

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

NATÁLIA FERREIRA SILVA

**Alterações do hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam
durante a gestação**

Uberlândia, MG

2021

NATÁLIA FERREIRA SILVA

**Alterações no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam
durante a gestação**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas (PPGBC) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Graciele Zanon

Uberlândia

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586a
2021

Silva, Natália Ferreira, 1995-
Alterações no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam durante a gestação [recurso eletrônico] / Natália Ferreira Silva. - 2021.

Orientadora: Renata Graciele Zanon.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5552>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU:576.3

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047



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 003/2021, do PPGBC				
Data:	15/07/2021	Hora de início:	9:00h	Hora de encerramento:	11:30h
Matrícula do Discente:	11912BCE004				
Nome do Discente:	Natália Ferreira Silva				
Título do Trabalho:	Alterações do hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam durante a gestação				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Mecanismo de Reparo e Plasticidade Tecidual				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Efeitos do alprazolam no desenvolvimento do Sistema Nervoso Sensorial e Motor da prole				

Reuniu-se de forma Virtual, pela Plataforma Google Meet, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professoras Doutoras: **Daniela Soares Razolli – USF**; **Ana Paula Espíndula – UFTM** e **Renata Graciele Zanon – UFU**, 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). Ultimada 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.

15/07/2021

SEI/UFU - 2909647 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



Documento assinado eletronicamente por Renata Graciele Zanon, Professor(a) do Magistério Superior, em 15/07/2021, às 12:13, 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 15/07/2021, às 12:14, 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 Daniela Soares Razolli, Usuário Externo, em 15/07/2021, às 12:22, 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 2909647 e o código CRC 0C2798D1.

Referência: Processo nº 23117.046479/2021-51

SEI nº 2909647

*Dedico essa dissertação a
minha avó, Zulmira (“in
memoriam”) e minha mãe Cássia,
que sempre estiveram comigo no
decorrer de toda a minha
caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer á Deus por ter propiciado todas as condições para que minha mãe e minha vó pudessem me proporcionar a oportunidade de estar em uma univesidade pública, tanto durante a graduação, como durante a pós-graduação, mesmo nos períodos mais difíceis. Grata à Ele, por demonstrar, durante toda a minha caminhada, que sou bem mais capaz do que imaginava ser.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Renata Graciele Zanon, que com muito carinho me acolheu no laboratório. Obrigada pela disposição, ensinamentos, conselhos, dedicação, paciência, amizade e pela confiança em mim depositada. Grata por ter acreditado em mim desde o início, por todos os “aceites” assinados. Eu não teria chegado até aqui sem as oportunidades que me proporcionou.

À minha vó (“*in memoriam*”) que se foi a pouco mais de um ano, mas que, ainda se faz tão presente na grande maioria dos momentos da minha vida! Durante meus 25 anos, ela esteve comigo. Me ensinou que para ser feliz, não precisamos necessariamente sair do lugar, a gente tem que ser o lugar. Ela assumiu a responsabilidade de educar em dobro, apoiar em dobro, dar amor e carinho em dobro. Foi isso e muito além do que se dá pra transcrever em palavras que fez com que eu me tornasse quem sou hoje! Definitivamente, não me imagino aqui hoje, sem o apoio dela por todos esses anos.

À minha mãe que sempre foi um exemplo de mulher forte e independente. Sempre me propiciou as melhores oportunidades para que eu conseguisse seguir meus objetivos. Sempre me lembrando que tudo tende à dar certo por mais tortuoso que o caminho pareça. Obrigada pelos ensinamentos, incentivos, apoio, confiança, dedicação, carinho e amor incondicional de sempre. Você é essencial na minha vida!

Ao meu namorado, Marco Aurélio que, com muito amor e carinho soube compreender e respeitar todos os meus momentos. Obrigada pelo apoio, dedicação, paciência, companheirismo, amizade e compreensão nos momentos mais difíceis. Sou muito feliz de ter você como meu companheiro. Você é indispensável na minha vida!

Aos meus colegas do laboratório do LAMOC, da UNICAMP e da fisiologia, principalmente a Fernanda por ter estado presente em todos os momentos no decorrer dessa caminhada. Obrigada por toda a disponibilidade em ensinar, por todo conhecimento

compartilhado e pela amizade adquirida. Sem dúvida, adquiri muito mais que uma colega de laboratório.

À todos os outros amigos e familiares que sempre me apoiaram e ajudaram quando necessário. Em especial ao meu pai, José Ricardo e minha madrinha, Naiara!

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

Aos professores parceiros e seus respectivos laboratórios que contribuíram e se propuseram a ajudar em experimentos: Prof. Dr. Robson José de Oliveira do Laboratório de Citogenética (Citogen) do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UFU que colaborou com os experimentos envolvendo a análise dos componentes da cromatina; Prof^a Dr^a Daniele Lisboa Ribeiro do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU que colaborou durante o desenvolvimentos dos experimentos de western blotting; Prof. Dr. Paulo Eugenio Alves do Instituto de Biologia (INBIO) da UFU que colaborou com os ensinamentos envolvendo o uso do microscópio de fluorescência; Prof^a Dr^a. Françoise Vasconcelos Botelho do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UFU que colaborou com os experimentos envolvendo a análise do estresse oxidativo; ao Dr. Murilo da Rede de Bióterios (REBIR) da UFU, que sempre se colocou a disposição para retirada de dúvidas e ensinamentos advindos do manejo dos animais; e, ao Laboratório de Ensino em Animais Silvestres (LAPAS), que disponibilizou um recinto como o abrigo para os nossos animais.

Aos colegas (alunos, técnicos e professores) que de alguma maneira estenderam a mão quando precisei: aos técnicos Ester e Fabrício do Laboratório de Histologia do ICBIM-UFU, que colaboram com os ensinamentos relacionados ao uso do micrótomo e com a coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E); ao doutorando Bruno, que colaborou com a análise dos vasos sanguíneos; ao Prof. Dr. Roberto Bernardino e a Prof^a Dr^a Bellisa de Freitas Barbosa, que compartilhou de vários momentos importantes durante todo esse período, colaborando sempre de maneira à agregar. À Prof^a Dr^a Tatiana Tomiosso e o Prof^a Dr. Gustavo Simões que aceitaram ser os membros suplentes da banca.

À Renata, secretária do PPGBC e a todos os outros professores do PPGBC, que foram importantes para minha formação, contribuindo com todo conhecimento adquirido.

Ao PPGBC-UFU, que propiciou a oportunidade de ingressar em uma pós-graduação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu período de mestrado.

À banca, Prof^ª Dr^ª Ana Paula Espíndula e a Prof^ª Dr^ª Daniela Razolli por aceitarem meu convite e pelas futuras contribuições que serão de grande valia durante toda minha trajetória.

Muito obrigada!

RESUMO

A falta de informação sobre o risco do uso de fármacos durante o período gestacional leva, frequentemente, a não recomendação do seu uso na paciente gestante. No entanto, a presença dos transtornos emocionais é comum em mulheres no período reprodutivo e seu tratamento durante a gestação é complexo. O alprazolam é um benzodiazepínico (BZD) indicado no tratamento de transtorno de ansiedade e é uma droga comumente escolhida para mulheres grávidas. Adicionalmente, o alprazolam atuando como GABA agonista, encontra no hipocampo uma grande densidade desses receptores. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo estudar as alterações no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam durante a gestação. As ratas foram divididas em três grupos (n = 8): controle (CT: 0mg/animal), tratamento 1 (T1: 1,25mg/animal) e tratamento 2 (T2: 30mg/animal). O alprazolam foi administrado por via oral dez dias antes do acasalamento e durante o período gestacional. Após o nascimento foi feita a contagem dos recém-nascidos, sexagem, além da mensuração da massa corporal de cada filhote. Os cérebros dos recém-nascidos (1 animal de cada mãe, n = 8 por grupo) foram extraídos, sendo que 4 cérebros foram incluídos em parafina e realizadas colorações de Nissl, H&E e Hoechst para análise do hipocampo; outros 4 cérebros tiveram o hipocampo macerado individualmente, com extração da proteína total para análise de western blotting e estresse oxidativo. No estudo foi possível verificar que o medicamento influenciou o número celular, alterou os componentes da cromatina e a modulação de um fator transcricional. Diante de nossos achados concluímos que o hipocampo consiste em uma região plausível de influência advinda do uso de BZDs durante o período gestacional, porém, os resultados não sustentam uma relação com o desenvolvimento de neurodegeneração.

Palavras-chave: Alprazolam, Sistema Nervoso, Hipocampo, Gestação.

