

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
ESTRUTURAL APLICADAS

FERNANDA NAVES ARAÚJO DO PRADO MASCARENHAS

Efeitos do alprazolam no desenvolvimento do Sistema Nervoso Sensorial e Motor
da prole

Uberlândia, MG

2019

FERNANDA NAVES ARAÚJO DO PRADO MASCARENHAS

**Efeitos do alprazolam no desenvolvimento do Sistema Nervoso
Sensorial e Motor da prole**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular

Orientadora: Prof.^a. Dra. Renata Graciele Zanon

Uberlândia, MG

2019

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M395 Mascarenhas, Fernanda Naves Araújo do Prado, 1994-
2020 Efeitos do alprazolam no desenvolvimento do Sistema Nervoso Sensorial e Motor da prole [recurso eletrônico] / Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas. - 2020.

Orientadora: Renata Graciele Zanon.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.74>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Citologia. I. Zanon, Renata Graciele, 1980-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural
 Aplicadas
 Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 001/2020, do PPGBC				
Data:	17/01/2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:10
Matrícula do Discente:	11812BCE001				
Nome do Discente:	Fernanda Naves Araújo do Prado Mascarenhas				
Título do Trabalho:	"Efeitos do alprazolam durante a gestação: impacto no sistema nervoso sensorial e motor da prole"				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se no Anfiteatro do Bloco 4K, Campus Umarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas assim composta: Professores Doutores: Simone Ramos Deconte – IFASC; Ana Paula Espíndula – UFTM e Renata Graciele Zanon; orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Renata Graciele Zanon apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). UlAmada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Graciele Zanon, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/01/2020, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Espindula, Usuário Externo**, em 17/01/2020, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos Deconte, Usuário Externo**, em 17/01/2020, às 16:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1791121** e o código CRC **041033E6**.

*Dedico esse presente estudo
ao meu querido pai Saulo (“In
memoriam”) e minha querida mãe
Marilúcia, que foram os meus
maiores incentivadores em toda
minha vida acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer aos meus pais, Saulo (“*In memoriam*”) e Marilúcia, pelo exemplo que foram e são para mim, pelos ensinamentos, confiança, apoio, dedicação, grande amor e pela oportunidade que sempre me ofereceram para seguir meus objetivos. E ao meu grande irmão Saulo, pelo carinho, amizade e confiança de todos os momentos;

À meu namorado, Matheus, por todo apoio, carinho e companheirismo nas horas mais difíceis, você é essencial na minha vida;

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Renata Graciele Zanon, por todo apoio e orientação desde a graduação, sendo um exemplo de profissionalismo e dedicação, compartilhando seus ricos conhecimentos, e pela amizade adquirida;

À Lorena, Lucélia, Líria, Juliana e Rita pela parceria no projeto;

À todos os laboratórios e professores parceiros, que contribuíram e se propuseram a ajudar em experimentos antes não realizados;

À secretária do PPGBC, Renata, e a todos os professores do PPGBC, que foram crucias do início ao fim da minha formação, contribuindo na organização de burocracias e por todo conhecimento adquirido;

Aos meus amigos do laboratório e de mestrado, presentes e ausentes, principalmente a Natália pela grande ajuda na realização do projeto, pelos conhecimentos compartilhados e pela amizade adquirida;

À todos os meus amigos e familiares que sempre me apoiaram e ajudaram quando necessário;

À banca por aceitar meu convite, e pelas futuras contribuições;

E à CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!

RESUMO

O uso de benzodiazepínicos (BZDs) durante a gestação, destacando-se o alprazolam, é comum e não se conhece o impacto disso no tecido neural do feto. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do alprazolam no Sistema Nervoso Central (SNC) de filhotes de ratas Wistar expostas ao fármaco. Foram utilizados 30 animais (24 fêmeas e 6 machos, CEUA protocolo 014/17). As fêmeas foram divididas em três grupos (n=8): controle (CT, 0 mg/animal), tratamento 1 (T1, 1,25 mg/animal) e tratamento 2 (T2, 30 mg/animal), e, ficaram dois machos por grupo para a cópula. O alprazolam foi administrado por via oral dez dias antes da cópula e durante toda a gestação. Foram avaliados: o número de indivíduos por ninhada, a porcentagem de machos e fêmeas por ninhada, o peso das mães e dos filhotes, as alterações macroscópicas do encéfalo. E, no bulbo olfatório e cerebelo dos filhotes, avaliamos: a densidade e tamanho celular, gliose, densidade sináptica, inflamação, e, estresse oxidativo. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas em relação à quantidade e sexo dos filhotes, peso corporal das mães e dos filhotes, e, alterações macroscópicas do encéfalo. Em relação à morfologia, as duas áreas analisadas não apresentaram diferenças em relação à densidade celular, mas, no cerebelo foi detectada uma maior presença de células menores nos grupos T1 e T2. De todas as proteínas analisadas por Western blotting, o cerebelo apresentou aumento na expressão de Iba-1 e NF- κ Bp65 no grupo T1 quando comparada aos demais grupos. Já o bulbo olfatório não apresentou alterações nas expressões proteicas analisadas. Os experimentos de estresse oxidativo mostraram um aumento na degradação oxidativa dos lipídios nos grupos T2 quando comparados com T1 em ambas as regiões e aumento dos níveis de proteínas carbonilas no grupo T1 em relação ao CT no cerebelo. Concluímos que o tratamento com alprazolam durante a gestação pode estar envolvido com alterações celulares que afetaram mais o cerebelo dos filhotes.

Palavras-chave: benzodiazepínicos, desenvolvimento, sistema nervoso, neurônio, glia.

ABSTRACT

The use of benzodiazepines (BZDs) during pregnancy, especially alprazolam, is common and its impact on the fetal neural tissue is not known. In this sense, the present study aimed to investigate the effects of alprazolam on the Central Nervous System (CNS) of Wistar rat pups exposed to the drug. Thirty animals (24 females and 6 males, CEUA protocol 014/17) were used. Females were divided into three groups (n = 8): control (TC, 0 mg / animal), treatment 1 (T1, 1.25 mg / animal) and treatment 2 (T2, 30 mg / animal). With two males per group for copulation. Alprazolam was administered orally ten days before copulation and throughout pregnancy. We evaluated: the number of individuals per litter, the percentage of males and females per litter, the weight of mothers and pups, the macroscopic changes of the brain. And, in the pups' olfactory bulb and cerebellum, we evaluated: cell density and size, gliosis, synaptic density, inflammation, and oxidative stress. The results showed no significant differences regarding the number and sex of pups, body weight of mothers and pups, and macroscopic changes of the brain. Regarding morphology, the two areas analyzed showed no differences in cell density, but in the cerebellum a significant decrease in the amount of smaller cells was detected in T1 and T2 groups. Of all proteins analyzed by Western blotting, the cerebellum showed increased expression of Iba-1 and NF- κ Bp65 in T1 group compared to the other groups. The olfactory bulb, on the other hand, showed no alterations in the protein expressions. Oxidative stress experiments showed an increase in oxidative degradation of lipids in groups T2 compared to T1 in both regions and increased levels of carbonyl proteins in group T1 compared to CT in the cerebellum. We conclude that treatment with alprazolam during pregnancy may be involved with cellular changes that most affected the pups' cerebellum.

Keywords: benzodiazepines, development, nervous system, neuron, glia.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

- Figura 1.** Encéfalo de ratos Wistar neonatos, sendo **A** demarcando a região de cerebelo e **B** a região do bulbo olfatório ----- 7
- Figura 2.** **A, B** e **C** são fotografias e gráfico, respectivamente, referentes ao número de filhotes por mãe que foram comparados entre os grupos; **D, E** e **F** são fotografias e gráfico, respectivamente, referentes à porcentagem de filhotes machos e fêmeas por mãe que foram comparados entre os grupos. CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2) ----- 18
- Figura 3.** **A** e **B** são fotografia e gráfico, respectivamente, referentes aos pesos das mães que foram comparados entre os grupos; **C** e **D** são fotografia e gráfico, respectivamente, referentes aos pesos dos filhotes que foram comparados entre os grupos. CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2) -----19
- Figura 4.** Fotografia do encéfalo dos filhotes de ratas tratadas com Alprazolam mostrando a ausência de alteração ----- 19
- Figura 5.** **A, B** e **C** são fotomicrografias de 40x de aumento e **E, F** e **G** de aumento de 100x do cerebelo de ratos Wistar. Sendo **A** e **E** referentes ao grupo controle; **B** e **F** ao grupo tratamento 1 (1,25mg); **C** e **G** ao grupo tratamento 2 (30mg). **D** é o gráfico de médias que compara a densidade de células neurais entre os grupos. **E H** é o gráfico de médias que compara a área de células neurais entre os grupos ----- 21
- Figura 6.** **A, B** e **C** são fotomicrografias 40x de aumento e **E, F** e **G** de aumento de 100x do bulbo olfatório de ratos Wistar. Sendo **A** e **E** referentes ao grupo controle; **B** e **F** ao grupo tratamento 1 (1,25mg); **C** e **G** ao grupo tratamento 2 (30mg). **D** é o gráfico de médias que compara a densidade de células neurais entre os grupos. **E H** é o gráfico de médias que compara a área de células neurais entre os grupos ----- 22
- Figura 7.** Bandas reativas de imunoblotting de extrato proteico do cerebelo com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) e erro padrão para as proteínas Sinaptofisina (**A**), Neurofilamento (**B**), GFAP (**C**), Iba-1 (**D**) e NF- κ B p65 (**E**). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2) ----- 24
- Figura 8.** Bandas reativas de imunoblotting de extrato proteico do bulbo olfatório com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) e erro padrão para as proteínas Sinaptofisina (**A**), Neurofilamento (**B**), GFAP (**C**), Iba-1 (**D**), NF- κ Bp65 (**E**) e IL-1 (**F**). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2) ----- 25

Figura 9. Avaliação do balanço redox do cerebelo (coluna à esquerda) e bulbo olfatório (coluna à direita) com gráficos representando média e erro padrão das medições de atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) (**A** e **E**), peroxidação lipídica (**B** e **F**), proteínas carboniladas (**C** e **G**), e a razão dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (**D** e **H**). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2) ----- 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDZs: Benzodiazepínicos

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CEUA-UFU: Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Uberlândia

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CT: Controle

DNPH: *2,4-Dinitrophenylhydrazine*

DTNB: *5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*

DZP: Diazepam

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EO: Epitélio Olfativo

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FDA: *Food and Drug Administration*

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GABA: *Gamma-AminoButyric Acid*

GABA-A: *Gamma-AminoButyric Acid Receptor*

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GSH: *Glutathione*

GSSG: *Glutathione Disulphide*

HRP: Horseradish Peroxidase

Iba-1: *Ionized Calcium-Binding Adapter molecule 1*

IL-1: Interleucina 1

LAMOC: Laboratório de Morfologia e Cultura Celular

LAPAS-UFU: Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NF- κ B p65: *Factor Nuclear Kappa B p65*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PMSF: *Phenylmethylsulphonyl Fluoride*

REBIR-UFU: Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia

RIPA: *Radioimmunoprecipitation Buffer*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SNC: Sistema Nervoso Central

T1: Tratamento 1

T2: Tratamento 2

TBA: *Thiobarbituric Acid*

TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TBS-T: *Tris-buffered saline*

TMB: Taxa Metabólica Basal

TNB: *5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid*

TPTZ: Tripiridiltriazina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1. Transtornos mentais durante a gestação	2
2.2. Psicofármacos	3
2.3. Uso de psicofármacos durante a gestação e lactação	4
2.4. Alprazolam: indicativos de danos ao tecido neural	5
2.5. Escolha do cerebelo e do bulbo olfatório para investigação dos efeitos do uso do Alprazolam na gestação	6
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivos gerais	9
3.2. Objetivos específicos	9
4. METODOLOGIA	10
4.1. Animais	10
4.2. Tratamento	10
4.3. Acasalamento	11
4.4. Grupos e variáveis analisadas	11
4.5. Eutanásia dos animais	12
4.6. Análises do Sistema Nervoso	12
4.6.1. <i>Macroscopia do encéfalo</i>	12
4.6.2. <i>Morfologia</i>	12
4.6.3. <i>Extração de proteínas</i>	13
4.6.4. <i>Western Blotting</i>	14
4.6.5. <i>Estresse oxidativo</i>	15
a. <i>Atividade antioxidante total</i>	15
b. <i>Peroxidação lipídica</i>	16
c. <i>Proteínas carboniladas</i>	16
d. <i>Níveis de glutathione</i>	16
4.7. Descartes de materiais	17
4.8. Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18

5.1. O tratamento com Alprazolam durante a gestação não influencia a quantidade e sexagem dos filhotes ou o peso corporal das mães e dos filhotes -----	18
5.2. Anatomia normal do encéfalo de filhotes após tratamento com Alprazolam na gestação -----	19
5.3. O tratamento durante a gestação com Alprazolam parece influenciar na maior presença de células de menor área no cerebelo -----	20
5.4. O estudo da expressão proteica indicou aumento de microglia e elevação do fator de transcrição NF-κB p65 no cerebelo de filhotes de mães tratadas com Alprazolam -----	23
5.5. O tratamento com Alprazolam influencia alguns aspectos do balanço redox no cerebelo e no bulbo olfatório -----	26
6. DISCUSSÃO -----	28
7. CONCLUSÃO -----	34
8. REFERÊNCIAS -----	35

1. INTRODUÇÃO

Embora existam vários estudos e relatos de casos individuais sobre o uso de benzodiazepínicos (BDZs) na gravidez humana, os dados referentes à teratogenicidade e aos efeitos no desenvolvimento ainda são inconsistentes. Desde a década de 70 há evidências que a exposição do primeiro trimestre de vida fetal aos BZDs no útero resultou no nascimento de alguns bebês com fissuras faciais, malformações cardíacas e outras malformações múltiplas. Já o uso tardio do terceiro trimestre e exposição durante o trabalho de parto parece estar associado a riscos muito maiores para o neonato.

