant concentrations of the anti-inflammatory drug diclofenac in freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2017. 139:291-300.
  44. Gan TJ. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Curr Med Res Opin*. 2010. 26(7):1715-31.
  45. 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*. 2017. 166:473-481
  46. Efosa NJ, 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*. 2017. 173:69-77.
  47. Fernandes D, Schnell S, Porte C. Can pharmaceuticals interfere with the synthesis of active androgens in male fish? An in vitro study. *Mar Pollut Bull*. 2011. 62(10):2250-3.
  48. Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm - Drug Res*. 2014. 71(1):11-23.
  49. Konkel L. Reproductive headache? Investigating acetaminophen as a potential endocrine disruptor. *Environmental Health Perspectives*. 2018. 126(3):032001.

50. Cohen I V., Cirulli ET, Mitchell MW, Jonsson TJ, Yu J, Shah N, et al. Acetaminophen (Paracetamol) Use Modifies the Sulfation of Sex Hormones. *EBioMedicine*. 2018; 28: 316–323.
51. Guiloski IC, Ribas JLC, Piancini LDS, Dagostim AC, Cirio SM, Fávaro LF, et al. Paracetamol causes endocrine disruption and hepatotoxicity in male fish *Rhamdia quelen* after subchronic exposure. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017. 53:111-120.
52. Van den Driesche S, Macdonald J, Anderson RA, Johnston ZC, Chetty T, Smith LB, et al. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci Transl Med*. 2015. 7(288):288ra80.
53. Kristensen DM, Lesné L, Le Fol V, Desdoits-Lethimonier C, Dejuq-Rainsford N, Leffers H, et al. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *Int J Androl*. 2012. 35(3):377-84.
54. Kim P, Park Y, Ji K, Seo J, Lee S, Choi K, et al. Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2018 Sep 23];89(1):10–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512004936?via%3Dihub>.
55. Albert O, Desdoits-Lethimonier C, Lesné L, Legrand A, Guillé F, Bensalah K, et al. Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Hum Reprod*. 2013. 28(7):1890-8.
56. Tykocki NR, Boerman EM, Jackson WF. Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles. *Compr Physiol*. 2017. 7(2):485-581.
57. Thorneloe KS, Nelson MT. Ion channels in smooth muscle: Regulators of intracellular calcium and contractility. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2005. 83(3):215-42.

58. Jackson WF. Potassium Channels in Regulation of Vascular Smooth Muscle Contraction and Growth. In: *Advances in Pharmacology*. 2017. 78:89-144.
59. Martín P, Rebolledo A, Palomo ARR, Moncada M, Piccinini L, Milesi V. Diversity of potassium channels in human umbilical artery smooth muscle cells: A review of their roles in human umbilical artery contraction. *Reproductive Sciences*. 2014. 21(4): 432–441.
60. Pérez-Cremades D, Mompeón A, Gómez XV, Hermenegildo C, Novella S. MiRNA as a new regulatory mechanism of estrogen vascular action. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. 19(2): 473.
61. Usselman CW, Stachenfeld NS, Bender JR. The molecular actions of oestrogen in the regulation of vascular health. *Exp Physiol*. 2016. 101(3):356-61
62. Clegg D, Hevener AL, Moreau KL, Morselli E, Criollo A, Van Pelt RE, et al. Sex hormones and cardiometabolic health: Role of estrogen and estrogen receptors. *Endocrinology*. 2017. 158(5):1095-1105.
63. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of sex differences*. 2017.8(1):33.
64. Feldman RD, Gros R. Rapid vascular effects of steroids - A question of balance? *Can J Cardiol*. 2010.
65. Lipovka Y, Konhilas JP. The complex nature of oestrogen signalling in breast cancer: Enemy or ally? *Bioscience Reports*. 2016.
66. Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*. 2004. 286(2):233-49.
67. Cairrão E, Alvarez E, Carvas JM, Santos-Silva AJ, Verde I. Non-genomic vasorelaxant effects of 17 $\beta$ -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type Ca<sup>2+</sup> current inhibition. *Acta Pharmacol Sin*. 2012. 33(5):615-24.
68. Fredette NC, Meyer MR, Prossnitz ER. Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide formation and vasodilation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018.176:65-72.

69. Pang Y, Thomas P. Additive effects of low concentrations of estradiol-17 $\beta$  and progesterone on nitric oxide production by human vascular endothelial cells through shared signaling pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017. 165(Pt B):258-267
70. Glória S, Marques J, Feiteiro J, Marcelino H, Verde I, Cairrão E. Tributyltin role on the serotonin and histamine receptors in human umbilical artery. *Toxicol Vitro.* 2018. 50:210-216.
71. Mariana M, Feiteiro J, Cairrao E. Cardiovascular Response of Rat Aorta to Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Exposure. *Cardiovasc Toxicol.* 2018. 18(4):356-364.
72. Gonzalez-Rey M, Bebianno MJ. Effects of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol.* 2014. 148:221-30.
73. Holm JB, Mazaud-Guittot S, Danneskiold-Samsøe NB, Chalmey C, Jensen B, Nørregård MM, et al. Intrauterine Exposure to Paracetamol and Aniline Impairs Female Reproductive Development by Reducing Follicle Reserves and Fertility. *Toxicol Sci.* 2016. 50(1):178-89.
74. Laville N, Aït-Ässa S, Gomez E, Casellas C, Porcher JM. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology.* 2004. 196(1-2):41-55.
75. Bader A, Petters O, Keller M, Pavlica S. Paracetamol treatment increases telomerase activity in rat embryonic liver cells. *Pharmacol Reports.* 2011. 63(6):1435-41.