ABSTRACT

The lack of information about the risk of using drugs during the gestational period often leads to not recommending their use in pregnant patients. However, the presence of emotional disorders is common in women in the reproductive period and their treatment during pregnancy is complex. Alprazolam is a benzodiazepine (BZD) indicated for the treatment of anxiety disorder and a commonly chosen drug for pregnant women. Additionally, alprazolam acting as a GABA agonist, finds a high density of receptors in the hippocampus. In this context, the present study aimed to study the changes in the hippocampus of the offspring of female rats treated with alprazolam during pregnancy. The rats were divided into three groups (n = 8): control (CT: 0mg / animal), treatment 1 (T1: 1.25mg / animal) and treatment 2 (T2: 30mg / animal). Alprazolam was administered orally ten days before mating and during the gestational period. After birth, newborns were counted, sexed, and the body mass of each rat pup was measured. The newborns' brains (1 animal from each mother, n = 8 per group) were extracted, 4 brains were included in paraffin and then stained using Nissl, H&E and Hoechst for hippocampus analysis; another 4 brains had the hippocampus individually macerated, and the total protein was extracted for western blotting and oxidative stress analysis. In the study, it was possible to verify that the drug affected the cell number, changed the chromatin components and the modulation of a transcriptional factor. Based on our findings, we conclude that the hippocampus consists of a plausible region of influence arising from the use of BZDs during pregnancy, however, the results do not support a relationship with the development of neurodegeneration.

Keywords: Alprazolam, Nervous System, Hippocampus, Pregnancy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Em **A** é o gráfico representando a porcentagem de fêmeas e machos; **B** é o gráfico representando o peso corporal da prole apresentado em gramas (g).....34

Figura 2. Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar coradas com Nissl; **G** é o gráfico de médias que compara o número de células neurais entre os grupos e **K** é o gráfico de médias que compara a área de células neurais entre os grupos.....36

Figura 3: Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar corados com H&E; **G** é o gráfico de médias que compara o número de vasos sanguíneos no hipocampo.....37

Figura 4: Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar corados com Hoescht; **D** é o gráfico que mostra a relação entre área e a densidade dos componentes da cromatina.....38

Figura 5: Bandas reativas de imunoblotting de extrato proteico do hipocampo com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) para as proteínas sinaptofisina (**A**), TNFr (**B**), IBA-1 (**C**), GFAP (**D**), IL-1 (**E**), NF- κ Bp65 (**F**)..40

Figura 6: Gráficos representando as análises do estresse oxidativo no hipocampo.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDZs: Benzodiazepínicos

SN: Sistema Nervoso

OMS: Organização Mundial da Saúde

GABA: *Gamma-AminoButyric Acid*

GABA-A: *Gamma-AminoButyric Acid Receptor*

SNC: Sistema Nervoso Central

FDA: Food and Drug Administration

DA: Doença de Alzheimer

APP: Proteína Precursora Amilóide

A β ₄₀: Peptídeo β -amilóide com 40 aminoácidos

A β ₄₂: Peptídeo β -amilóide com 42 aminoácidos

NFT: Emaranhados Neurofibrilares

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

IFN- γ : Interferon-gama

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

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

LAPAS: Laboratório de Ensino em Animais Silvestres

LAMOC: Laboratório de Morfologia e Cultura Celular

TMB: Taxa Metabólica Basal

CT: Controle (0,04 ml do veículo)

T1: Tratamento 1 (1,25 mg/dia)

T2: Tratamento 2 (30 mg/dia)

NaCl: Cloreto de Sódio

PMSF: *Phenylmethylsulphonyl Fluoride*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

PBS: Tampão Fosfato-salino

H&E: Eosina e Hematoxilina

RIPA: *Radioimmunoprecipitation Buffer*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

DTT: Ditioneitol

TBS-T: *Tris-buffered saline*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

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

IL-1: Interleucina 1

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

TNFr: Receptor do Fator de Necrose Tumoral

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FRAP: *Ferric Reducing Antioxidant Power*

TPTZ: Tripiridiltriaquina

TBARS: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*

TBA: *Thiobarbituric Acid*

DNPH: *2,4-Dinitrophenylhydrazine*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis analisadas em filhotes de ratas CT, T1 e T2.....	34
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. Os benzodiazepínicos.....	19
2.2. Os benzodiazepínicos na gestação: riscos para o feto.....	20
2.3. Hipocampo.....	21
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivos gerais.....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. METODOLOGIA.....	26
4.1. Animais.....	26
4.2. Tratamento.....	26
4.3. Acasalamento.....	27
4.4. Grupos e variáveis analisadas em vida.....	27
4.5. Eutanásia dos animais e preparação do cérebro.....	28
4.6. Análises morfológicas e morfométrica.....	29
4.7. Extração de proteínas totais do hipocampo.....	30
4.7.1 Western blotting.....	30
4.7.2 Estresse oxidativo.....	31
4.7.2.a Atividade Antioxidante Total: Método de redução do ferro (FRAP).....	32
4.7.2.b Peroxidação Lipídica: Medição das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	32
4.7.2.c Medição de Proteínas Carbolinas.....	32
4.8. Análise estatística.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou a quantidade, o sexo dos filhotes ou o peso corporal.....	34
5.2. O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou a morfologia externas dos encéfalos da prole.....	35
5.3. A overdose de alprazolam administrada durante a gestação pode afetar a morfologia celular no hipocampo da prole.....	35

5.4. O tratamento com alprazolam não alterou a quantidade de capilares no hipocampo.....	36
5.5. O tratamento com alprazolam alterou a proporção dos componentes da cromatina.....	38
5.6. A administração de alprazolam durante a gestação aumentou a expressão de NF-kBp65.....	40
5.7. O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou o balanço redox do hipocampo.....	41
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS.....	47

1. INTRODUÇÃO

A falta de informação sobre o risco do uso de fármacos durante o período gestacional leva, frequentemente, a não recomendação do seu uso na paciente gestante. No entanto, a presença dos transtornos emocionais é comum em mulheres no período reprodutivo e seu tratamento durante a gestação é complexo. O alprazolam é um benzodiazepínico (BZD) indicado no tratamento de transtorno de ansiedade e é uma droga comumente escolhida para mulheres grávidas. Evidências apontam que a exposição *in utero* aos BZDs pode estar associada às malformações no feto.

Embora existam vários estudos e relatos de casos individuais sobre o uso de BZDs durante a gestação, os dados referentes à teratogenicidade e aos efeitos no desenvolvimento do feto ainda são inconsistentes. Adicionalmente, o alprazolam atuando como GABA agonista, encontra no hipocampo uma grande densidade desses receptores.

Considerando-se o elevado número de gestantes que utilizam esse tipo de medicação de forma crônica e a possibilidade de risco à saúde fetal, esse estudo propôs uma análise morfológica e das respostas celulares do hipocampo da prole de ratas Wistar tratadas com alprazolam ao longo de dez dias antes do acasalamento, bem como, durante o período gestacional. Nossa perspectiva foi contribuir com informações relacionadas ao potencial tóxico do alprazolam ao feto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Os benzodiazepínicos*

Os BZDs estão entre os medicamentos psicotrópicos mais consumidos em diferentes países no mundo (DE LA CUEVAS; SANZ; DE LA FUENTE, 2003; NEUTEL, 2005; PARR et al., 2006; COOK et al., 2007; FANG et al., 2009; CUNNINGHAM; HANLEY; MORGAN, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2001), cerca de 10% da população de centros urbanos consome de maneira abusiva substâncias psicoativas, independentemente da idade, sexo e nível educacional. No Brasil, a utilização desses, é exacerbada e indiscriminada, representando uma parte significativa dos medicamentos utilizados no país (FERRARI et al., 2013). Na década de 80, a automedicação levou as autoridades sanitárias a estabelecer, em 1993, o controle de suas prescrições e dispensações (YATES; CATRIL, 2009). Atualmente, os BZDs são medicamentos psicotrópicos de prescrição restrita e sujeitos a controle especial conforme a Portaria nº 344, de 12 de maio de 1998 (FIORELLI; ASSINI, 2017). Concomitantemente, o I Levantamento Domiciliar sobre o “Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil” revelou que 3,3% dos entrevistados utilizavam BZDs sem receita médica (LADER, 2008).

A ação dos BZDs é resultante da potencialização do efeito inibidor do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico) (NUNES; BASTOS, 2016). O GABA é o principal neurotransmissor mediador da transmissão sináptica inibitória rápida do Sistema Nervoso Central (SNC) de adultos, possuindo receptores específicos para os BDZs, os receptores GABA_a (também chamados de receptores benzodiazepínicos) (LEONARDI; AZEVEDO; OLIVEIRA, 2017). Quando os BZDs se ligam aos receptores GABA_a os torna mais sensíveis à ativação pelo próprio neurotransmissor GABA, promovendo a abertura dos canais de cloro do neurônio, aumentando o influxo celular de cloro, levando a uma hiperpolarização do neurônio pós-sináptico, inibindo a excitação celular, ou seja, aumentando a inibição da célula (DE ALMEIDA, 2015). Portanto, os BDZs são fármacos depressores do SNC, que interagem sinergicamente com demais depressores do mesmo, ou seja, a ação depressora provocada por essa classe de medicamentos pode ser potencializada quando associado com outras substâncias que desempenham essa mesma ação, como álcool, barbitúricos e analgésicos opióides

(LEONARDI; AZEVEDO; OLIVEIRA, 2017). Os receptores GABA_a, além de possuir sítios de ligação para GABA, contém regiões específicas para ligação de BZDs, barbitúricos e álcool (DE AZEVEDO; ALÓE; HASAN, 2004).