Testes de teratologia em roedores e coelhos são normalmente requisitados para que uma nova medicação seja aprovada. Os testes pré-clínicos são importantes na previsão de tratamentos que podem ter potencial teratogênico, entretanto, alguns dados de toxicidade reprodutiva são limitados antes da comercialização de uma medicação. Apesar do diazepam e do maleato de midazolam terem sido aprovados pela agência reguladora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) sem indícios de efeitos teratogênicos, vários estudos e relatos de casos demonstraram a possibilidade de teratogenicidade destas substâncias que se enquadram no conjunto de drogas denominadas BZDs.

Considerando-se o elevado número de gestantes que utilizam medicações de forma crônica e pelo fato de os fármacos poderem causar danos fetais e possíveis teratogenicidade, justifica-se a realização de ensaios biológicos para análises toxicológicas e teratogênicas dos efeitos do uso de medicações durante o período pré-natal. Uma vez que, ainda, há poucos estudos que avaliaram o potencial lesivo dos BZDs, especialmente do Alprazolam, o mais usado por gestantes. Nesse contexto, alguns dados da literatura científica apontam que o uso de BZDs na gestação pode prejudicar o desenvolvimento do Sistema Nervoso do feto, por atuar de forma agonista ao neurotransmissor ácido gama amino-butírico (GABA), influenciando o período da sinaptogênese, ou, tendo ação sobre o balanço redox, disparando estresse oxidativo no tecido neural.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Transtornos mentais durante a gestação

O transtorno mental comum refere-se a um grupo de doenças mentais, tais como: depressão, transtorno de ansiedade generalizada e social, transtorno do pânico, fobias, transtorno obsessivo compulsivo e transtorno de estresse pós-traumático, que estão envolvidas com alterações dos pensamentos, sentimentos, comportamento e relacionamento. Sua prevalência na população mundial é de 29,2%, sendo mais comum no sexo feminino (LUCCHESI et al., 2017; CAMACHO et al., 2006). A ansiedade destaca-se dentro desses transtornos e pode ser definida como um estado desagradável de medo, apreensão, tensão e inquietação, caracterizada por desconforto derivado de antecipação de perigo ou de algo desconhecido. Seus sintomas envolvem ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático levando à taquicardia, sudorese, tremor e palpitações. Quando o indivíduo passa por episódios de ansiedade leve, relacionadas a experiências comuns da vida, não se justifica o tratamento medicamentoso, mas quando esta se torna intensa, crônica e debilitante, deve ser tratada com ansiolíticos e assistência comportamental ou psíquica (CASTILLO et al., 2000; MATTE & PLETSCHE, 2014).

Ansiedade e outros transtornos mentais são realidade durante a gestação, e pode estar associado às variáveis de baixa idade, escolaridade, renda, desemprego, situação conjugal e intercorrências na gestação. Assim, os estudos atuais buscam caracterizar os fatores de risco durante a fase gestacional, para diagnóstico e tratamento precoces, pois, quando subdiagnosticados ou não tratados, podem levar a consequências materno-fetais, como dificuldades durante o trabalho de parto, e, sintomas depressivos no puerpério (LUCCHESI et al., 2017). Adicionalmente, as exacerbações dos transtornos psiquiátricos colocam em risco a vida da própria gestante e do seu feto, havendo uma relação direta entre a intensidade dos sintomas e os descontroles comportamentais (JABLENSKY et al., 2005). Logo, a privação medicamentosa na tentativa de proteger o feto não é uma opção racional, no entanto, pode-se evitar a exposição desnecessária do feto com medicamentos sem comprovações científicas, sem prescrições e utilizados em excesso (SILVA, 2014).

2.2. Psicofármacos

Os ansiolíticos são medicamentos que possuem a propriedade de atuar sobre a ansiedade e tensão. Também denominados tranquilizantes por “acalmarem”. Foram denominados como ansiolíticos, pois "destroem" (lise) a ansiedade. Sendo também utilizados no tratamento de insônia e, nesse caso, também recebem o nome de drogas hipnóticas, isto é, indutoras do sono. Os ansiolíticos mais comuns são substâncias chamadas BZDs que aparecem em medicamentos como o alprazolam (CEBRID, 2003). Estudos mostraram que os BZDs estão entre os fármacos mais prescritos mundialmente e vendidos no Brasil, e, seu consumo dobra a cada cinco anos. Logo o consumo excessivo por automedicação levou as autoridades sanitárias a estabelecer controle sobre as prescrições (AUCHEWSKI et al., 2004; YATES & CATRIL, 2009; BALDISSERA, DE FÁTIMA COLET & MOREIRA, 2010).

As recomendações de uso dos BZDs são de duração de semanas, mas sabe-se de seu uso durante anos ou décadas, mesmo com sua ação diminuída e efeitos adversos aumentados. Após seis semanas, seu uso pode levar ao desenvolvimento de tolerância, abstinência e dependência (MATTE & PLETSCH, 2014; MENGUE et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2002) cerca de 10% das populações dos centros urbanos mundiais consomem de maneira abusiva substâncias psicoativas, independentemente de idade, sexo e nível educacional. Os BDZs são rapidamente absorvidos, independente da via de administração, devido sua alta lipossolubilidade, conferindo uma ampla distribuição pelos tecidos e fácil passagem pela barreira hematoencefálica. Também conseguem ultrapassar a barreira placentária e são excretados através da urina e pelo leite materno. A ação dos BZDs é resultante da potencialização do efeito inibidor do GABA (NUNES & BASTOS, 2016).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, possuindo receptores específicos para sua ligação, como o receptor GABA-A, que além de possuir sítios de ligação para GABA, contém regiões específicas para ligação de BZDs, barbitúricos e álcool (DE AZEVEDO, ALÓE & HASAN, 2004). Quando os BZDs se ligam aos receptores GABA-A torna-os mais sensíveis à ativação pelo próprio neurotransmissor GABA, promovendo a abertura dos canais de cloro, aumentando o influxo celular de cloro, levando a uma hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, inibindo a excitação celular (DE ALMEIDA, 2015). Esse receptor está relacionado com efeitos hipnóticos,

cognitivos, psicomotricidade, ansiolíticos, limiar convulsivo, depressão respiratória, relaxamento muscular e potencialização dos efeitos do etanol. Logo, drogas agonistas ao GABA-A exercem efeitos farmacológicos ansiolíticos, antiepilépticos, relaxante muscular e hipnóticos. E seus efeitos colaterais podem estar relacionados a doses terapêuticas normais, superdoses e ao uso prolongado, gerando prejuízos sobre a memória, habilidades psicomotoras, insônia e abstinência (DE OLIVEIRA, MOTA & CASTRO, 2015).

Devido esses efeitos colaterais comuns, que na maioria das vezes são provocados pelo uso indevido desse fármaco, eles merecem uma atenção especial dos profissionais da saúde (NUNES & BASTOS, 2016). Segundo a bula do remédio Frontal®, composto por alprazolam, um medicamento da classe dos fármacos BZDs que atua no SNC, após administração oral, é rapidamente absorvido, atingindo a concentração máxima no organismo entre uma ou duas horas. O alprazolam é um medicamento classificado como pertencentes à categoria C de risco fetal, segundo a classificação da FDA, em que o risco não pode ser excluído pois faltam estudos em humanos, porém, os estudos em modelos animais são positivos para o risco fetal ou estão ausentes, mas os potenciais benefícios podem justificar o risco potencial (CAMACHO et al., 2006; NUNES et al., 2015).

2.3. Uso de psicofármacos durante a gestação

Qualquer agente que possa ser permeável à placenta é considerado perigoso, devido a possibilidade de desenvolvimento de alterações fetais, seja morfológica ou fisiológica. A malformação congênita é um defeito morfológico que está presente durante o nascimento, sendo resultado de um desenvolvimento embrionário anormal, causados por agentes teratogênicos. Esses agentes podem apresentar natureza biológica, física ou química, destacando-se as drogas de abusos e os medicamentos pelo consumo usual pela população. Assim a farmacovigilância tem avaliado os efeitos do uso de medicamentos por gestantes, possibilitando determinar o impacto dos defeitos congênitos na população, e, a partir disto, elaborar estratégias para reduzir sua incidência (RAMOS et al., 2008).

Estudos mostraram que 2% das gestantes americanas receberam uma ou mais prescrições de BZDs (BLAYA et al., 2005). Seu emprego não é totalmente

contraindicado, contando que seja em menores doses, divididas em duas vezes diárias, mas recomenda-se evitar seu uso no primeiro trimestre de gestação e durante a lactação (PHEULA, BANZANATO & DALGALARRONDO, 2003; RAM & GANDOTRA, 2015).

A maneira como o fármaco afetará o feto, dependerá de qual estágio de desenvolvimento esse feto se encontra, da potência e da dose administrada do fármaco pela gestante (OGAWA, TAKESHIMA & FURUKAWA, 2018; DE ABREU TACON, DO AMARAL & TACON, 2017). Nesse contexto, prioriza-se o uso de medicações que possuem meia vida curta, que corresponde a aproximadamente 11,2 horas em adultos saudáveis, e que sejam ausentes de metabólitos ativos, como exemplo o alprazolam (PHEULA, BANZANATO & DALGALARRONDO, 2003). No entanto, existe aumento de possíveis riscos envolvendo a toxicidade fetal, com morte intrauterina, malformações físicas, prejuízo de crescimento e teratogenicidade comportamental. Alguns estudos foram mais específicos quanto às possíveis malformações, como a presença de problemas neurocomportamentais, lábio leporino, fenda palatina, microcefalia, estrabismo, deslocamento do quadril, obstrução do ducto lacrimal, síndrome de Down, estenose pilórica, dentre outras (IQBAL, SOBHAN & RYALS, 2002; CAMACHO et al., 2006; LUCCHETTA, DA MATA & MASTROIANNI, 2018).

2.4. Alprazolam: indicativos de danos ao tecido neural

A morte celular fisiológica é um processo pelo qual os neurônios malsucedidos são excluídos por apoptose durante o desenvolvimento do SNC, sendo reconhecido como um fenômeno natural. Entretanto, fatores ambientais podem influenciar nos mecanismos de morte celular, aumento do número de neurônios submetidos à apoptose, convertendo um fenômeno natural em um processo patológico (MANNERICK & ZORUMSKI, 2000). O estudo de OLNEY et al. (2002) demonstrou que agentes potencializadores da ação do neurotransmissor GABA nos receptores GABA-A, como BZDs, desencadearam a morte celular generalizada no cérebro de ratos neonatos, quando administrados no período de sinaptogênese, resultando em uma massa cerebral reduzida que, à longo prazo, pode levar a distúrbios neurocomportamentais. Os autores sugeriram que a depressão excessiva da atividade neuronal (aumento do estímulo

inibitório via GABA) durante a sinaptogênese pôde constituir um sinal para os neurônios em desenvolvimento entrarem em apoptose.

Adicionalmente, estudos realizados por MUSAVI & KAKKAR (1998) mostraram que a administração de Diazepam (DZP) em ratos, um BZD, resultou em uma série de processos pró-oxidativos médios e danos moleculares em regiões específicas do cérebro, sendo uma delas o cerebelo. Outro estudo realizado por EGER et al. (2016) investigou os efeitos da administração de DZP sobre o equilíbrio redox no encéfalo de ratos, e os resultados mostraram que houve alteração nos níveis de peroxidação lipídica, teor de proteínas carboniladas e a de atividade enzimática da catalase, concluindo que o DZP causou um desequilíbrio oxidativo em áreas cerebrais, mais especificamente cerebelo e hipocampo.