O uso prolongado, as características farmacológicas e a lipossolubilidade dos BDZs são fatores que influenciam o processo de dependência. Os BDZs com tempo de meia-vida menor (oxazepam, lorazepam e alprazolam) e que possuem alta lipossolubilidade apresentam maior potencial de dependência. Quanto maior o tempo de uso dos BDZs, mais difícil será a interrupção do tratamento e maior será a chance de manifestação da síndrome de abstinência (AMARAL; MACHADO, 2012). Através dos seus estudos, NORDON et al. (2009) demonstraram que o uso de BDZs no Brasil é mais comum em mulheres e aumenta conforme a idade. Nesse mesmo contexto, outro ponto relevante, é a relação desses medicamentos com a gestação. Uma pesquisa, em que 5.564 gestantes foram entrevistadas, em seis grandes cidades brasileiras, 32 (0,6%) relataram usar BDZs durante o período gestacional (MENGUE et al., 2001).

2.2 Os benzodiazepínicos na gestação: riscos para o feto

A falta de informações sobre o risco do uso de drogas durante o período gestacional e a limitação na obtenção de dados na espécie humana levam, frequentemente, a não recomendação do seu uso na paciente gestante (KOREN; PASTUSZAK; ITO, 1998).

Há evidências de alguns estudos iniciais com membros da classe dos BZDs em que a exposição *in útero* pode estar associada às malformações (PFIZER, 2019). Em contrapartida, dados de uma revisão sistemática que incluiu nove estudos observacionais com mais de um milhão de indivíduos sugeriram que os BZDs não estão associados a um risco aumentado de teratogenicidade (NICE, 2014).

A *Food and Drug Administration* (FDA) adota classificações de medicamentos conforme o risco associado, enquadrando os medicamentos em cinco categorias, das quais algumas dessas não são aprovadas para uso durante a gestação (IQBAL; SOHHAN; MAHMUD, 2001). Segundo a classificação de risco estipulada pela FDA, o alprazolam e outros BDZs foram identificados na categoria D, que indica evidência prévia de risco fetal humano. O alprazolam é um medicamento indicado no tratamento de transtornos de ansiedade, transtornos de ansiedade associados com outras manifestações, como a abstinência ao álcool e transtorno de pânico com ou sem agorafobia (PFIZER, 2019).

A presença e desenvolvimento dos transtornos emocionais são comuns em mulheres no período reprodutivo e seu tratamento durante a gestação é complexo. Apesar dos riscos, os BZDs são frequentemente usados durante a gravidez para controlar os sintomas de ansiedade (NICE, 2014). Não há como privar gestantes e lactantes da terapia medicamentosa a não ser pela suspensão total do uso de fármaco, o que seria inadequado e desumano (MELO et al., 2009). Entretanto há como poupá-las das exposições e riscos desnecessários oferecidos por medicamentos não estudados, mal prescritos, indicações erradas e utilizados em excesso (MALTA; MERHY, 2010). Para superar tal prática propõe-se o envolvimento dos profissionais da saúde para que medidas de intervenção sejam somadas promovendo uma utilização racional, coerente e com indicação adequada (MALTA; MERHY, 2010). E nesses casos, em que é necessário o uso de BZDs, deve-se optar por aqueles de meia-vida mais curta, como alprazolam (WEISMANN et al., 2000; PHEULA; BANZATO; DALGALARRONDO, 2003).

As propriedades farmacocinéticas consistem na rápida absorção do alprazolam após sua administração oral com picos de concentração plasmática em 1 a 2 horas após a administração e meia-vida de aproximadamente 11,2 horas (variando entre 6,3 – 26,9 h) em adultos saudáveis. Os metabólitos predominantes são alfa-hidroxi-alprazolam e uma benzofenona que são excretados principalmente através da urina. Devido à semelhança com outros BDZs, presume-se que o alprazolam atravesse a placenta e também seja excretado no leite materno (PFIZER, 2019).

2.3 Hipocampo

O hipocampo contém grande densidade dos receptores GABA- α (GUEDES, 2008). Sua nomenclatura foi devido à sua semelhança com o cavalo-marinho, combinando duas palavras gregas: *hipopótamos* que significa cavalo, e, *kampos* que significa monstro marinho (MOBLEY, 2019). Essa região está envolvida juntamente com outras áreas, em muitos aspectos do aprendizado e da memória (SUTULA et al. 1998; LEITE et al. 1998). Adicionalmente, trata-se de uma área com capacidade de neurogênese mesmo no tecido maduro (KOHL et al., 2017; KETTENMANN et al., 2011).

O hipocampo faz parte da formação hipocampal, que compreende quatro regiões corticais: o giro dentado, o hipocampo propriamente dito, o complexo subicular e o córtex entorrinal. O hipocampo por sua vez é dividido em quatro subáreas (CA1, CA2, CA3 e

CA4) e quatro estratos (estrato de orientação, estrato piramidal, estrato radiado e estrato lacunoso molecular). Já o giro dentado é subdividido em três estratos (estrato molecular, estrato granuloso e estrato polimórfico ou hilo) (SUTULA et al. 1998; LEITE et al. 1998). Nossa investigação morfológica se concentrou no estrato molecular do giro dentado.

As memórias parecem estar organizadas no cérebro dos mamíferos em um grupo de sistemas neurais envolvendo o hipocampo, o córtex entorrinal, a amígdala e o estriado dorsal e seus respectivos subsistemas funcionais (WHITE; MCDONALD, 2020). Esses sistemas de memória distintos interagem, cooperando ou competindo entre si e com outros circuitos neurais para controlar comportamentos em situações específicas de aprendizado (GRUBER; MCDONALD, 2012).

Independente do circuito ou subsistema envolvido, o denominador comum aparente nesses eventos neurais é a plasticidade sináptica que foi classificada em função de sua duração, como sendo de curto prazo que pode durar minutos e horas, ou de longo prazo permanecendo por dias, meses ou anos, também chamada de consolidação sináptica (CLOPATH, 2012). Esses mecanismos estão disponíveis em todas as espécies estudadas até então, de modo que não conseguimos ainda identificar as razões que nos tornam cognitivamente melhores do que as outras espécies (ZHANG; BARRES, 2013).

De forma surpreendente, evidências recentes revelaram que células progenitoras dos astrócitos humanos quando transplantadas para camundongos, sobrevivem, migram e dão origem a astrócitos humanos em cérebros de camundongos que passam a aprender e lembrar de forma mais eficiente do que aqueles com seus próprios astrócitos e, esse melhor aprendizado foi associado à amplificação do fenômeno de potenciação de longo prazo (ZHANG; BARRES, 2013). Esses achados parecem sugerir que os astrócitos da espécie humana podem ter contribuição decisiva no processo que torna os humanos cognitivamente melhores do que outras espécies (HAN et al., 2013).

Coincidentemente os astrócitos humanos são estruturalmente mais complexos do que os de roedores (OBERHEIM et al., 2006) o que pode indicar uma relação entre essa complexidade e melhor desempenho cognitivo. Já, as células microgliais atuam como sensores sinápticos durante o desenvolvimento, sendo capazes de responder às mudanças na atividade neural e à liberação de neurotransmissores (SCHAFER; LEHRMAN; STEVENS, 2012). Durante o desenvolvimento, a microglia parece influenciar eventos associados à proliferação e diferenciação neuronais,

vascularização, sinaptogênese e mielinização, assim como participam da remoção de neurônios em apoptose, de debris celulares e de conexões sinápticas (BITZER-QUINTERO; GONZÁLEZ-BURGOS, 2012; SCHAFFER; LEHRMAN; STEVENS, 2012; WAKE; MOORHOUSE; NABEKURA, 2011).

No que concerne ao aprendizado e memória, a interleucina 1- β (IL-1 β), uma interleucina pró-inflamatória produzida pela microglia durante tarefas de aprendizado e memória parece ter papel importante nas tarefas hipocampo-dependentes em condições normais, mas quando em níveis alterados compromete o desempenho cognitivo podendo induzir neurodegeneração, processo presente nas doenças neurodegenerativas dentre as quais destacamos as demências (WILLIAMSON et al., 2011).

A perda de memória recente é sempre o primeiro sintoma da doença de Alzheimer (DA), que é a demência mais frequente na população. A primeira memória que se perde é a memória episódica. Isto ocorre porque as alterações anatomopatológicas instalam-se especialmente no hipocampo. A DA é caracterizada pela presença de placas senis, que consistem em lesões extracelulares (constituídas do peptídeo β_{42} amilóide) e emaranhados neurofibrilares que consistem em lesões intracelulares (compostos de proteína TAU hiperfosforilada) (CASTELLANI et al., 2006). O acúmulo de A β e TAU desencadeia vários eventos neurotóxicos, como aumento do estresse oxidativo, neuroinflamação (RHEIN; ECKERT, 2007), angiogênese anormal que ocorre devido à inflamação (VAGNUCCI; LI, 2003; WINKLER; SAGARE; ZLOKOVIC, 2014).

Em destaque nos dias atuais, há evidências da relação entre o uso contínuo de BZDs e a maior propensão em desenvolver DA. LUCCHETTA et al. (2018), através de uma revisão de quase 2.000 estudos referentes ao tema, mostraram existir uma correlação positiva entre uso de BZDs e o desenvolvimento de demências, entre elas a DA, DE GAGE et al., (2012 e 2014) também documentaram a correlação positiva entre o uso de BZDs e o risco de desenvolvimento da DA.

Embora os efeitos deletérios agudos dos BZDs na memória e na cognição estejam bem documentados (LISTER, 1985; GHONEIM; MEWALDT, 1990; JERROTT; STEWART, 2002), a possibilidade de um maior risco de demência ainda é uma questão em debate. Por outro lado, é consenso que a frequência de sintomas altamente correlacionados com a prescrição de BZDs (ansiedade e insônia) aumenta nos anos

anteriores ao diagnóstico de demência (LYKETSOS et al., 2002; AMIEVA et al., 2008; TARAGANO et al, 2009; ROSENBERG et al, 2011).

A possibilidade do uso de BZD impactar no desenvolvimento do Sistema Nervoso do feto e de comprometer áreas como o hipocampo envolvido com a memória e cognição nos levou a estudar os efeitos celulares no giro denteado de neonatos de ratas tratadas com alprazolam.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações no hipocampo da prole de ratas tratados com alprazolam durante a gestação.

3.2 Objetivos Específicos

- Observar possíveis alterações macroscópicas do encéfalo da prole de ratas tratadas com alprazolam;
- Quantificar a densidade e área celular no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam;
- Estudar a presença de gliose e a quantidade de sinapses no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam;
- Analisar os marcadores de estresse oxidativo e algumas proteínas inflamatórias no hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam;
- Analisar a proporção de heterocromatina e eucromatina dos núcleos do hipocampo da prole de ratas tratadas com alprazolam.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O projeto foi elaborado em concordância com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e submetido para análise do CEUA – UFU, por meio do protocolo 014/17 (**anexo 1**). Os animais foram mantidos em caixas de policarbonato transparente, com capacidade máxima de cinco animais com substrato de serragem. O ambiente apresentava temperatura entre 18 a 22°C e umidade de 45 a 55%. Os roedores foram alimentados com ração comercial e foi oferecida água *ad libitum*.

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), mantidos no Laboratório de Ensino em Animais Silvestres (LAPAS) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Sendo 24 fêmeas e 6 machos (8 fêmeas por grupo e 2 machos para cada grupo de fêmeas); animais adultos jovens, com peso entre 150 a 180 gramas para as fêmeas e 200 a 250 gramas para os machos.

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, segundo estudo de GEHLEN, K. A. (2003) 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). 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 a overdose foi de 24 vezes a dose clínica recomendada, sendo de 30 mg por animal. Adicionalmente, o grupo controle recebeu diariamente 0,04 ml de água destilada.

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, durante os oito dias que permaneceram com os machos e durante todo o período de gestação com alprazolam ou veículo, por via oral. As fêmeas foram tratadas com alprazolam por via oral, com auxílio de seringa com espessura do tubo de gavagem, para auxiliar a deposição do fármaco na cavidade orofaríngea.

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 com alprazolam (ANDREOLLO et al., 2012).

4.3 Acasalamento

Foram utilizados oito fêmeas e dois machos por grupo, sendo divididos em três grupos para diferentes tratamentos que estão explicados no tópico abaixo (4.4). Todos os animais foram corretamente identificados com canetas cirúrgicas atóxicas de acordo com seus grupos. Nos períodos de acasalamento foram colocadas duas fêmeas por vez junto a um macho, por um período de quatro dias e posteriormente o macho era trocado (utilizando o outro macho, do mesmo grupo) permanecendo por mais quatro dias. Após esse período, as fêmeas foram realocadas em caixas individuais.

4.4 Grupos e variáveis analisadas em vida

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 de água destilada 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.

Após o parto, as fêmeas foram destinadas a outro grupo de pesquisa para realização dos seus respectivos experimentos.

Após a obtenção dos filhotes, foram feitas a mensuração da quantidade de neonatos por ninhada, para essa análise foi considerado o número total de filhotes por grupo, porcentagem de machos e fêmeas, mensuração da massa corporal individual, além da avaliação das características morfológicas externas para detecção de possíveis malformações. Os filhotes totalizaram 51, 41 e 43 para os grupos CT, T1 e T2 respectivamente, entretanto para o Laboratório de Morfologia e Cultura Celular (LAMOC) foram destinados 8 animais por grupo, o restante da ninhada foi destinado para pesquisas em outros laboratórios. Eram animais de 1 dia, apresentaram peso de $6,95g \pm 1,31$; $6,66g \pm 0,03$; $6,62g \pm 0,82$ para os grupos CT, T1 e T2 respectivamente, sendo os dados demonstrados em média e desvio padrão.

4.5 Eutanásia dos animais e preparação do cérebro

No primeiro dia pós-parto, todos os animais foram submetidos à eutanásia com superdosagem de 150 mg/kg de tiopental sódico misturado à lidocaína na concentração de 10 mg/mL, aplicado por via intraperitoneal (FIOCRUZ, 2008). As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos identificados como risco biológico. O cérebro de oito neonatos (1 de cada uma das oito fêmeas de cada grupo) foi processado no LAMOC. Do total de neonatos eutanasiados para análise do hipocampo, quatro encéfalos foram fixados com formalina e destinados para a análise da morfologia, capilares sanguíneos e componentes da cromatina, e, outros quatro foram extraídos à fresco para análise de western blotting e estresse oxidativo.

Após a extração dos encéfalos, os mesmos foram analisados para verificação de anormalidades. 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 todos os grupos apresentaram características macroscópicas de um encéfalo saudável.

Após análise dos encéfalos, foram eliminados o lobo occipital, tronco encefálico e cerebelo. Os espécimes foram lavados em solução salina tamponada (0,9% de NaCl e 100ml de solução tampão fosfato-salino - PBS 0,2M, pH 7,4), seguida de 10 ml de solução fixadora (paraformaldeído 4% diluída em solução tampão fosfato - PBS 0,2M, pH 7,4). A fixação foi feita apenas em metade dos animais (n=4).

4.6 Análises morfológicas e morfométrica

Uma vez realizada a perfusão, a fixação do tecido seguiu-se com a desidratação com álcool etílico em concentrações progressivas de 70 a 100%, diafanização em xilol e inclusão em parafina a 58°C para formação do bloco. Após este procedimento, foram realizados cortes de 5µm de espessura em micrótomo (Leica®) do hipocampo, segundo o mapa PAXINOS & WATSON (1997). Foram selecionadas lâminas para coloração de Nissl, coloração de eosina e hematoxilina (H&E) e coloração de Hoechst, para análise da morfologia do hipocampo, análise de capilares sanguíneos e análise da composição da cromatina, respectivamente.

O protocolo de coloração de Nissl consistiu inicialmente na desparafinização dos tecidos e hidratação. A coloração iniciou-se propriamente dita, com uma solução Cresyl violeta de 5 a 10 minutos, seguida de uma lavagem rápida em água destilada e desidratação para montagem com lamínula utilizando Entellan®. Como resultado, os corpúsculos de Nissl das células do tecido nervoso se apresentaram coradas em roxo. Foram fotografadas três lâminas coradas por animal, 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 manual de células neurais e a morfometria foi realizada por meio da mensuração das áreas de dez células neurais por imagem, através do *software Image J*.

O protocolo de coloração para H&E consistiu de reidratação dos cortes e passagem por soluções de hematoxilina de Harris por 1 minuto e eosina-floxina por 2 minutos. Como resultado tínhamos a coloração do endotélio vascular por H&E. Foram fotografadas três lâminas coradas por animal, utilizando câmera fotográfica digital

acoplada ao microscópio de luz, obteve-se aproximadamente dez imagens de cada lâmina no aumento de 40x. A avaliação histológica foi realizada através da contagem manual dos vasos sanguíneos, sendo que, foram analisadas aproximadamente 100 fotos por grupo.