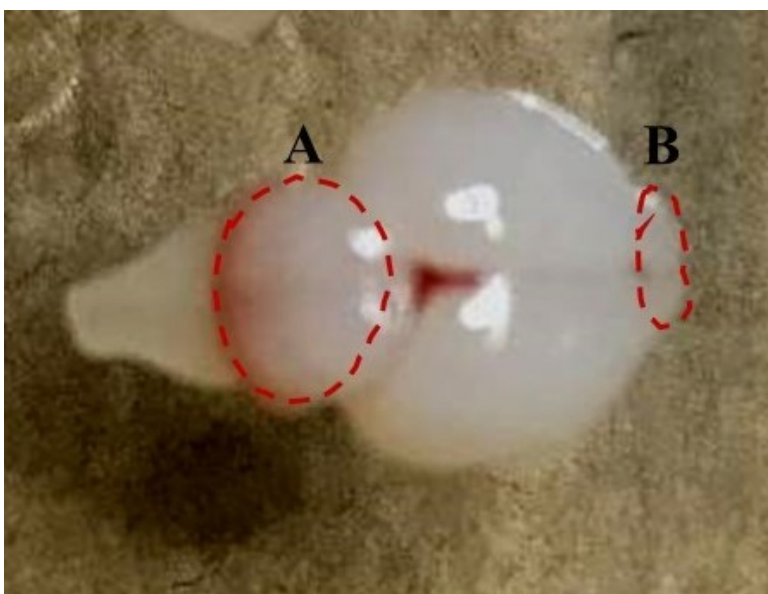
Atualmente, vem crescendo os estudos com interesse no papel do dano oxidativo por radicais livres em doenças humanas, e a patogênese da ansiedade tem sido associada a esse estresse oxidativo, que é fortemente apoiada por modelos animais e dados bioquímicos clínicos. Sabe-se que o estresse oxidativo contribui para a degeneração neuronal no SNC, pois o cérebro está vulnerável à produção de espécies reativas de oxigênio por metabolizar 20% do oxigênio total do corpo e possuir pouca capacidade antioxidante (SHAHZAD et al., 2014).

2.5. Escolha do cerebelo e do bulbo olfatório para investigação dos efeitos do uso do Alprazolam na gestação

Devido técnicas de radioligantes específicas foi possível identificar e caracterizar receptores de neurotransmissores e fármacos (GRALLERT, TAVARES & DE ARAÚJO, 2003). As primeiras investigações possibilitaram a caracterização dos receptores BZDs em várias áreas do SNC, com maior densidade nas áreas de córtex cerebral, cerebelo, e estruturas do sistema límbico como o bulbo olfatório e hipocampo (GUEDES, 2008). Sendo possível correlacionar a distribuição anatômica desses receptores com seus efeitos farmacológicos quando ativados, assim áreas do sistema límbico estariam relacionadas à ação ansiolítica, áreas corticais estariam relacionadas ao efeito anticonvulsivante, e, núcleos talâmicos à ação hipnótico-sedativa (BERNIK, SOARES & SOARES, 1990).

Sabe-se que o cerebelo (**Figura 1A**) recebe e envia informações para regiões corticais cerebrais para controle motor e cognição, que inclui atenção, processamento de informações, aprendizagem, memória motora, linguagem e percepção espacial. Quando lesionado, o cerebelo pode desenvolver vários sintomas como: dismetria, hipotonia, tremor, ataxia, distonia e fala desarticulada, que podem estar relacionados com a neurodegeneração (WALLAUER, 2016; GLICKSTEIN, STRATA & VOOGD, 2009). O cerebelo possui três diferentes regiões celulares, sendo: camada granulosa, camada molecular e células de Purkinje. Um estudo mostrou que o cerebelo pode ser alvo de várias substâncias tóxicas, sendo a camada granulosa e as células de Purkinje os dois alvos mais facilmente reconhecidos (FONNUM & LOCK, 2000).

Os bulbos olfatórios (**Figura 1B**) são pequenas estruturas telencefálicas, situadas acima da lâmina cribriforme do osso etmóide, que recebem muitas informações oriundas de moléculas de odor captadas por receptores localizados na área olfatória do nariz e as direcionam para o córtex cerebral, sendo essenciais para nutrição e reprodução animal. O epitélio olfativo (EO) dos vertebrados é altamente regenerativo que é mantido em condições normais por uma população de células-tronco, que contribuem para a reconstituição epitelial após a lesão. Mas com o tempo há exaustão neurogênica, com desaparecimento dos neurônios sensoriais olfativos (CHILD et al., 2018). O bulbo olfatório possui os receptores GABA-A expressos em níveis muito altos e possuem funções importantes nesses tecidos, juntamente com os receptores de glutamato, estão envolvidos na codificação olfativa que, por sua vez, pelo menos em roedores, estão envolvidos no aprendizado e condicionamento (LAMEH et al., 2000).



Fonte: autora

Figura 1. Encéfalo de ratos Wistar neonatos, sendo **A** demarcando a região de cerebelo e **B** a região do bulbo olfatório.

A hipótese do nosso trabalho foi que o tratamento com Alprazolam durante a gestação pode afetar o desenvolvimento do sistema nervoso e comprometer especialmente áreas como o cerebelo e o bulbo olfatório tanto na sua morfologia quanto na sua fisiologia. Nesse sentido nosso trabalho vem contribuir com esse olhar científico-clínico para essas áreas escolhidas do tecido neural de filhotes de ratas tratadas com o fármaco.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais:

Estudar o potencial tóxico do Alprazolam aos filhotes de ratas tratadas com o medicamento Alprazolam durante a gestação, com destaque para o SNC motor e sensitivo da prole.

3.2. Objetivos específicos:

- Analisar possíveis alterações na quantidade de filhotes por ninhada e sexagem de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação;
- Analisar possíveis alterações nos pesos individuais de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação e do peso de seus filhotes;
- Analisar possíveis alterações macroscópicas do encéfalo de filhotes de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação;
- Analisar alterações da densidade de células neurais no cerebelo e no bulbo olfatório de filhotes de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação;
- Analisar alterações da gliose e da densidade sináptica no cerebelo e no bulbo olfatório de filhotes de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação;
- Analisar a inflamação no cerebelo e no bulbo olfatório de filhotes de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação;
- Analisar o estresse oxidativo no cerebelo e no bulbo olfatório de filhotes de mães tratadas com Alprazolam durante a gestação.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Todos os procedimentos realizados com animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU), protocolo número 014/17. Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) gerados na Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU). Sendo 24 fêmeas e 6 machos, animais adultos jovens, com peso entre 150 a 180 gramas para as fêmeas e 200 a 250 gramas para os machos.

Os animais foram mantidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da UFU (LAPAS-UFU) em caixas de policarbonato opaco com a capacidade máxima de cinco animais por caixa. Mantidas em ambiente ventilado, com substrato de serragem, em temperatura entre 18 a 22°C, umidade de 45 a 55% e ciclo de luz claro-escuro de 12/12 horas. Devidamente nutridos com ração comercial e água potável *ad libitum*.

4.2. Tratamento

O BZD alprazolam (8-cloro-1-metil-6-fenil-4H-[1,2,3]triazolo(4,3- α)[1,4]), com nome comercial Frontal[®] (Laboratório Pfizer, São Paulo, SP) foi o fármaco utilizado no projeto. O fármaco foi solubilizado em água destilada e as dosagens foram calculadas de acordo com o peso dos animais. Como não há dose de alprazolam determinada para ratos Wistar, o protocolo foi definido por meio de extrapolação alométrica, de acordo com a taxa metabólica basal (TMB) do roedor. As doses extrapoladas foram obtidas a partir da equação $(P)^{0,75} \times K$, sendo que P representa o peso médio dos roedores, e K, a constante para mamíferos placentários, que equivale a 70. Calcula-se a TMB para o animal-referência (homem) e para o animal-alvo (roedor) ($TMB = K \times P^{0,75}$). Posteriormente divide-se a dose total indicada para o animal-referência, em miligramas, por sua TMB e multiplica-se esse resultado pela TMB do animal-alvo. O resultado obtido é a dose total em miligramas para o animal alvo (ANDREOLLO et al., 2012, SEDGWICK, 1991).

Baseado na dose média clínica recomendada pela posologia da bula do medicamento, a quantidade total diária administrada aos roedores foi de 1,25 mg

durante o tratamento. E, overdose de 24 vezes a dose clínica recomendada, a quantidade de 30 mg por animal. Adicionalmente, o grupo controle recebeu diariamente 0,04 ml do veículo de diluição do fármaco.

Cada grupo experimental, correspondente aos tratamentos 1 (1,25 mg/dia), 2 (30 mg/dia) e controle (0,04 ml do veículo), foi formado por oito fêmeas nulíparas, que foram tratadas dez dias antes do acasalamento e durante todo o período de gestação com alprazolam ou veículo por via oral, com auxílio de sonda flexível orogástrica.

Sabendo que 30 dias de vida do homem equivale a um dia de vida de um rato, e que o uso crônico do alprazolam em humanos é de no mínimo seis meses, foi determinado qual seria o período pré-natal de tratamento, que foram de 10 dias, equivalentes a 10 meses em um humano. Garantindo assim um tratamento crônico (ANDREOLLO et al., 2012).

4.3. Acasalamento

Foram utilizados oito fêmeas e dois machos por grupo, sendo três grupos para diferentes tratamentos que estão explicados no tópico abaixo (4.4).

Foram organizados os períodos de acasalamento, em que foram colocadas duas fêmeas por vez junto a um macho, por um período de quatro dias. Todos os animais foram corretamente identificados com canetas cirúrgicas atóxicas de acordo com seus grupos.

4.4. Grupos e variáveis analisadas

Quando obtidos os filhotes, estes foram divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo 1 (Controle/CT):** Filhotes (n=8, um filhote de cada mãe) de mães que receberam diariamente 0,04 ml do veículo de dissolução do fármaco via oral;
- **Grupo 2 (Tratamento 1/T1):** Filhotes (n=8, um filhote de cada mãe) de mães que receberam diariamente 1,25 mg de alprazolam diluído em água destilada via oral.
- **Grupo 3 (Tratamento 2/T2):** Filhotes (n=8, um filhote de cada mãe) de mães que receberam diariamente 30 mg de alprazolam diluído em água destilada via oral.

No período após o parto, as fêmeas de ambos os grupos foram avaliadas em relação ao peso corporal em gramas por meio da pesagem dos animais em uma balança

eletrônica com precisão de 0,1 grama, e posteriormente eram destinadas a outro grupo de pesquisa para realização dos seus respectivos experimentos. Após a obtenção dos filhotes, os mesmos foram pesados e foi realizada a separação por gênero, assim, quantificando o número de filhotes por mãe e relação de machos e fêmeas por ninhada. Para essas análises foi considerado o número total de filhotes por grupo (CT = 92, T1 = 92, T2 = 81).

4.5. Eutanásia dos animais

No segundo dia pós-parto, todos os animais foram submetidos à eutanásia conforme normas éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). As fêmeas e as progênes foram eutanasiadas com superdosagem de 150 mg/kg de tiopental sódico misturado à lidocaína na concentração de 10 mg/ml, aplicado por via intraperitoneal (FIOCRUZ, 2008). Esse procedimento foi realizado conforme técnicas aprendidas em treinamento na REBIR-UFU.

4.6. Análises do Sistema Nervoso

4.6.1. *Macroscopia do encéfalo*

Os neonatos eutanasiados (n=8) foram encaminhados para o Laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC) onde foi realizada a extração do encéfalo e avaliação de possíveis alterações macroscópicas da organização anatômica do SNC de cada animal.

4.6.2. *Morfologia*

Após a eutanásia, parte dos animais (n=4) foi submetida à toracotomia para perfusão transcardíaca com 5 ml de solução salina tamponada (5 ml de tampão fosfato 0,2 M e pH 7,4 contendo 0,9% de cloreto de sódio) e, posteriormente, os animais foram fixados com 5 ml de solução fixadora (5 ml de solução de paraformaldeído 4% diluída em tampão fosfato 0,2 M e pH 7,4).

Com auxílio de instrumentos cirúrgicos, foram extraídos os encéfalos de todos os animais e mantidos em solução fixadora por 48 horas em temperatura de 4°C. O preparo histológico consistiu em desidratação em álcool etílico em concentrações progressivas de 80 a 100%, diafanização em xilol, impregnação e inclusão em parafina em

temperatura de 58 a 60°C para a confecção do bloco de parafina. Posteriormente, foram realizados os cortes histológicos em micrótomo (Leica®) dos blocos de parafina, com 5 µm de espessura, com auxílio do mapa PAXINOS & WATSON (1997) para localização das regiões de interesse (cortes frontais de bulbo olfatório e cerebelo). As secções foram transferidas para lâminas de vidro gelatinizadas para realização das análises de histoquímica.

Foi realizada a coloração dos corpúsculos de Nissl (específicos das células neurais), que são retículos endoplasmáticos rugosos com características basófilas que se coram em roxo. Os cortes frontais de bulbo olfatório e cerebelo foram previamente desparafinizados em xilol I e II, durante cinco minutos em cada, depois hidratados em uma bateria de álcoois nas concentrações 100%, 90%, 80%, 70%, durante três minutos em cada, posteriormente foram corados em solução Cresyl Violeta (1g de Cresyl Violeta, 100 ml de água destilada e 10 ml de ácido acético 10%) durante 5-10 minutos, e, posteriormente, lavados em água destilada. Em seguida, passaram por uma bateria de álcoois para desidratação e xilol. Para a montagem das lâminas, foram utilizados Entellan® e lamínula devidamente limpa. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas da luz até a análise.