Foi realizada a coloração de Hoechst, que é específica para cromatina. Os cortes de hipocampo foram corados em solução de Hoechst 33258 (0,5 µg/ml) durante 15 minutos, e, posteriormente, as lâminas foram montadas com tampão fosfato e lamínula. As lâminas foram mantidas em geladeira (4°C) e protegidas da luz até a análise. Foram fotografadas três lâminas por animal utilizando câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio de luz (Olympus B51), obteve-se dez imagens de cada lâmina no aumento de 40x. Foi realizada a morfometria com o *software Image J* das áreas de 100 núcleos por grupo e a proporção de heterocromatina (região com coloração mais intensa) e eucromatina, medindo-se a densidade de pixels por área de cada núcleo.

4.7 Extração de proteínas totais do hipocampo

Os outros neonatos (n= 4 por grupo) tiveram seus hipocampos (bilateralmente) extraídos sem fixação. As amostras foram submetidas a extração de proteínas totais com uso de 2µl do tampão *Radioimmunoprecipitation Buffer* ou tampão Ripa (150mM NaCl, 50mM Tris pH 8.0, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 0.5% Na-deoxicolato ácido, 0.1% *Sodium Dodecyl Sulfate* ou SDS and 1% Triton X-100) + 18µl de água. As amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA e deixadas 80min em gelo, posteriormente, foi colocado 500µl triton e deixado por mais 40 minutos.

Os homogeneizados foram centrifugados a 14.000g durante 40 min a -4°C, em centrífuga refrigerada (Bio-Spin-R, BioAgency) e a quantidade de proteínas foi medida pela técnica de Bradford. Para cada 400µl de sobrenadante, adicionamos 100µl de laemmli, uma solução protetora com 0,015 de ditioneitol (DTT) e por fim, as amostras foram mantidas em -24°C para realização do western blotting. Os restantes das amostras de proteínas foram congelados em ultrafreezer para a análise de estresse oxidativo.

4.7.1 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 amostras foram preparadas de acordo com a quantificação de proteínas totais realizada pelo método de

Bradford. Inicialmente as amostras foram fervidas a 95°C por 10 minutos e centrifugadas por pelo menos 30 segundos. Na cuba de eletroforese (Bio-Rad®) foi acrescentado 900ml do tampão de corrida e aplicado 5 µl do marcador de peso molecular *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad®) e das amostras. A voltagem inicial da corrida foi de 70v até as amostras entrarem no *gel resolving*, posteriormente, a voltagem foi aumentada para 120v. Em seguida, foi realizada a transferência das bandas proteicas para a membrana de nitrocelulose *Hybond-ECL* (Amersham Biosciences®). Esse processo ocorreu sob voltagem de 120v durante 2h em geladeira.

Logo após, as membranas seguiram para a etapa de imunoblotting, onde foram bloqueadas com BSA 5% (0,5 g de BSA diluído em 10 ml de solução basal ou TBS-T), durante 2 horas, seguida de três lavagens em 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-GFAP (Santa Cruz® 1:500, marcador de astrócito), camundongo anti-sinaptofisina (Abcam® 1:1500, marcador de vesículas sinápticas), coelho anti-NF-κB p65 (Imuny® 1:500, marcador de precursores inflamatórios), coelho anti-IL-1 (Abcam® 1:800, marcador de citocina inflamatória), camundongo anti-Iba-1 (Imuny® 1:300, marcador de microglia), coelho anti-TNFr (Santa Cruz® 1:500, marcador para receptores de citocinas caracterizadas pela capacidade de se ligar a fatores de necrose tumoral) e camundongo anti-α-Tubulina (Cell Signaling® 1:1200, marcador de citoesqueleto para controle molecular).

No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T, sob agitação contínua 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*.

4.7.2 Estresse Oxidativo

Os radicais reativos são produzidos a partir do metabolismo celular, como 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 e proteínas carboniladas na amostra de proteína total isenta de laemmli.

4.7.2.a Atividade Antioxidante Total: Método de redução do ferro (FRAP)

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 tripiridiltiazina (TPTZ). Quando a redução ocorre, há uma alteração na tonalidade da mistura de reação, passando de roxo claro a um roxo intenso, cuja absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 595 nm. Logo quanto maior a absorbância, maior será o potencial antioxidante (URREA-VICTORIA et al., 2016).

4.7.2.b Peroxidação Lipídica: Medição das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

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).

4.7.2.c Medição de Proteínas Carbolinadas

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 uma vez retirado o DNPH não ligado às proteínas, leem-se as hidrazones ligadas às proteínas (FIELDS; DIXON, 1971; LEVINE et al., 1990 e 1994; REZNICK; PACKER, 1994; VOSSEN; HAGE; KARIM, 2000).

4.8 Análise estatística

Os resultados numéricos foram analisados para normalidade e aplicado o teste Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni para dados paramétricos e teste não-paramétricos Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. 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 médias e erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1 O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou a quantidade, o sexo dos filhotes ou o peso corporal

A quantidade de filhotes por ninhada foi semelhante entre os grupos e se encontra na **Tabela 1**, através de resultados expressos por porcentagem. Da mesma forma, o número de machos e fêmeas foram semelhantes entre os grupos; $p = 0,0685$; $p > 0,05$, Anova *One Way* com pós Teste de Bonferroni, como mostra a **Figura 1A**. O peso também se apresentou semelhante entre os recém-nascidos do grupo CT ($6,95g \pm 0,65$), T1 ($6,66g \pm 0,02$) e T2 ($6,62g \pm 0,31$); $p = 0,8304$; $p > 0,05$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni, como mostra a **Figura 1B**.

Tabela 1: Variáveis analisadas em filhotes de ratas controle, T1 e T2.

	Controle (CT) n= 4	Tratamento 1 (T1) n= 4	Tratamento 2 (T2) n= 4
Fetos ninhada	38%	30%	32%
Machos e fêmeas	Machos: 6,5% Fêmeas: 6,2%	Machos: 5% Fêmeas: 5,2%	Machos: 5,4% Fêmeas: 6,1%
Mensuração da massa corporal	$6,95g \pm 0,65$	$6,6g \pm 0,02$	$6,62g \pm 0,31$

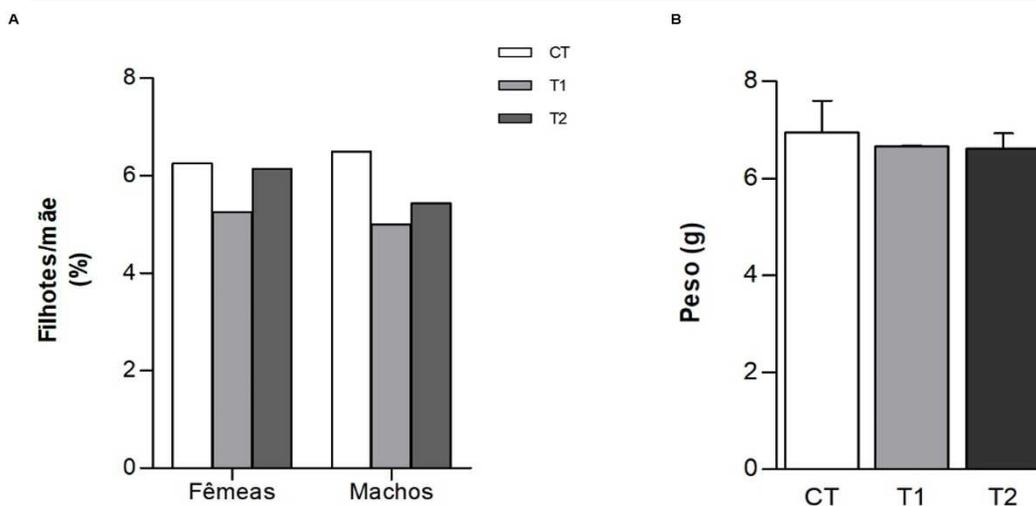


Figura 1: A- porcentagem de fêmeas e machos. B- Peso corporal da prole apresentado em gramas (g). Os dados foram semelhantes entre os grupos ($p = 0,1773$; $p = 0,8304$; $p > 0,05$, Anova *One Way* com pós Teste de Bonferroni).

5.2 O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou a morfologia externas dos encéfalos da prole

Na avaliação das características morfológicas externas, não foi detectada nenhuma malformação macroscópica. Considerando-se um encéfalo saudável aqueles que apresentaram bulbo olfatório, dois hemisférios cerebrais de tamanhos semelhantes, presença de cerebelo, 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.