Foram fotografadas três lâminas coradas por animal, de cada região estudada (bulbo olfatório e cerebelo), utilizando câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz, obtendo assim três imagens de cada lâmina para cada aumento (40x e 100x). As medidas consistiram na contagem do número de células neurais em áreas de tamanhos pré-determinados e padronizados para todos os animais, e, na morfometria realizada por meio da mensuração das áreas de dez células neurais por imagem. Essas medidas foram realizadas nas duas regiões selecionadas para o estudo (cerebelo e bulbo olfatório), utilizando o *software ImageJ*. E mediante a essas análises obtivemos a densidade de células neurais e suas respectivas áreas de cada região estudada. Foram calculadas as médias aritméticas para cada grupo, as quais foram comparadas entre si a partir de análises estatísticas adequadas usando o *software GraphPad Prism*.

4.6.3. Extração de proteínas

Os demais animais (n=4) foram eutanasiados e perfundidos apenas com solução salina tamponada para limpeza do sangue dos vasos sanguíneos e tiveram seus encéfalos

extraídos para a dissecação das áreas de interesse (bulbo olfatório e cerebelo). Essas áreas foram retiradas de ambos os hemisférios cerebrais. Todo esse material seguiu para a extração de proteínas totais com uso do tampão RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0,5% Na-deoxicolato ácido, 0,1% SDS e 1% Triton X-100) e, para tanto, foram mantidos no tampão e submetidos à homogeneização e centrifugação refrigerada, os sobrenadantes foram submetidos ao método de BRADFORD (1976) para quantificação de proteína total com leitura de absorvância em leitor de Elisa em 595 nm. Posteriormente, cada sobrenadante foi dividido em duas alíquotas, uma alíquota contendo apenas o sobrenadante e estocada em ultrafreezer à -80°C para a realização das análises de estresse oxidativo, e, à outra alíquota, foi adicionada tampão Laemmli para preservação de proteínas e estocadas em freezer à -20°C para a realização de *Western blotting*.

4.6.4. *Western blotting*

Foram utilizadas 50 ou 100 µg de proteínas para eletroforese em gel de poliacrilamida (gel de empacotamento 4% e gel de corrida 20%). As placas contendo os géis foram montadas em cuba vertical para eletroforese (Bio-Rad®) contendo tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 1,9 M e 1% de SDS, pH 8,7). A corrida foi sempre acompanhada por padrão de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad®) e fonte de corrente elétrica contínua ajustada manualmente de 70-120 volts.

Após a corrida, foi feita a eletrotransferência das proteínas dos géis para membranas de nitrocelulose *Hybond-ECL* (Amersham Biosciences®) utilizando-se tampão de transferência (Tris 0,25 mM, glicina 12,5 mM e 20% de metanol, pH 8,3), durante duas horas com corrente elétrica de 120 volts. As membranas de nitrocelulose foram, então, coradas com Ponceau S 1% (0,5 g de Ponceau S, 250 µl de ácido acético glacial e 50 ml de água destilada) para garantir que as proteínas correram de maneira adequada e as bandas estavam presentes, sendo fotografadas para arquivamento. Posteriormente as membranas foram lavadas com TBS-T (tampão Tris, 0,2% Tween20) até a retirada de todo o corante. Logo após, foram bloqueadas com BSA 5% (0,5 g de BSA diluído em 10 ml de TBS-T) durante duas horas, lavadas três vezes com TBS-T e, posteriormente, incubadas com anticorpo primário diluído em BSA 3% (0,3 g de BSA diluído em 10 ml de TBS-T) *overnight* em temperatura de 4°C sob agitação contínua.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: camundongo anti-sinaptofisina (Abcam® 1:1500, marcador de vesículas sinápticas), camundongo anti-neurofilamento (Sigma® 1:1000, marcador de citoesqueleto neural), camundongo anti-GFAP (Santa Cruz® 1:500, marcador de astrócito), camundongo anti-Iba-1 (Imuny® 1:300, marcador de microglia), coelho anti-NF- κ B p65 (Imuny® 1:500, marcador de precursores inflamatórios), coelho anti-IL-1 (Abcam® 1:800, marcador de citocina inflamatória), e camundongo anti- α -Tubulina (Cell Signaling® 1:1200, marcador de citoesqueleto para controle molecular). No outro dia, as membranas foram lavadas três vezes em TBS-T e incubadas durante duas horas com anticorpo secundário adequado conjugado à peroxidase (HRP) diluído em BSA 3% na concentração 1:5000. Após outra série de lavagens, foi realizada a detecção das bandas imunorreativas através de quimiluminescência (Amersham Biosciences®). A intensidade das bandas foi determinada através de densitometria de pixels com normalização usando bandas da proteína controle (α -Tubulina) com o auxílio do *software ImageJ*.

4.6.5 Estresse oxidativo

Os radicais reativos são produzidos a partir do metabolismo celular, como as espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo potencialmente prejudiciais. Mas estes radicais livres podem ser removidos ou inativados por vários antioxidantes por meio de mecanismos que envolvem a transferência de elétrons ou hidrogênios (URREA-VICTORIA et al., 2016).

Para avaliação do balanço redox foi medida a atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro, indicadores de estresse oxidativo pela análise da peroxidação lipídica, proteínas carboniladas e os níveis de glutathiona na amostra de proteína total isenta de Laemmli dos filhotes.

a. Atividade Antioxidante Total

Trata-se de um ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro ou do inglês FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) em fluídos biológicos e soluções aquosas de compostos isolados. Que está baseado na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente em um complexo Tripiridiltriazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na

tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorvância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm. Logo quanto maior a absorvância, maior será o potencial antioxidante (URREA-VICTORIA et al., 2016).

b. Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica constitui uma reação em cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, gerando radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das mesmas (FRANÇA et al., 2013).

Um dos métodos para se quantificar os produtos da peroxidação lipídica é o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico ou do inglês TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). Esse método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (peróxidos lipídicos, malondialdeído, e outros aldeídos de baixo peso molecular) que, ao reagirem com o ácido tiobarbitúrico ou TBA (*Thiobarbituric Acid*) formam bases de Schiff. Esses complexos são de coloração rósea e sua concentração pode ser determinada espectrofotometricamente à 532 nm (BUEGE & AUST, 1978).

c. Proteínas Carboniladas

O nível de proteínas carboniladas é um indicador de danos oxidativos às proteínas. As proteínas carboniladas reagem com 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), formando um correspondente hidrazona. Para determinação das mesmas, as proteínas foram precipitadas, concentradas, reagidas com DNPH, e sendo retirado o DNPH não ligado às proteínas, assim sendo lido apenas as hidrazones ligadas às proteínas (FIELDS & DIXON, 1971; LEVINE et al., 1990; LEVINE et al., 1994; REZNICK & PACKER, 1994; VOSSEN, HAGE & KARIM, 2000).

d. Níveis de Glutathione

A glutathione (GSH) está entre os antioxidantes mais importantes nas células, sendo utilizada em reações enzimáticas para eliminar peróxidos e em reações não enzimáticas para manter o ascorbato e o-tocoferol em suas formas reduzidas e funcionais. Nessas reações, o GSH é convertido em glutathione dissulfeto (GSSG). Uma redutase dependente de NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) que

está presente nas células para reduzir o GSSG de volta ao GSH. Consequentemente, o desequilíbrio de GSH e GSSG fornece um indicador dinâmico de estresse oxidativo, isto é, condições sob as quais os pró-oxidantes predominam sobre os antioxidantes (JONES, 2002).

Este método mede a concentração de sulfidrilas não proteicas. O grupo sulfidrila da glutatona reduzida (GSH) reage com reagente Ellman ou *5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)* (DTNB) e produz um cromóforo *5-Thio-2-Nitrobenzoic Acid* (TNB) lido a 412 nm.

4.7. Descarte de materiais

O lixo resultante da limpeza da sala, materiais descartáveis e carcaças dos animais provenientes da seção de experimentação, foram acondicionados em sacos plásticos brancos, identificados como risco biológico e descartados em local apropriado.

4.8. Análise estatística

De acordo com RAZALI & WAH (2011) e TORMAN, COSTER & RIBOLDI (2012), para amostras pequenas ($n < 10$) é recomendado o uso direto de testes estatísticos não paramétricos. Assim, os resultados numéricos cujo $n < 10$ foram analisados pelos testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney. Somente a análise quantidade de animais por ninhada e sexagem, cujo $n > 10$, foi usado testes paramétricos caso os dados apresentassem dentro da normalidade (Anova One-Way com pós-teste de Bonferroni).

O programa usado foi o *software GraphPad Prism 5.0* considerando nível de significância adotado para estes testes de $p \leq 0,05$. Os gráficos foram plotados apresentando média e erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1. O tratamento com Alprazolam durante a gestação não influencia a quantidade e sexagem dos filhotes ou o peso corporal das mães e dos filhotes

A **Figura 2** mostra análises das variáveis avaliadas no momento do nascimento dos filhotes: quantidade de filhotes e porcentagem de machos e fêmeas por ninhada. Logo, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para ambas as variáveis, mostrando que o uso de alprazolam pelas mães não teve interferência direta na quantidade ($p = 0,9956$) e na sexagem ($p = 0,8406$) dos filhotes. A **Figura 3** mostra as análises de pesos das mães que foram avaliadas depois do uso do Alprazolam, enquanto, os filhotes foram pesados no momento do nascimento. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tanto para os pesos corporais das mães ($p = 0,3288$) quanto para os filhotes ($p = 0,6277$), mostrando que o uso do alprazolam pelas mães não teve interferência direta no ganho de peso corporal.

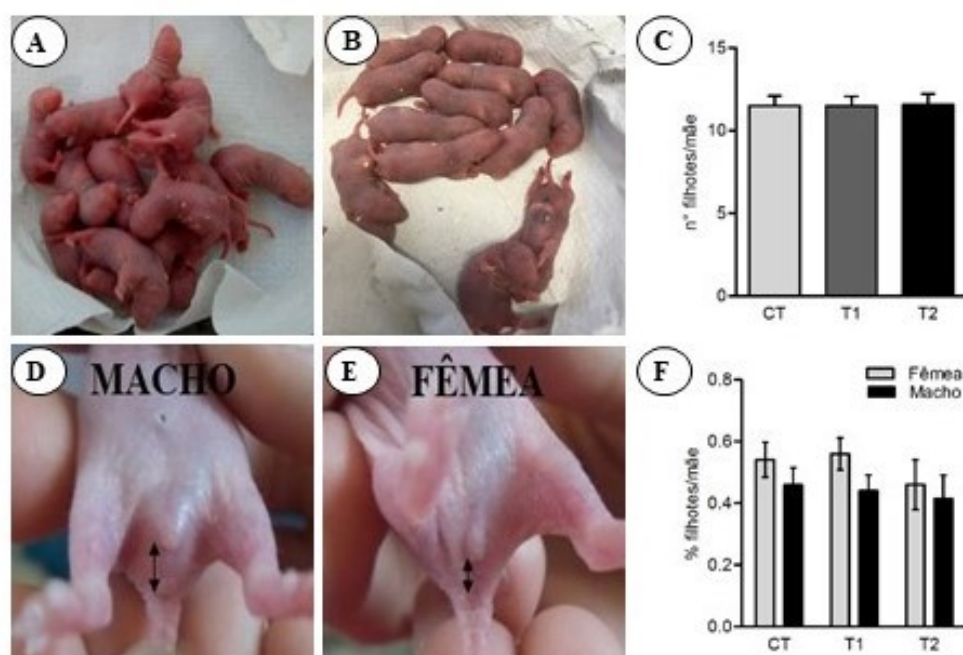


Figura 2. A, B e C são fotografias e gráfico, respectivamente, referentes ao número de filhotes por mãe que foram comparados entre os grupos; D, E e F são fotografias e gráfico, respectivamente, referentes à porcentagem de filhotes machos e fêmeas por mãe que foram comparados entre os grupos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação a quantidade de filhotes ($p = 0,9956$) e em relação a sexagem ($p = 0,8406$) (Anova One-Way com pós-teste de Bonferroni).

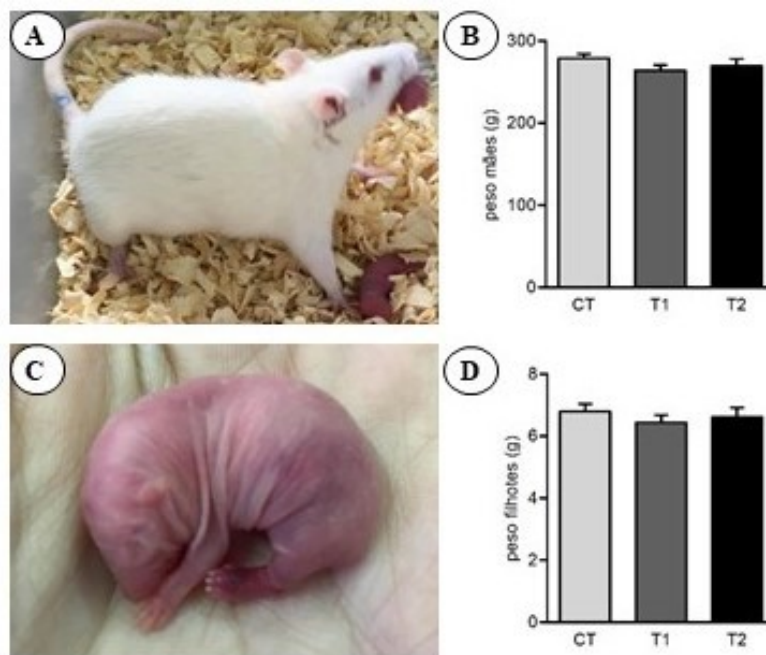


Figura 3. A e B são fotografia e gráfico, respectivamente, referentes aos pesos das mães que foram comparados entre os grupos; C e D são fotografia e gráfico, respectivamente, referentes aos pesos dos filhotes que foram comparados entre os grupos. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação ao peso das mães ($p = 0,3288$) e dos filhotes ($p = 0,6277$) (Anova One-Way com pós-teste de Bonferroni).

5.2. Anatomia normal do encéfalo de filhotes após tratamento com Alprazolam na gestação

O encéfalo de ratos saudáveis é formado por cérebro, cerebelo e tronco encefálico, apresentando coloração esbranquiçada e livre de áreas necróticas. Os encéfalos obtidos dos animais de ambos os grupos (**Figura 4**) apresentaram todas as características macroscópicas de um encéfalo saudável.



Figura 4. Fotografia do encéfalo dos filhotes de ratas tratadas com Alprazolam mostrando a ausência de alteração.

5.3. O tratamento durante a gestação com Alprazolam parece influenciar na maior presença de células de menor área no cerebelo

As **Figuras 5 e 6** apresenta as análises feitas nas regiões do cerebelo e bulbo olfatório, respectivamente, localizados microscopicamente com o auxílio do mapa PAXINOS & WATSON (1997). Ambas as regiões apresentando densidade (aumento de 40x) e área celular (aumento de 100x) sendo comparada entre os grupos de estudo (CT, T1 e T2). Em relação ao cerebelo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à densidade celular ($p = 0,7546$), mas em relação à área celular observou-se que células de menor área estavam mais presentes nos grupos tratados em relação ao grupo controle, sendo essas estatisticamente significativas ($p = 0,0135$). Em relação ao bulbo olfatório não foram observadas diferenças estatisticamente significativas tanto em relação à densidade celular ($p = 0,4909$) quanto à área celular ($p = 0,3925$).

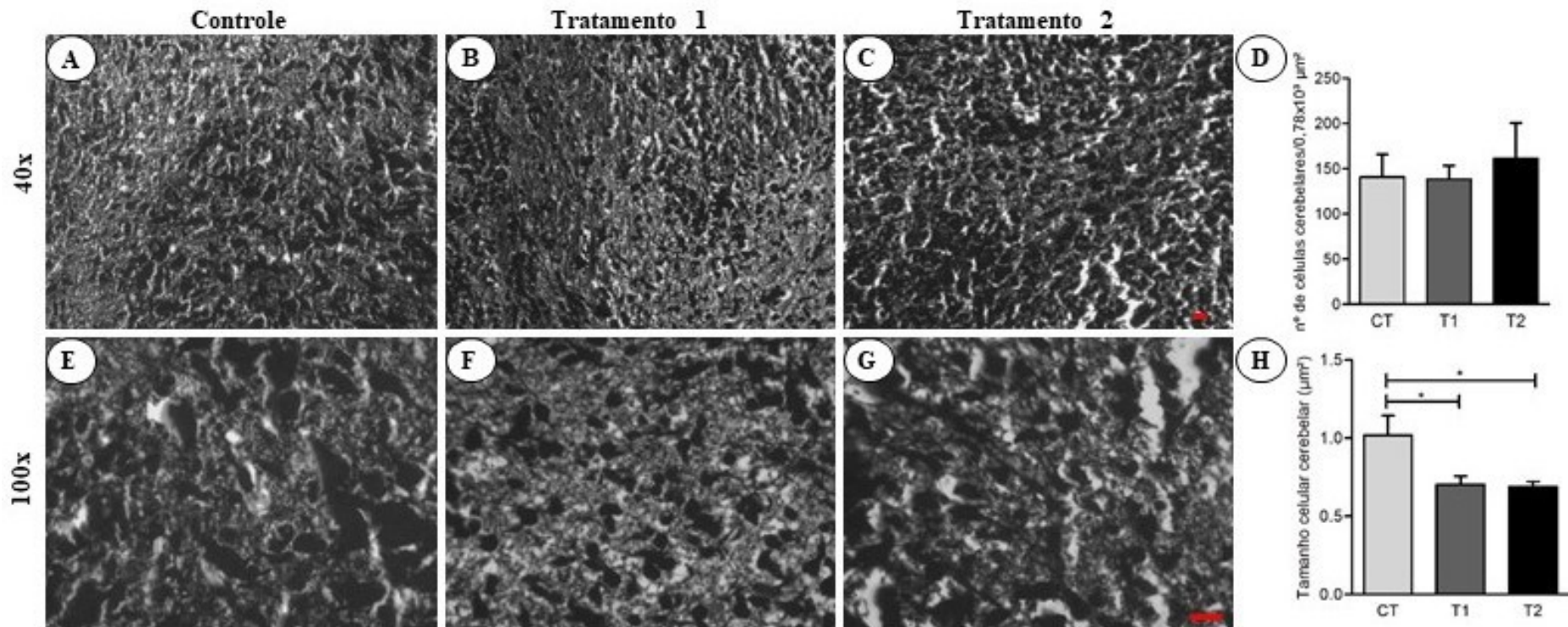


Figura 5. A, B e C são fotomicrografias de 40x de aumento e E, F e G de aumento de 100x do cerebelo de ratos Wistar. Sendo A e E referentes ao grupo controle; B e F ao grupo tratamento 1 (1,25 mg); C e G ao grupo tratamento 2 (30 mg). D é o gráfico de médias que compara a densidade de células neurais entre os grupos. E H é o gráfico de médias que compara a área de células neurais entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos em relação a densidade celular ($p = 0,7546$), mas houve uma maior presença de células menores nos dos grupos T1 e T2 quando comparadas ao controle, estatisticamente significativos ($p = 0,0135$) (testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney). Escala = 1 μm.

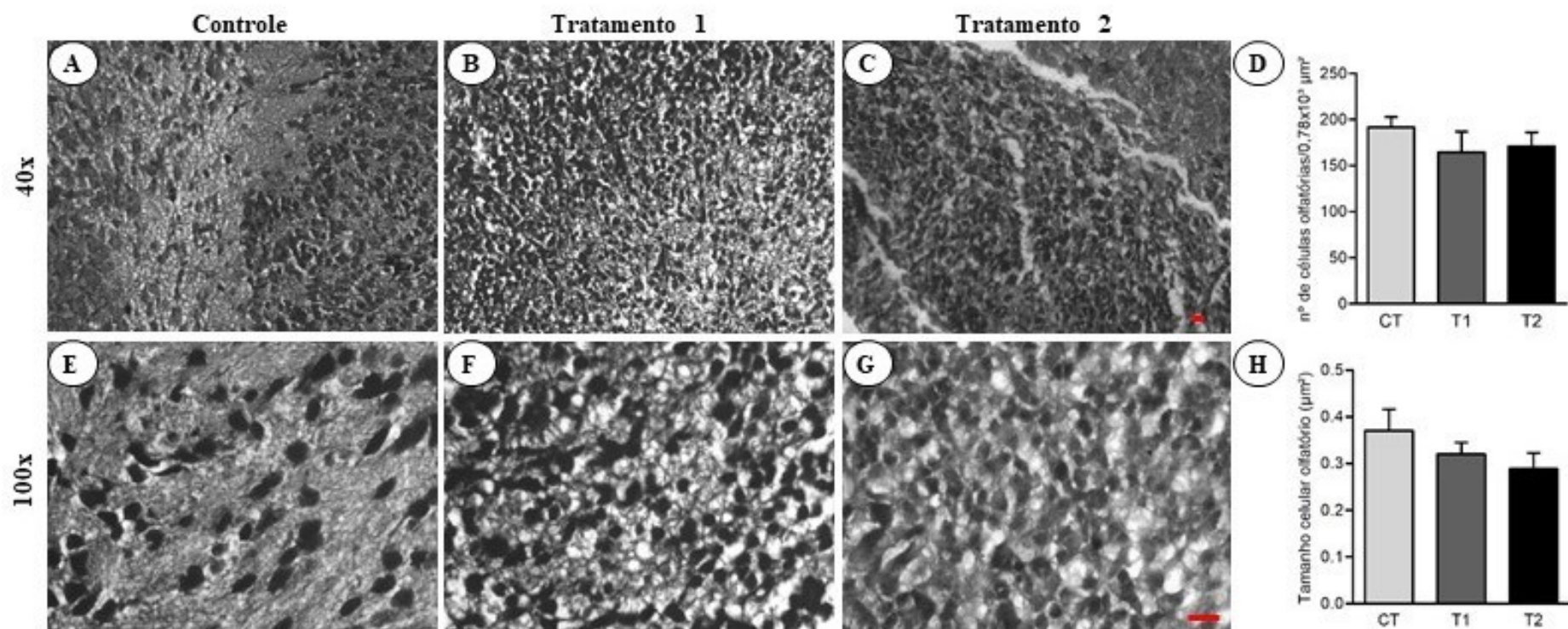


Figura 6. A, B e C são fotomicrografias 40x de aumento e E, F e G de aumento de 100x do bulbo olfatório de ratos Wistar. Sendo A e E referentes ao grupo controle; B e F ao grupo tratamento 1 (1,25 mg); C e G ao grupo tratamento 2 (30 mg). D é o gráfico de médias que compara a densidade de células neurais entre os grupos. E H é o gráfico de médias que compara a área de células neurais entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos em relação a densidade celular ($p = 0,4909$), e em relação a área celular ($p = 0,3925$) (testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney). Escala = 1 μm .

5.4. O estudo da expressão proteica indicou aumento de microglia e elevação do fator de transcrição NF- κ B p65 no cerebelo de filhotes de mães tratadas com Alprazolam

A **Figura 7 e 8** apresentam as quantificações de bandas imunorreativas do extrato proteico feitas por imunoblotting nas regiões do cerebelo e do bulbo olfatório, respectivamente.

Na **Figura 7** foram marcadas proteínas específicas na região do cerebelo, utilizando anticorpos anti-sinaptofisina, anti-neurofilamento, anti-GFAP, anti-Iba-1, e anti-NF- κ B p65, para verificação de gliose, densidade sináptica e neuroinflamação, sendo comparada entre os grupos CT, T1 e T2. Pudemos observar um aumento na expressão de Iba-1 ($p = 0,0334$) e NF- κ B p65 ($p = 0,0098$) no grupo T1 quando comparado com CT, estatisticamente significativas.

Na **Figura 8** foram marcadas proteínas específicas na região do bulbo olfatório, utilizando anticorpos anti-sinaptofisina, anti-neurofilamento, anti-GFAP, anti-Iba-1, anti-NF- κ B p65 e anti-IL-1, para verificação de gliose, densidade sináptica e neuroinflamação, sendo comparada entre os grupos CT, T1 e T2. Não sendo observadas nenhuma diferença estatisticamente significativa nessa região.