5.3 A overdose de alprazolam administrada durante a gestação pode afetar a morfologia celular no hipocampo da prole

A quantidade de células e a área celular individual no hipocampo foram analisadas nos grupos (**Figura 2**). Com relação a quantidade de células, CT ($199,00 \pm 17,94$), T1 ($170,83 \pm 14,67$) e T2 ($147,75 \pm 22,87$); observou-se uma diminuição ($p = 0,0431$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni) no número de células totais no grupo T2 em comparação com o grupo CT. Entretanto, as áreas celulares dos grupos CT ($0,28\mu\text{m}^2 \pm 0,02$), T1 ($0,28\mu\text{m}^2 \pm 0,02$) e T2 ($0,38\mu\text{m}^2 \pm 0,03$) foram semelhantes entre si; $0,0384$; $p > 0,05$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni. A área ocupada pelo hipocampo também foi semelhante entre os grupos (**Figura 2 A-C**).

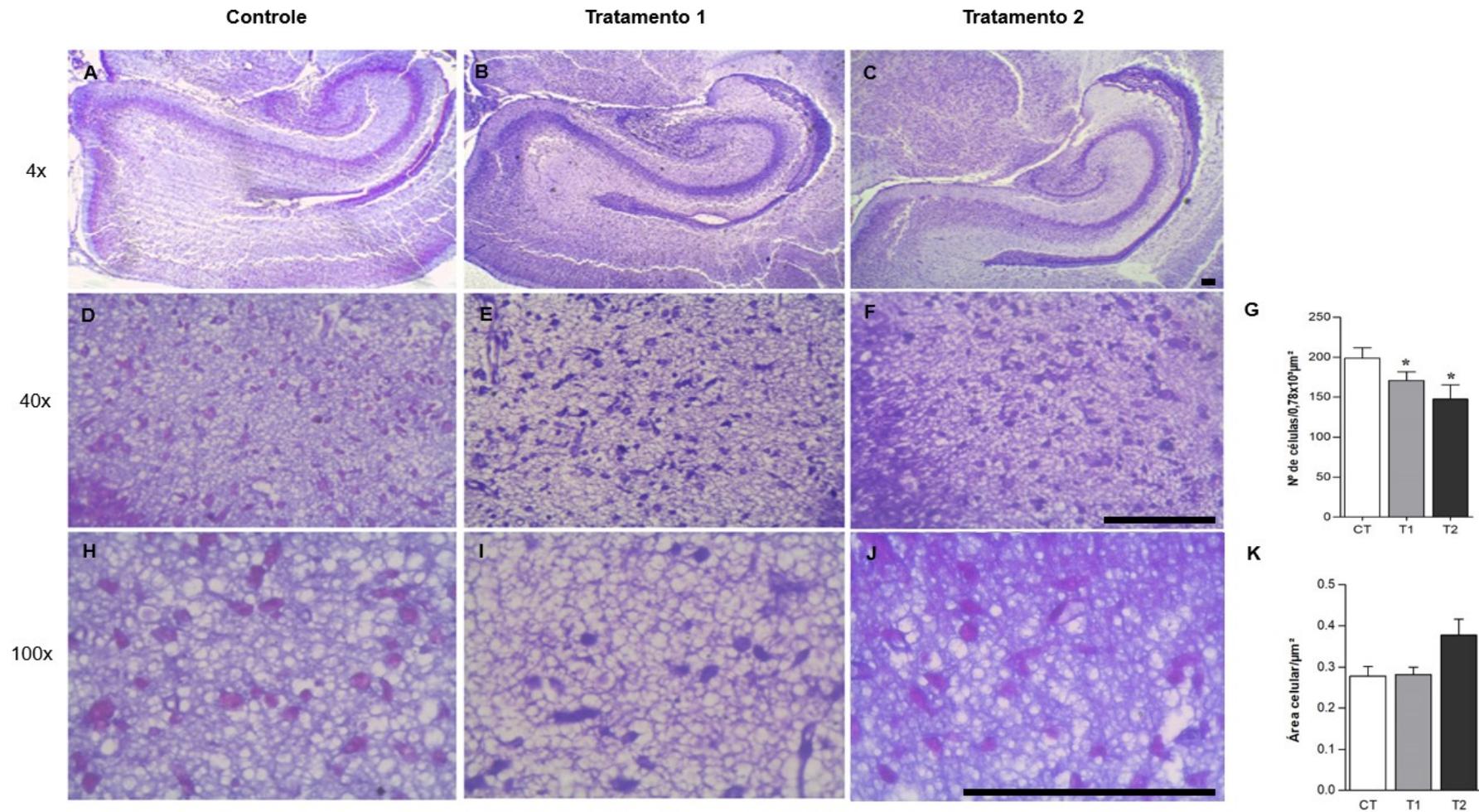


Figura 2: Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar coradas com Nissl em diferentes aumentos. **A, D e H** grupo controle; **B, E e I** grupo tratamento 1 (1,25 mg); **C, F e J** grupo tratamento 2 (30 mg). **G** é o gráfico de médias que compara o número de células entre os grupos e **K** é o gráfico de médias que compara a área das células entre os grupos. Observou-se uma diminuição no número de células totais no grupo T2 ($p= 0.0431$; $p < 0,05$, Anova One Way com pós-teste de Bonferroni). Entretanto, as áreas celulares dos grupos CT, T1 e T2 foram semelhantes entre si ($p= 0.0384$; $p > 0,05$, Anova One Way com pós-teste de Bonferroni). Escala = 10 μm.

5.4 O tratamento com alprazolam não alterou a quantidade de capilares no hipocampo

Observou-se que a quantidade de capilares sanguíneos no hipocampo corados com H&E (**Figura 3**) foram semelhantes entre os grupos CT ($8,37 \pm 0,70$), T1 ($9,50 \pm 0,97$) e T2 ($7,93 \pm 2,07$); ($p = 0.6002$; $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn).

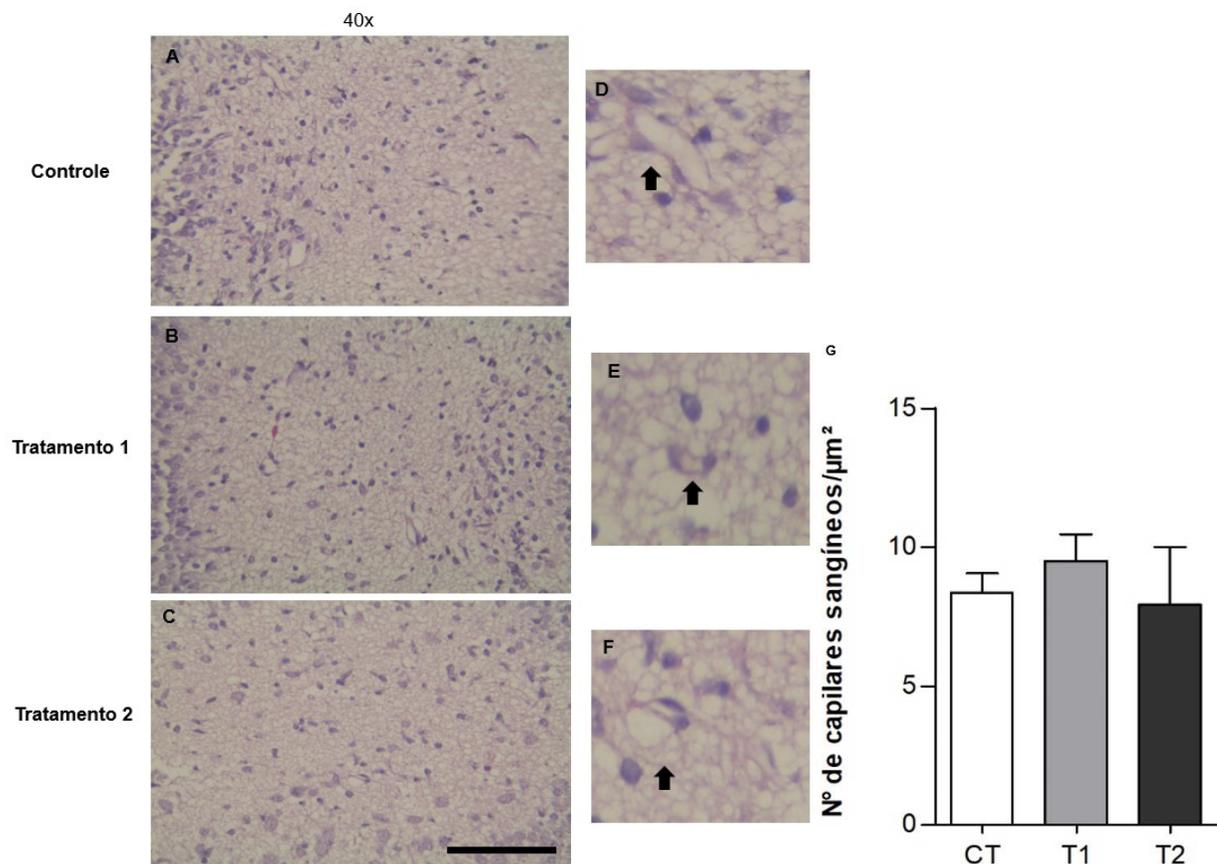


Figura 3: Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar corados com H&E. **A** grupo controle; **B** grupo tratamento 1 (1,25 mg); **C** grupo tratamento 2 (30 mg). **D**, **E** e **F** destaques ampliados de vaso sanguíneo (seta). **G** é o gráfico de médias que compara o número de capilares sanguíneos. Os dados foram semelhantes entre os grupos CT, T1 e T2; $p = 0.6002$; $p > 0,05$; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Escala = 10 µm.