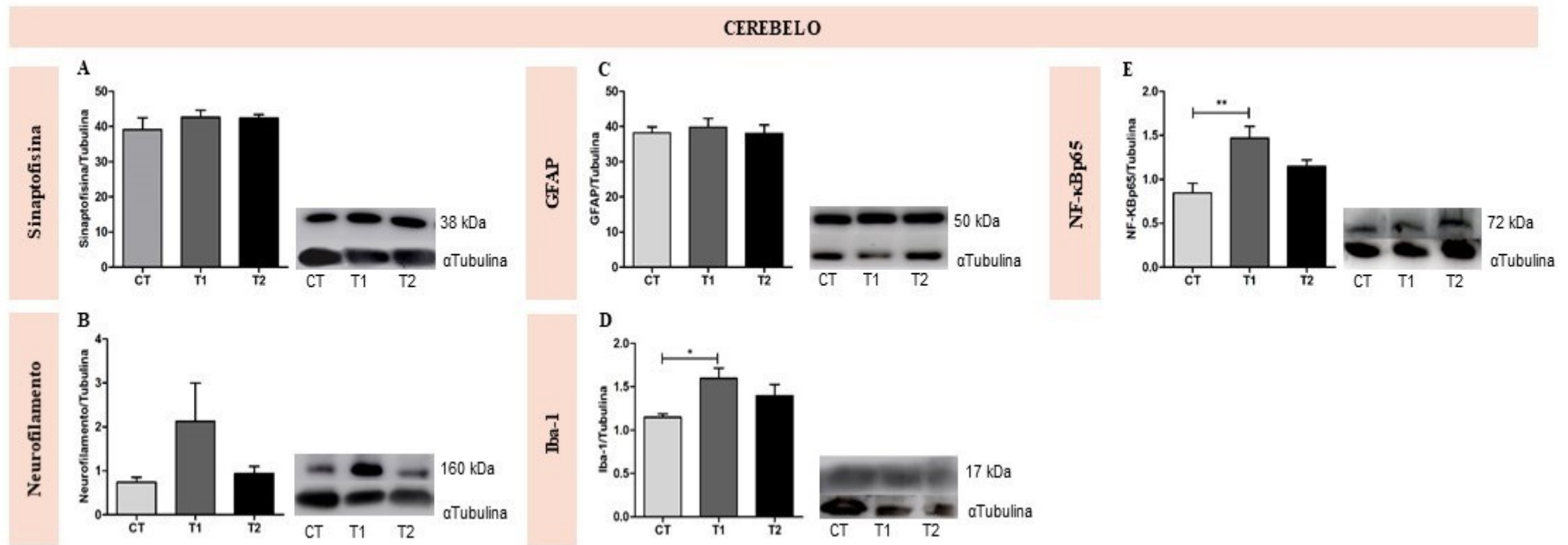


Figura 7. Bandas relativas de imunoblotting de extrato proteico do cerebelo com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) e erro padrão para as proteínas Sinaptofisina (A), Neurofilamento (B), GFAP (C), Iba-1 (D) e NF- κ B p65 (E). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2). Não houve diferenças entre os grupos em relação a Sinaptofisina ($p = 0,5163$), Neurofilamento ($p = 0,1662$) e GFAP ($p = 0,9099$), mas houve diferença entre os grupos CT e T1 em relação a Iba-1 ($p = 0,0334$) e a NF- κ B p65 ($p = 0,0098$), estatisticamente significativas (testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney).

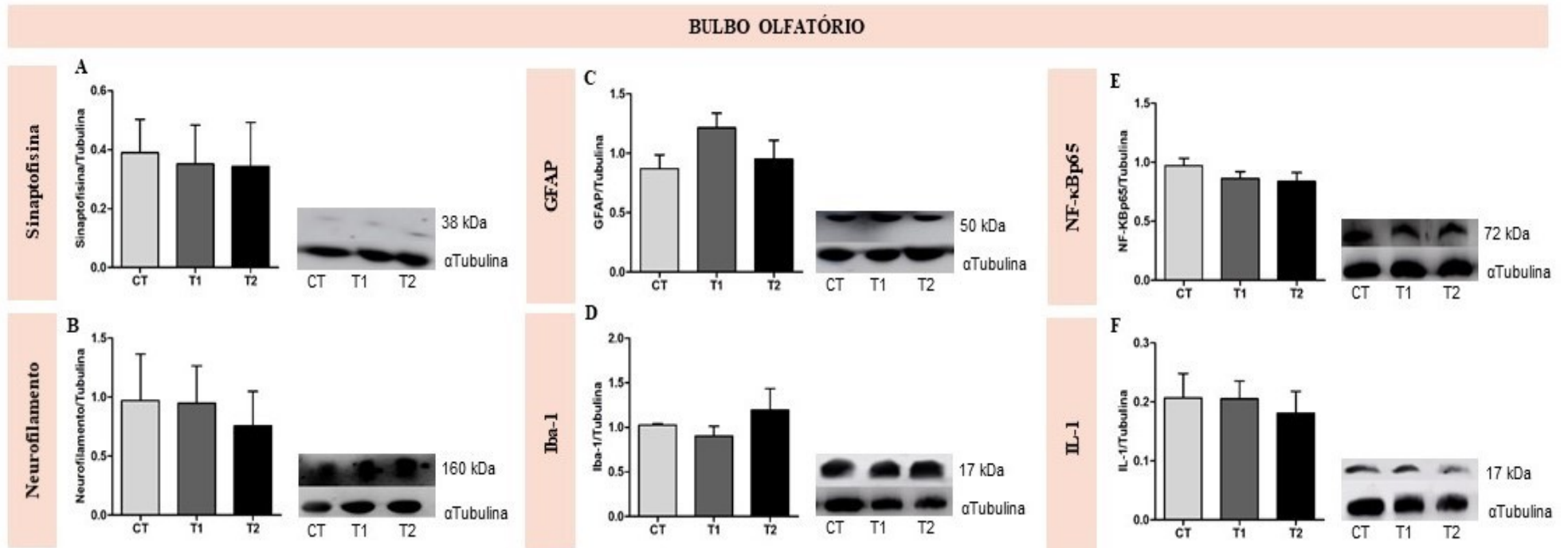


Figura 8. Bandas reativas de imunoblotting de extrato proteico do bulbo olfatório com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) e erro padrão para as proteínas Sinaptofisina (A), Neurofilamento (B), GFAP (C), Iba-1 (D), NF- κ B p65 (E) e IL-1 (F). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2). Não houve diferenças entre os grupos em relação a todas proteínas, Sinaptofisina ($p = 0,9099$), Neurofilamento ($p = 0,9099$), GFAP ($p = 0,1376$), Iba-1 ($p = 0,4274$), NF- κ B p65 ($p = 0,4274$) e a IL-1 ($p = 0,2929$) (testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney).

5.5. O tratamento com Alprazolam influencia alguns aspectos do balanço redox no cerebelo e no bulbo olfatório

A **Figura 9** apresenta as quantificações das análises do balanço redox nas regiões do cerebelo e do bulbo olfatório. Sendo medidas a atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP), os indicadores de estresse oxidativo pela análise da peroxidação lipídica (TBARS), as proteínas carboniladas e os níveis de glutathiona (GSH e GSSG) nas amostras de proteínas totais, sendo comparada entre os grupos CT, T1 e T2.

Nas **Figuras 9B e 9F** pudemos observar um aumento nos níveis de peroxidação lipídica nos grupos T2 quando comparado ao T1 no cerebelo ($p = 0,0111$) e no bulbo olfatório ($p = 0,0007$), mostrando que a overdose favoreceu significativamente a peroxidação lipídica, que acarretou alterações na estrutura e permeabilidade das membranas celulares acarretando perdas de seletividade nas trocas iônicas e liberação de conteúdo das organelas, com formação de produtos citotóxicos, como radicais livres, podendo ocasionar morte celular. A **Figura 9C** mostrou um aumento nos níveis de proteínas carboniladas no grupo T1 quando comparado ao CT no cerebelo ($p = 0,0074$), mostrando que o tratamento favoreceu significativamente o aumento nos níveis das proteínas carboniladas que também podem resultar em danos teciduais.

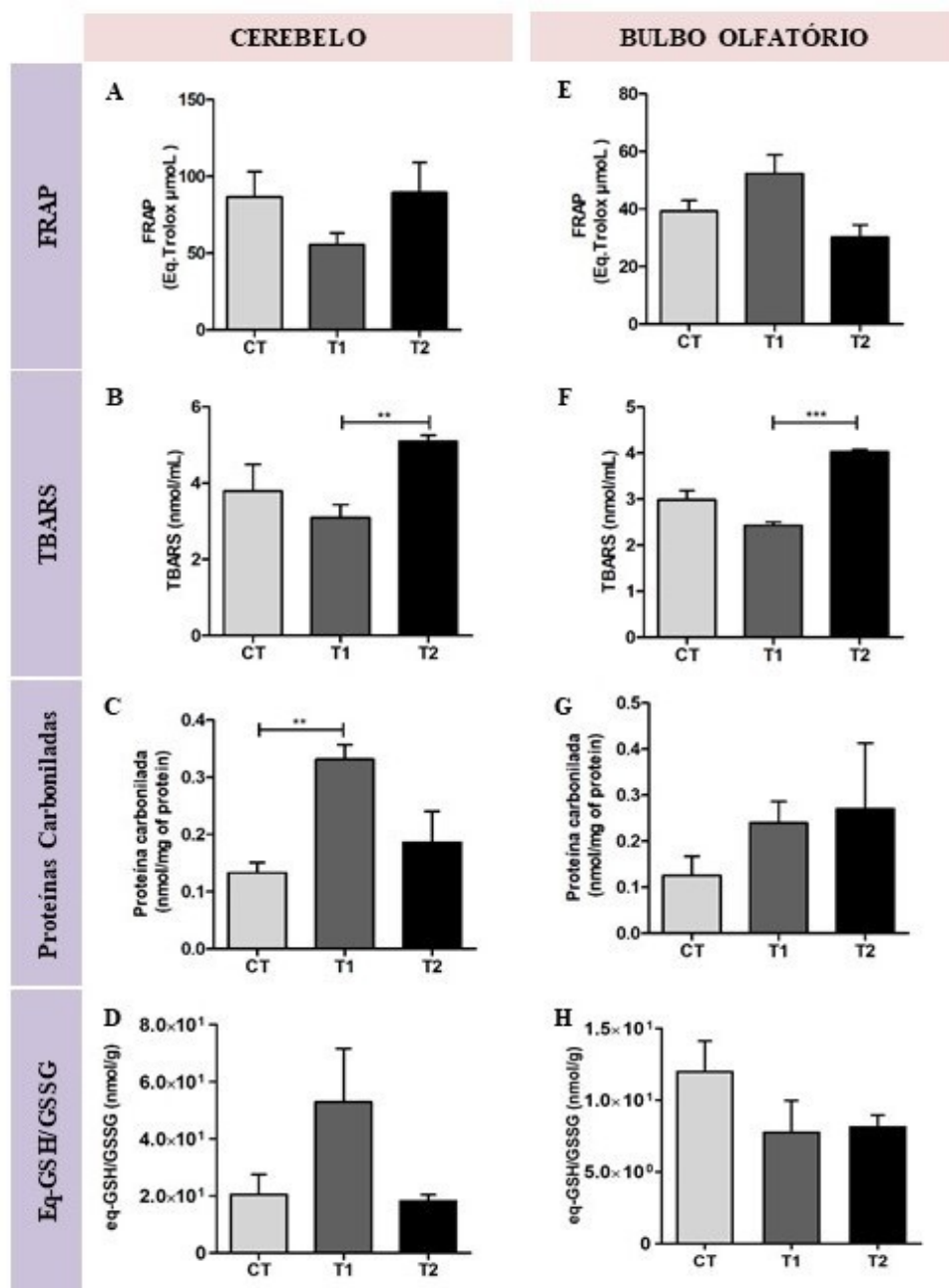


Figura 9. Avaliação do balanço redox do cerebelo (coluna à esquerda) e bulbo olfatório (coluna à direita) com gráficos representando média e erro padrão das medições de atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP) (A e E), peroxidação lipídica (B e F), proteínas carboniladas (C e G), e a razão dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) (D e H). CT (controle), T1 (tratamento 1) e T2 (tratamento 2). Em relação a FRAP não houve diferenças no cerebelo ($p = 0,4658$) e no bulbo olfatório ($p = 0,1394$); em relação a peroxidação lipídica houve diferenças entre os grupos T1 e T2 no cerebelo ($p = 0,0111$) e no bulbo olfatório ($p = 0,0007$); em relação a proteínas carboniladas houve diferenças entre os grupos CT e T1 no cerebelo ($p = 0,0074$), mas não no bulbo olfatório ($p = 0,2929$); e em relação a razão dos níveis de glutatona reduzida e oxidada eq-GSH/GSSG não houve diferenças no cerebelo ($p = 0,7473$) e no bulbo olfatório ($p = 0,3088$), (testes não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn ou U de Mann Whitney).

6. DISCUSSÃO

A reação de ansiedade é compreendida como a resposta dos organismos a qualquer ameaça à sua integridade, que visa garantir a sobrevivência e a adaptação às mudanças do meio ambiente. No entanto, quando desproporcionais, essas reações se tornam patológicas e resultam no surgimento de doenças para as quais o indivíduo tenha predisposição genética (CASTILLO et al., 2000). A resposta ao evento estressor demanda aspectos fisiológicos, cognitivos e comportamentais, para percepção da situação, processamento rápido e busca de soluções, que pode desencadear um efeito desorganizador quando em excesso (OLIVEIRA & DO AMARAL, 2019).

Os ansiolíticos, como o Alprazolam, são os medicamentos prescritos para o tratamento dos quadros de ansiedade durante a gestação, cujo composto principal é denominado benzodiazepínico (BZD). Seu consumo crônico leva a uma ação diminuída e a efeitos adversos aumentados. Sendo o BZD um agente capaz de permear a placenta e ser excretado no leite materno, ele pode ser tóxico ao feto podendo ocasionar morte intrauterina, malformações morfológicas e problemas neurocomportamentais (NUNES et al., 2015).

Tendo em vista que o Alprazolam é um agonista GABAérgico, agindo nos receptores GABA-A (DE ALMEIDA, 2015), e, sendo o cerebelo e o bulbo olfatório regiões encefálicas de grande densidade desses receptores (GUEDES, 2008), nosso estudo focou em encontrar alterações morfológicas e celulares nessas regiões do SNC de neonatos de ratas tratadas com o BZD Alprazolam durante a gestação. Também fizemos algumas análises gerais como a quantidade de filhotes e o sexo desses, peso corporal tanto da mãe quanto dos filhotes gerados. Esses dados gerais contaram com um número de indivíduos superior às análises do tecido nervoso, uma vez que a totalidade de filhotes por grupo foi dividida entre pesquisadores cuja especialidade de estudo poderia abordar diferentes tecidos, dessa maneira, ao nosso grupo, cuja especialidade é a análise do Sistema Nervoso, foi reservada a quantidade de um animal por ninhada, resultando num total de oito indivíduos em cada grupo (CT, T1 e T2) para as análises do tecido nervoso.

Os resultados obtidos após os experimentos realizados mostraram que o tratamento com Alprazolam durante a gestação não influenciou a quantidade e sexagem dos filhotes ou o peso corporal das mães e dos filhotes.

Nenhum dado da literatura consultada apontou qualquer interferência na resolução do sexo do feto com o uso de BZDs, estando de acordo com nossos resultados. O número de filhotes também não foi afetado pelos tratamentos com Alprazolam em nosso trabalho, apesar de possuir potencial efeito letal ao feto em algumas situações já descritas (OGAWA, TAKESHIMA & FURUKAWA, 2018; DE ABREU TACON, DO AMARAL & TACON, 2017).

Em relação ao peso corporal, embora a bula do remédio Frontal® indique que uma das reações comuns dos pacientes que utilizam esse medicamento seja a perda ou ganho de peso, nossos resultados não identificaram alteração no peso entre os grupos tratados e controle tanto para mães quanto para os filhotes.

Os BZDs quando empregados por tempo prolongado durante a gravidez podem afetar o neonato devido ao seu potencial teratogênico neurocomportamental, bem como promover sintomas de abstinência no recém-nascido (BALDISSERA, DE FÁTIMA COLET & MOREIRA, 2010). Sabendo que o Alprazolam atravessa a placenta, os pesquisadores IQBAL, SOBHAN & RYALS (2002) fizeram um levantamento de estudos prospectivos que avaliaram gestantes expostas ao Alprazolam durante o primeiro trimestre de gravidez para monitorar sinais precoces de potenciais riscos para o feto, e assim alguns desses estudos não observaram nenhum padrão de defeito, anomalia congênita ou aborto espontâneo entre os bebês expostos ao medicamento no primeiro trimestre, enquanto outros encontraram associações do consumo de Alprazolam pelas mães e presença de malformações congênitas nos fetos, incluindo lábio leporino unilateral, hipospádia (abertura da uretra em localização anormal), luxação congênita do quadril, hérnia inguinal, ducto lacrimal fundido, microcefalia, estrabismo, síndrome de Down, estenose pilórica, hérnia umbilical, inversão de tornozelo, síndrome de abstinência neonatal, letargia, sedação e perda de peso. No entanto, segundo os autores IQBAL, SOBHAN & RYALS (2002), esses dados não suportam uma associação clara entre o uso do Alprazolam e defeitos congênitos, mas sugerem que o mais prudente seria evitar o seu consumo durante a gravidez e lactação.

Outros pesquisadores também apontaram a relação entre o consumo de Alprazolam e o baixo peso ao nascer e a pequena circunferência da cabeça em 17 crianças nascidas de mulheres que tomaram o BDZ durante a gestação. O peso dessas crianças havia normalizado em dez meses, mas a circunferência da cabeça ainda era menor do que o esperado aos 18 meses de vida (LAEGREID, HAGBERG & LUNDBERG, 1992). Outro trabalho também

associou de maneira significativa o uso de BZDs por gestantes com aumento dos riscos de nascimentos pré-termos (<37 semanas) e o baixo peso ao nascer (OGAWA, TAKESHIMA & FURUKAWA, 2018). Corroborando com a pesquisa de CALDERON-MARGALIT et al. (2009) que concluíram que o uso materno de BZDs está associado a um risco aumentado de parto prematuro, baixo peso ao nascer, baixo Índice de Apgar, internação em unidade de terapia intensiva neonatal e síndrome do desconforto respiratório. Por outro lado, um estudo analisou 460 mulheres que relataram exposição ao fármaco antes ou durante a gestação que apresentaram 3,1% de incidência de doenças congênitas, o que não diferiu das 424 gestações controle, que tiveram 2,6% de incidência de anomalias congênitas. Logo, concluíram que o uso de BZDs durante a gravidez pode não ser uma causa suficiente ou necessária à incidência de defeitos congênitos (ORNOY et al., 1998).

Com o apresentado, é evidente que não existe consenso na literatura científica quanto a associação entre o uso de BZDs durante a gestação e o aumento de anomalias congênitas ou abortos espontâneos ou outras sequelas para o feto. Nesse contexto, nosso estudo vem contribuir para melhores evidências que possam embasar o uso ou não do fármaco durante a gestação.

Para tanto, nossa primeira análise do Sistema Nervoso foi uma análise qualitativa macroscópica em relação ao padrão de normalidade dos encéfalos dos filhotes dos três grupos. Considerando-se um encéfalo saudável aqueles que apresentaram dois hemisférios cerebrais de tamanhos semelhantes, presença de cerebelo e tronco encefálico, coloração esbranquiçada e sem áreas de necrose. Nesse sentido, observamos que todos os encéfalos (n=8 por grupo) permaneceram normais após o tratamento com o Alprazolam durante a gestação.

Ao analisarmos a microscopia e a expressão proteica das áreas selecionadas para o estudo, notou-se que o tratamento durante a gestação influenciou na maior presença de células menores no cerebelo dos filhotes, e, ainda no cerebelo, notou-se aumento na expressão de Iba-1 e NF- κ Bp65, sendo um indicativo de microgliose. Enquanto o bulbo olfatório não apresentou alterações morfológicas e nem na expressão proteica.

Para a microscopia realizamos a coloração de Nissl nas lâminas, que é um método citoquímico utilizado para estudo da morfologia e patologia do tecido neural (KÁDÁR et al., 2009). Com ele foi possível quantificar o número e a área de células neurais inespecíficas (neurônios e glia) presentes no cerebelo e bulbo olfatório, nos diferentes grupos. Observamos

que no cerebelo a quantidade de células se manteve semelhante nos diferentes grupos, sem indícios de proliferação ou morte celular induzida pelo tratamento, mas apresentou maior quantidade de células menores em ambos os grupos que receberam o tratamento. O bulbo olfatório não apresentou diferenças em relação à morfologia, tanto em densidade quanto em área celular.

As análises de expressão proteica por Western blotting tiveram como objetivo estudar as respostas celulares em relação a densidade de sinapses (sinaptofisina) e axônios (neurofilamento), da reatividade dos astrócitos (GFAP) e da microglia (Iba-1), e, inflamação (NF- κ Bp65, IL-1). No cerebelo foi observado aumento da expressão de Iba-1 especialmente no grupo T1, caracterizando um aumento de microglia no tecido, o que pode explicar a maior presença de células de área reduzida como foi observado na análise morfológica do cerebelo, já que a microglia, em relação aos neurônios e astrócitos, possuem o menor tamanho.

Quando o tecido nervoso se encontra em um processo de perda de homeostase causada por eventos estressores, a microglia ou também denominada macrófago residente do SNC, sofre rápidas alterações na sua forma, expressão gênica e comportamento funcional, sendo definido como microgliose, na tentativa de restaurar a homeostase tecidual (KETTENMANN et al., 2011). Uma das características da microgliose, é o aumento da densidade microglial por hiperplasia e/ou hipertrofia, fornecendo um maior suporte para a defesa contra os agentes estressores. Adicionalmente ao processo de ativação, a microglia induz a liberação de múltiplos fatores pró-inflamatórios, imunorregulatórios e neurotróficos, além de efetuarem suas atividades fagocíticas (KIM et al., 2017; SCHAFER et al., 2012). Vimos no nosso trabalho que no cerebelo houve um aumento da expressão de NF- κ B p65, que é um dos fatores de transcrição reguladores de genes que codificam importantes proteínas envolvidas em processos de inflamação e imunidade, é bastante expresso pelas células da glia, especialmente a microglia (GLEZER et al., 2000). E, sobre essas células, também exerce papel regulador (SU et al., 2019).

Evidências apontaram que o NF- κ B está envolvido diretamente na função cerebral, após lesões ou condições neurodegenerativas, e, durante a própria neurogênese (O'NEILL & KALTSCHMIDT, 1997). Nesse sentido, a elevação dessa proteína pode influenciar aspectos importantes do tecido nervoso em desenvolvimento.

Além dos estímulos comuns que podem ativar o NF- κ B, como neurotransmissores, citocinas, proteínas neurotóxicas, tem que haver a participação de espécies reativas de

oxigênio (EROs) e o aumento de Ca^{2+} intracelular para que a ativação ocorra (SU et al., 2019). E, para analisarmos a produção de EROs também investigamos o balanço redox, e, dessa forma notou-se que o tratamento com Alprazolam aumentou os níveis de peroxidação lipídica e de proteínas carboniladas no cerebelo, sendo indicativo de estresse oxidativo, que pode acarretar danos moleculares às estruturas celulares, com consequentes alterações funcionais e perda de funções vitais em vários tecidos (VALKO et al., 2007).

O tecido nervoso é mais sensível a danos oxidativos, e os resultados de EGER et al. (2016) mostraram, de forma semelhante aos nossos resultados, que o diazepam (outro BZD) aumentou os níveis de marcadores proteicos de estresse oxidativo no cerebelo, córtex cerebral e hipocampo de ratos. O diazepam induziu a peroxidação lipídica, sendo uma das principais consequências da lesão mediada por radicais livres no cérebro, e a carbonilação de proteínas, sendo o biomarcador mais utilizado para danos oxidativos às proteínas.

Interessantemente, as análises de expressão proteica do bulbo olfatório não apontaram qualquer alteração, por outro lado, na análise de balanço redox, apresentou uma maior degradação lipídica no grupo T2 quando comparado ao grupo T1, indicativo de presença de estresse oxidativo. Apesar disso, nenhuma alteração que indicasse qualquer outro dano ao bulbo foi diagnosticada. Nesse sentido, devemos lembrar que o bulbo olfatório de roedores se trata de uma área diferente, tendo capacidade de neurogênese mesmo no tecido maduro (KOHL et al., 2017; KETTENMANN et al., 2011).

O conjunto de nossos resultados demonstrou que o cerebelo apresentou maiores alterações morfológicas e moleculares quando comparado ao bulbo olfatório, mostrando ser um tecido mais sensível ao tratamento com Alprazolam durante o desenvolvimento do Sistema Nervoso. O cerebelo, uma região motora do SNC, apresenta neurônios grandes, com longos axônios, e, portanto, com maior necessidade metabólica o que o torna mais susceptível aos danos tóxicos e os que envolvam sobrecarga mitocondrial (BERNARD-MARISSAL et al., 2018). Não é apenas essa a diferença entre as duas regiões escolhidas para o presente estudo, a própria microglia de ambas as regiões pode apresentar comprometimento com funções diferentes. Recentemente, foi demonstrado que microglia apresenta uma heterogeneidade fenotípica em diferentes regiões do SNC de mamíferos, contribuindo para as diferentes respostas dessas células aos mesmos estímulos, sendo eles fisiológicos ou patológicos (SMOLDERS et al., 2019). No bulbo olfatório a microglia se caracteriza por serem células menores e mais abundantes, já no cerebelo encontramos essas células em menor

quantidade, mas de tamanho maior (TAN, YUAN & TIAN, 2019). Adicionalmente, a microglia pode contribuir para a proliferação celular em áreas neurogênicas, como o bulbo olfatório, por expressar marcadores de células-tronco (KOHL et al., 2017; KETTENMANN et al., 2011). Essas diferenças podem explicar, em parte, as diferentes respostas observadas em nosso trabalho.

Mesmo que tenhamos observado alterações, e, essas mais presentes no cerebelo, os resultados apontam que o tratamento com Alprazolam durante a gestação é capaz de influenciar a atividade celular da microglia, e, com isso, possivelmente, ativar mecanismos inflamatórios no cérebro em desenvolvimento. Apesar de não conhecermos o impacto dessas alterações em uma fase de maturidade do tecido ou até mesmo no seu envelhecimento, o nosso estudo reafirma o cuidado com o uso de benzodiazepínicos por gestantes em qualquer etapa da gestação, evitando assim possíveis riscos fetais.

A limitação foi o baixo número de indivíduos por grupo, que influenciou em alguns dados numéricos, que apresentaram grandes desvios padrões, e, também não houve a possibilidade de mantermos um grupo para acompanhamento até a vida adulta, para análises de comportamento motor e sensitivo.

7. CONCLUSÃO

Diante de nossos achados concluímos que o cerebelo dos filhotes mostrou ser mais sensível ao tratamento realizada por suas mães com o Alprazolam durante a gestação, apresentando maior densidade de células menores, aumento na expressão de Iba-1 e NF- κ B p65, indicativos de microgliose, e um desequilíbrio no balanço redox, com maiores níveis de peroxidação lipídica e proteínas carboniladas, indicativos de presença de estresse oxidativo. Enquanto o bulbo olfatório mostrou ser mais resistente, apresentando um desequilíbrio no balanço redox, com maiores níveis de peroxidação lipídica.