5.5 O tratamento com alprazolam alterou a proporção dos componentes da cromatina

A análise dos componentes da cromatina foi realizada em cortes do hipocampo corados com Hoescht (**Figura 4**). Como resultado, vimos que a relação entre a área e a densidade foi aumentando conforme a administração do alprazolam, ou seja, houve um aumento da eucromatina no grupo T1 ($0,021\mu\text{m}^2 \pm 0,0006$) e no grupo T2 ($0,022\mu\text{m}^2 \pm 0,001$) em comparação ao grupo CT ($0,015\mu\text{m}^2 \pm 0,0004$); $p < 0,0001$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni. Demonstrando assim, um aumento da cromatina descompactada e conseqüentemente um aumento da síntese proteica nos grupos de tratamento 1 e 2, quando comparados ao controle.

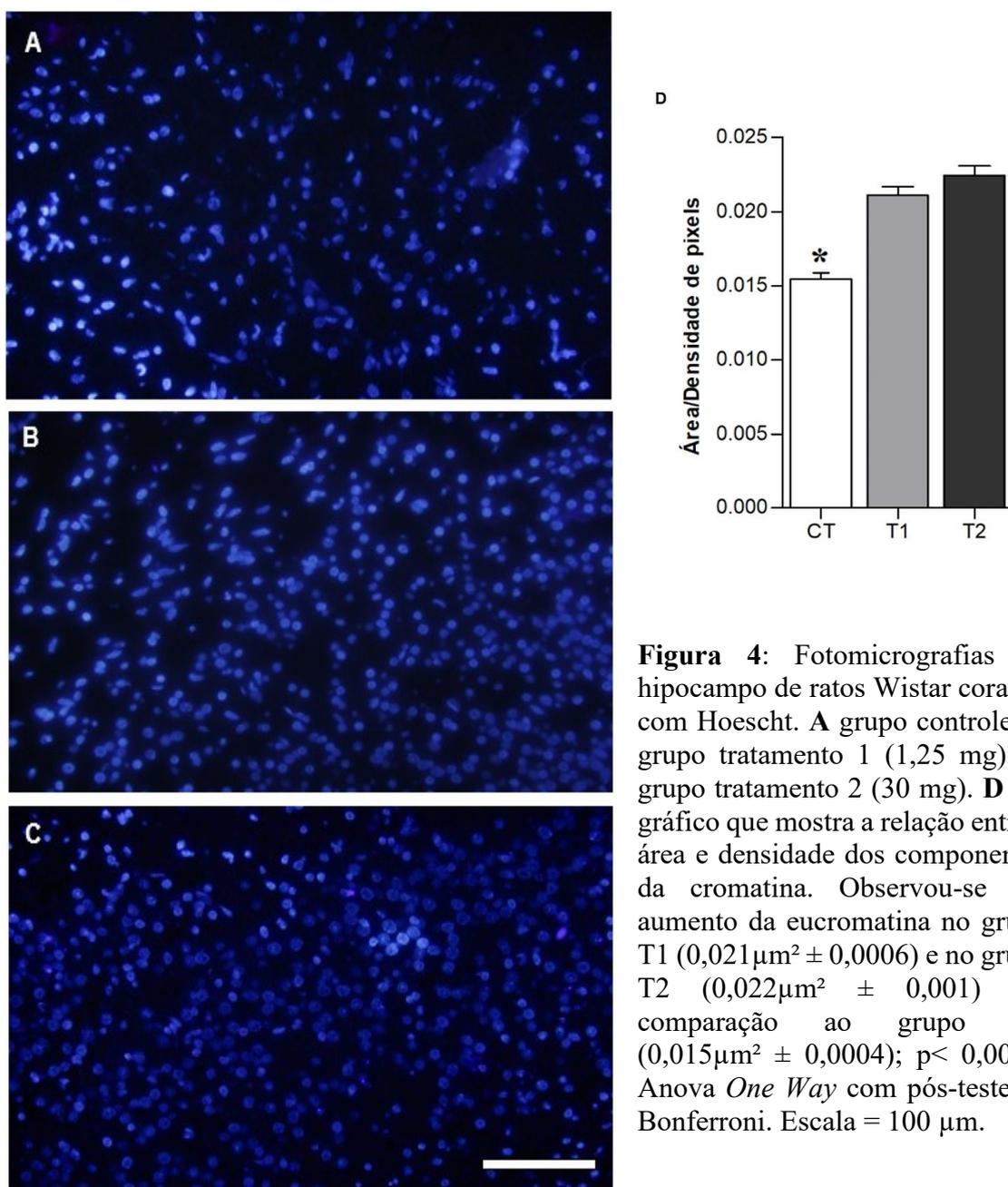


Figura 4: Fotomicrografias do hipocampo de ratos Wistar corados com Hoescht. **A** grupo controle; **B** grupo tratamento 1 (1,25 mg); **C** grupo tratamento 2 (30 mg). **D** é o gráfico que mostra a relação entre a área e densidade dos componentes da cromatina. Observou-se um aumento da eucromatina no grupo T1 ($0,021\mu\text{m}^2 \pm 0,0006$) e no grupo T2 ($0,022\mu\text{m}^2 \pm 0,001$) em comparação ao grupo CT ($0,015\mu\text{m}^2 \pm 0,0004$); $p < 0,0001$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni. Escala = 100 μm .

5.6 A administração de alprazolam durante a gestação aumentou a expressão de NF- κ Bp65

A **Figura 5** apresenta as quantificações de bandas imunorreativas do extrato proteico feitas por imunoblotting do hipocampo. Foram marcadas proteínas específicas utilizando anticorpos anti-sinaptofisina, para densidade sináptica; anti-TNFr para marcar receptores de citocinas caracterizadas pela capacidade de se ligar a fatores de necrose tumoral; anti-Iba1 para ativação microglial, anti-GFAP, para astrogliose, anti-IL-1 e anti-NF- κ Bp65 para neuroinflamação, sendo comparados os grupos CT, T1 e T2.

As expressões de sinaptofisina (**figura 5A**), TNFr (**figura 5B**), Iba-1 (**figura 5C**), GFAP (**figura 5D**) e IL-1 (**figura 5E**) foram semelhantes entre os grupos; $p > 0,05$ (Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn). Em contrapartida, observou-se diferenças significativas na expressão do NF- κ B entre os grupos T1 ($1,90 \pm 0,13$) e T2 ($1,84 \pm 0,09$) quando comparados com o grupo CT ($1,48 \pm 0,09$); $p < 0,0001$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni (**figura 5F**).