Logo nossos resultados sugerem que o tratamento de gestantes com o Alprazolam pode estar relacionado com alterações morfológicas, inflamatórias e oxidativas no tecido nervoso, especificamente nas regiões de cerebelo e bulbo olfatório, dos seus filhotes. Não sabemos qual será o impacto dessas alterações em um tecido maduro, mas reafirmamos que deve haver um cuidado especial com a exposição aos BZDs em gerais durante as fases de gestação e lactação, evitando assim riscos de teratogenicidade fetal.

8. REFERÊNCIAS

- 1) ANDREOLLO, N. A. et al. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202012000100011>
- 2) AUCHEWSKI, L. et al. Avaliação da orientação médica sobre os efeitos colaterais de benzodiazepínicos. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 26, n. 1, p. 24-31, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462004000100008>
- 3) BALDISSERA, F. G.; DE FÁTIMA COLET, C.; MOREIRA, A. C. Uso Irracional de Benzodiazepínicos: Uma Revisão. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 19, p. 112-116, 2010.
- 4) BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- 5) BERNARD-MARISSAL, N.; CHRAST, R.; SCHNEIDER, B. L. Endoplasmic reticulum and mitochondria in diseases of motor and sensory neurons: a broken relationship? **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 1-16, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0125-1>
- 6) BERNIK, M. A.; SOARES, M. B.; SOARES, C. N. Benzodiazepines: patterns of use, tolerance and dependence. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 48, n. 1, p. 131-137, 1990. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X1990000100020>
- 7) BLAYA, C. et al. Diretrizes para o uso de psicofármacos durante a gestação e lactação. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- 8) BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- 9) BUEGE, J. A.; AUST, S. D. [30] Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1978. p. 302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- 10) CALDERON-MARGALIT, R. et al. Risk of preterm delivery and other adverse perinatal outcomes in relation to maternal use of psychotropic medications during pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 201, n. 6, p. 579, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2009.06.061>
- 11) CAMACHO, R. S. et al. Transtornos psiquiátricos na gestação e no puerpério: classificação, diagnóstico e tratamento. **Archives of Clinical Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 92-102, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-60832006000200009>

- 12) CASTILLO, A. R. G. L. et al. Transtornos de ansiedade. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, p. 20-23, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000600006>
- 13) CENTRO BRASILEIRO DE INFORMAÇÃO DE MEDICAMENTOS PSICOTRÓPICOS (CEBRID) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP). **Haja ansiedade. Haja insônia.** Disponível em: (https://www2.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/quest_drogas/ansioliticos.htm) Acesso em: 23 jul. 2019.
- 14) CHILD, K. M. et al. The neurodegenerative capacity of olfactory stem cells is not limitless: implications for aging. **Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 31, p. 6806-6824, 2018. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3261-17.2018>
- 15) DE ABREU TACON, F. S.; DO AMARAL, W. N.; TACON, K. C. B. Medicamentos e gravidez: Influência na morfologia fetal. **Revista Educação em Saúde**, v. 5, n. 2, p. 105-111, 2017. <https://doi.org/10.29237/2358-9868.2017v5i2.p105-111>
- 16) DE ALMEIDA, M. S. da S. **Benzodiazepinas: da terapêutica ao abuso e dependência.** 72p. Dissertação de Mestrado, Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2015.
- 17) DE AZEVEDO, A. P.; ALÓE, F.; HASAN, R. Hipnóticos. **Revista Neurociências**, v. 12, n. 4, p. 198-208, 2004.
- 18) DE OLIVEIRA, J. D. L.; MOTA, L. A.; CASTRO, G. F. P. Uso Indiscriminado dos Benzodiazepínicos: a contribuição do farmacêutico para um uso consciente. **Revista Transformar**, n. 7, p. 214-226, 2015.
- 19) EGER, G. A. et al. Acute administration of diazepam provokes redox homeostasis imbalance in the rat brain: prevention by simvastatin. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 30, n. 10, p. 506-512, 2016. <https://doi.org/10.1002/jbt.21815>
- 20) FIELDS, R.; DIXON, H. B. F. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2, 4-dinitrophenylhydrazine. **Biochemical Journal**, v. 121, n. 4, p. 587-589, 1971. <https://doi.org/10.1042/bj1210587>
- 21) FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais.** Rio de Janeiro, 2008.
- 22) FONNUM, F.; LOCK, E. A. Cerebellum as a target for toxic substances. **Toxicology letters**, v. 112, p. 9-16, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(99\)00246-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(99)00246-5)
- 23) FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE jornal português de gastroenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>

- 24) Frontal: alprazolam. Edina S. M. Nakamura. São Paulo: Pfizer. Bula de remédio.
- 25) GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF- κ B nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Revista Brasileira Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 26-30, 2000. <https://doi.org/10.1590/S1516-44462000000100008>
- 26) GLICKSTEIN, M.; STRATA, P.; VOOGD, J. Cerebellum history. **Neuroscience**, v. 162, n. 3, p. 549-559, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.02.054>
- 27) GRALLERT, S. R. M.; TAVARES, L. C.; DE ARAÚJO, E. B. Radioligantes para neurorreceptores benzodiazepínicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 243-257, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322003000300004>
- 28) GUEDES, J. M. F. S. **Consumo de Benzodiazepinas em Portugal**. 75p. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, 2008.
- 29) IQBAL, M. M.; SOBHAN, T.; RYALS, T. Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate, and the nursing infant. **Psychiatric Services**, v. 53, n. 1, p. 39-49, 2002. <https://doi.org/10.1176/appi.ps.53.1.39>
- 30) JABLENSKY, A. V. et al. Pregnancy, delivery, and neonatal complications in a population cohort of women with schizophrenia and major affective disorders. **American Journal of Psychiatry**, v. 162, n. 1, p. 79-91, 2005. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.1.79>
- 31) JONES, Dean P. [11] Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 2002. p. 93-112. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)48630-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)48630-2)
- 32) KÁDÁR, A. et al. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. **Journal of neuroscience methods**, v. 184, n. 1, p. 115-118, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.07.010>
- 33) KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- 34) KIM, H. J. et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. **Molecular psychiatry**, v. 22, n. 11, p. 1576, 2017. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.103>
- 35) KOHL, Z. et al. Distinct pattern of microgliosis in the olfactory bulb of neurodegenerative proteinopathies. **Neural plasticity**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3851262>

- 36) LAEGREID, L.; HAGBERG, G.; LUNDBERG, A. The effect of benzodiazepines on the fetus and the newborn. **Neuropediatrics**, v. 23, n. 01, p. 18-23, 1992. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1071305>
- 37) LAMEH, J. et al. Unraveling the identity of benzodiazepine binding sites in rat hippocampus and olfactory bulb. **European journal of pharmacology**, v. 400, n. 2-3, p. 167-176, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(00\)00398-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(00)00398-8)
- 38) LEVINE, R. L. et al. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1994. p. 346-357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- 39) LEVINE, R. L. et al. [49] Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 464-478. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
- 40) LUCCHESI, R. et al. Fatores associados à probabilidade de transtorno mental comum em gestante: estudo transversal. **Escola Anna Nery**, v. 21, n. 3, 2017.
- 41) LUCCHETTA, R. C.; DA MATA, B. P. M.; MASTROIANNI, P. C. Association between Development of Dementia and Use of Benzodiazepines: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pharmacotherapy**, v.38, n.10, p.1010-1020, 2018. <https://doi.org/10.1002/phar.2170>
- 42) MATTE, T. S.; PLETSCHE, M. U. **Abordagem sobre o uso irracional de benzodiazepínicos no Brasil**. 5p. Relatório técnico-científico. Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul/Unijuí, 2014.
- 43) MENGUE, S. S. et al. Pesquisa Nacional sobre Acesso, Utilização e Promoção do Uso Racional de Medicamentos (PNAUM): métodos do inquérito domiciliar. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, n. 2, p. 1s-13s, 2016.
- 44) MENNERICK, S.; ZORUMSKI, C. F. Neural activity and survival in the developing nervous system. **Molecular neurobiology**, v. 22, n. 1-3, p. 41-54, 2000. <https://doi.org/10.1385/MN:22:1-3:041>
- 45) MUSAVI, S.; KAKKAR, P. Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 178, n. 1-2, p. 41-46, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1006834706117>
- 46) NUNES, A. M. et al. A utilização de medicamentos por gestantes em um Hospital da região sul catarinense: caracterização e avaliação dos riscos envolvidos. **Revista Ciência & Cidadania**, v. 1, n. 1, 2015.

- 47) NUNES, B. S.; BASTOS, F. M. Efeitos colaterais atribuídos ao uso indevido e prolongado de benzodiazepínicos. **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 2, p. 71-82, 2016.
- 48) OGAWA, Y.; TAKESHIMA, N.; FURUKAWA, T. A. Maternal exposure to benzodiazepine and risk of preterm birth and low birth weight: A case-control study using a claims database in Japan. **Asia-Pacific Psychiatry**, v. 10, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.1111/appy.12309>
- 49) OLIVEIRA, C. J. R.; DO AMARAL, F. Estresse, ansiedade e aromaterapia: Pelo olhar da Osmologia, ciência do olfato e do odor. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 92, 2019. <https://doi.org/10.31415/bjns.v2i2.57>
- 50) OLNEY, J. W. et al. Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. **Brain Pathology**, v. 12, n. 4, p. 488-498, 2002. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00467.x>
- 51) OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Relatório Mundial de Saúde: Saúde Mental, Nova Conceção, Nova Esperança. 2002.
- 52) O'NEILL, L. A. J.; KALTSCHMIDT, C. NF-kB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends in neurosciences**, v. 20, n. 6, p. 252-258, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)01035-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)01035-1)
- 53) ORNOY, A. et al. Is benzodiazepine use during pregnancy really teratogenic? **Reproductive Toxicology**, v. 12, n. 5, p. 511-515, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(98)00035-5)
- 54) PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 1998.
- 55) PHEULA, G. F.; BANZANATO, C. E. M.; DALGALARRONDO, P. Mania e gravidez: implicações para o tratamento farmacológico e proposta de manejo. **J Bras Psiquiatr**, v. 52, n. 2, p. 97-107, 2003.
- 56) RAM, D.; GANDOTRA, S. Antidepressants, anxiolytics, and hypnotics in pregnancy and lactation. **Indian journal of psychiatry**, v. 57, n. Suppl 2, p. S354, 2015. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.161504>
- 57) RAMOS, W. L. P. et al. Análise do uso de medicamentos durante a gestação em mães de pacientes portadores de malformações fetais. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 59-64, 2008.
- 58) RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. **Journal of statistical modeling and analytics**, v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.

- 59) REZNICK, A. Z.; PACKER, L. [38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1994. p. 357-363. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)
- 60) SEDGWICK, C. J. **Allometrically scaling the data base for vital sign assessment used in general anesthesia of zoological species**. In: The american association of zoo veterinarians annual conference, 1991, Calgary. Proceedings. Florida: American Association of Zoo Veterinarians, 1991. p.360-369.
- 61) SCHAFER, D. P. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 691-705, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- 62) SHAHZAD, N. et al. Interactions of atenolol with alprazolam/escitalopram on anxiety, depression and oxidative stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 79-84, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.12.015>
- 63) SILVA, S. F. **Uso de psicofármacos durante a gravidez e lactação: uma revisão bibliográfica**. 30p. Trabalho de Conclusão de Curso, Especialização em Linhas de Cuidado em Atenção Psicossocial, UFSC, 2014.
- 64) SMOLDERS, S. M. et al. Microglia: Brain cells on the move. **Progress in neurobiology**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.04.001>
- 65) SU, J. et al. Fucoxanthin, a marine xanthophyll isolated from *Conticribra weissflogii* ND-8: preventive anti-inflammatory effect in a mouse model of sepsis. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 906, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00906>
- 66) TAN, Y.; YUAN, Y.; TIAN, L. Microglial regional heterogeneity and its role in the brain. **Molecular psychiatry**, p. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0609-8>
- 67) TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normality of variables: diagnosis methods and comparison of some nonparametric tests by simulation. **Rev HCPA**, v. 32, n. 2, 2012.
- 68) URREA-VICTORIA, V. et al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, p. 1-6, 2016.
- 69) VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>

70) VOSSEN, M.; HAGE, J. J.; KARIM, R. B. Formulation of trichloroacetic acid peeling solution: a bibliometric analysis. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 105, n. 3, p. 1088-1094, 2000. <https://doi.org/10.1097/00006534-200003000-00038>

71) WALLAUER, M. M. **Efeitos do etanol e do tabaco no cerebelo de ratos Wistar**. 77p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2016.

72) YATES, T.; CATRIL, P. Tendencias en la utilización de benzodiazepinas en farmacia privada. **Revista chilena de neuro-psiquiatría**, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2009. <https://doi.org/10.4067/S0717-92272009000100002>