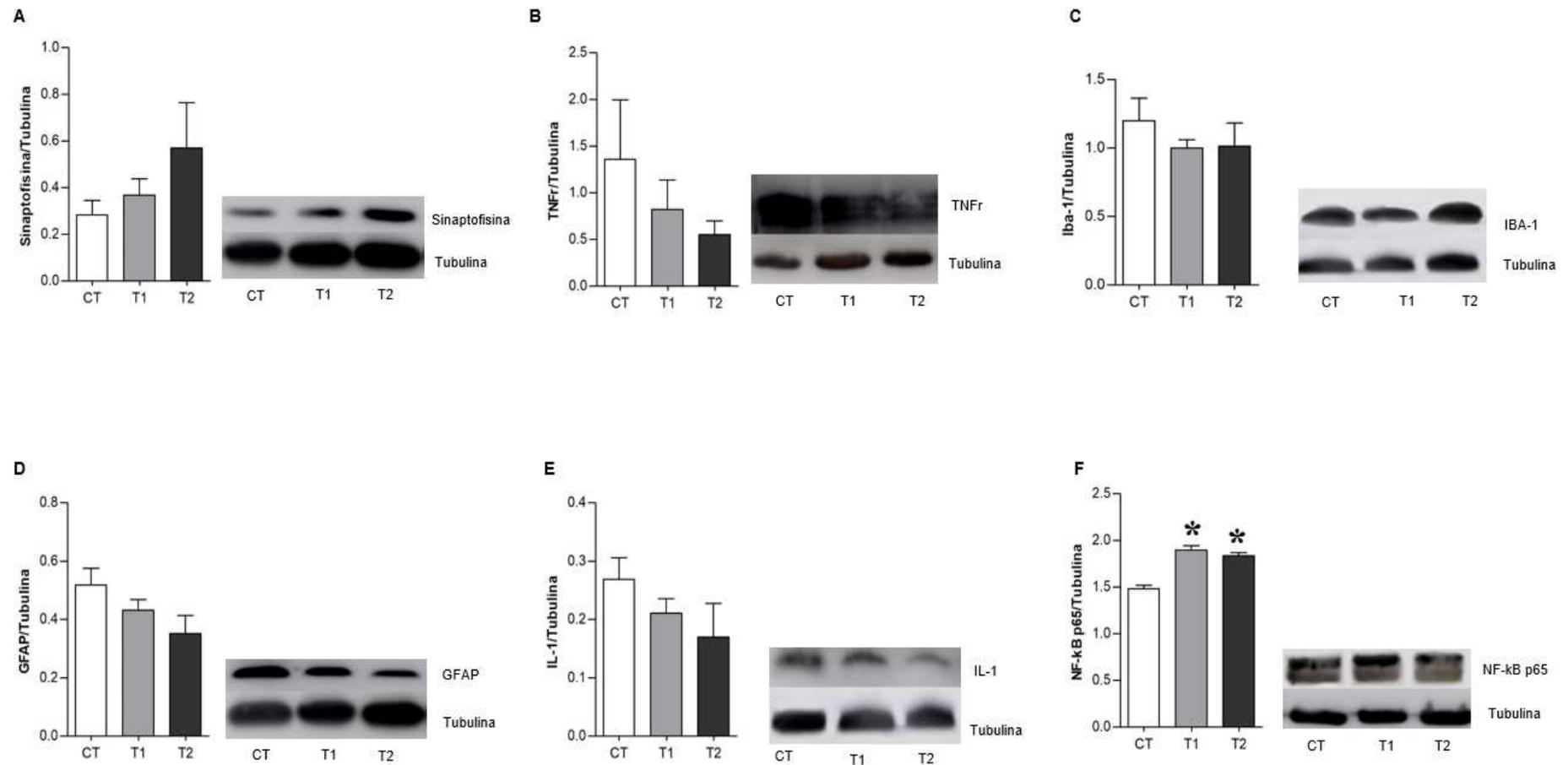


Figura 5: Bandas de imunoblotting de extrato protéico do hipocampo com gráficos representando média normalizada pela proteína controle (α Tubulina) para as proteínas sinaptofisina (A), TNFr (B), Iba-1 (C), GFAP (D), IL-1 (E), NF- κ Bp65 (F). As expressões de sinaptofisina (figura 5A), TNFr (figura 5B), Iba-1 (figura 5C), GFAP (figura 5D) e IL-1 (figura 5E) foram semelhantes entre os grupos; $p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Em contrapartida, observou-se diferenças significativas na expressão do NF- κ B entre os grupos T1 ($1,90 \pm 0,13$) e T2 ($1,84 \pm 0,09$) quando comparados com o grupo CT ($1,48 \pm 0,09$); $p < 0,0001$, Anova *One Way* com pós-teste de Bonferroni (F).

5.7 O tratamento com alprazolam durante a gestação não influenciou o balanço redox do hipocampo

Foram analisados o fator de redução férrica do plasma ou fator antioxidante de redução do íon férrico (FRAP), grupo CT ($82,17 \pm 23,99$); T1 ($164,37 \pm 90,22$) e T2 ($131,17 \pm 60,94$) (**figura 6A**), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), grupo CT ($0,85 \pm 0,49$); T1 ($1,17 \pm 0,28$) e T2 ($1,01 \pm 0,05$) (**figura 6B**) e proteína carbonilada, grupo CT ($0,17 \pm 0,08$); T1 ($0,26 \pm 0,11$) e T2 ($0,21 \pm 0,11$) (**figura 6C**). Não houve diferenças significativas entre os grupos; $p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

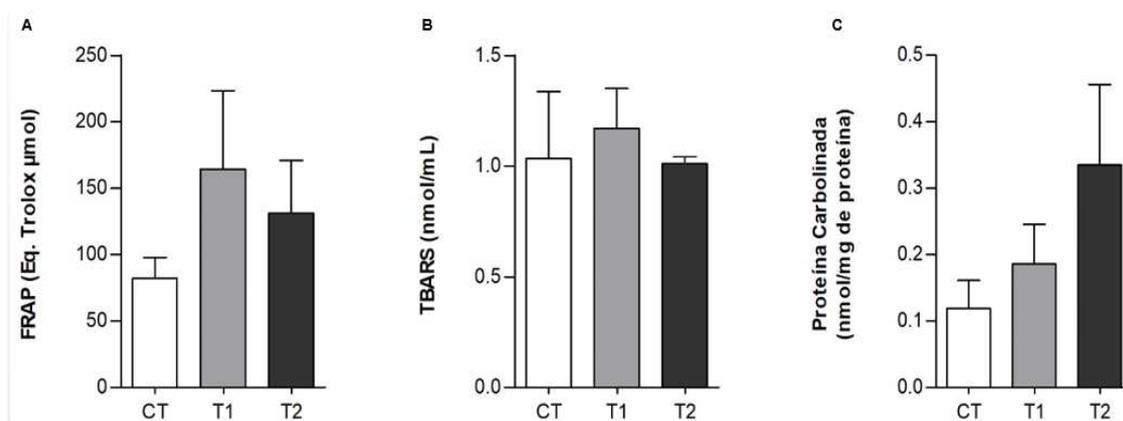


Figura 6: Gráficos representando as análises de estresse oxidativo no hipocampo. Foram analisados o fator de redução férrica do plasma ou fator antioxidante de redução do íon férrico (FRAP) (A), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (B) e proteína carbonilada (C). Não houve diferenças significativas entre os grupos; $p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

6 DISCUSSÃO

Nossa perspectiva com esse trabalho foi contribuir com informações relacionadas ao potencial tóxico do alprazolam ao feto. Além disso, entender a possibilidade de uma associação com o desenvolvimento da DA, uma vez que, estudos atuais documentaram uma correlação positiva entre o uso de BZDs em adultos com o maior risco do desenvolvimento de demências. Com esse objetivo, o estudo teve o hipocampo como foco.

Como visto, em nosso estudo o uso do alprazolam durante o período gestacional não influenciou a quantidade e sexagem dos filhotes. Dentre os dados da literatura consultada, não foi visto nenhum dado que indicasse qualquer interferência na resolução do sexo do feto com o uso de BZDs. O número de filhotes também não foi afetado pelos tratamentos em nosso estudo, assim como GEHLEN, K. A. (2003) que, após avaliação toxicológica do diazepam e midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar verificou que a taxa de natalidade não teve diferença entre os grupos.

A variável peso corporal também se apresentou semelhante entre os grupos, contrariando resultados que mostraram certa influência em recém-nascidos humanos, como por exemplo, estudos que apontaram a relação entre o consumo de alprazolam e o baixo peso ao nascer em 17 crianças nascidas de mulheres que usaram BDZ durante a gestação, sendo que o peso dessas crianças se normalizou em dez meses (LAEGREID, HAGBERG; LUNDBERG, 1992), ainda, CALDERON-MARGALIT et al. (2009) concluíram que o uso de BZDs durante a gestação está associado a um risco aumentado do bebê apresentar baixo peso ao nascer.

Com relação às análises morfológicas externas dos encéfalos da prole, não foi detectada nenhuma malformação do encéfalo, estando de acordo com os achados de GEHLEN, K. A. (2003) que, após avaliação toxicológica do diazepam (10 mg/kg) e midazolam (5mg/kg) sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos Wistar (tratadas do 6º até 15º de gestação), verificou que os fetos de nenhum dos grupos apresentaram malformações macroscópicas.

Microscopicamente, observou-se uma diminuição no número de células no grupo T2, entretanto, não foi vista alteração na área das células hipocâmpais. Lembrando que, a alteração do número celular, foi vista no grupo que recebeu a overdose, enquanto que, neonatos advindos de mães que receberam a dose indicada (1,25mg/kg), não

demonstraram comprometimento advindo da administração do alprazolam: sem sinal de gliose, perda celular ou sináptica, ou seja, nenhuma alteração que possa sugerir sinais precoces de neurodegeneração.

Nesse contexto, LUCCHETTA et al. (2018) sugerem que há uma associação entre o uso de BZDs e o desenvolvimento de demência, entretanto, complementam que a evidência atual não tem o poder de inferir diferenças entre os efeitos dos BZDs de meia vida maior e menor, além das diferentes cargas de exposição (duração e dose). Outro estudo que analisou os efeitos de doses únicas de 2mg/kg e 1mg/kg de diazepam e midazolam respectivamente, na morfologia do hipocampo de ratos Wistar, não verificaram alterações na morfologia (DIAS, 2017).

Considerando que diversos elementos podem causar danos ao SNC (lesões cerebrais, infecções, agregação de peptídeo, administração de determinados fármacos), culminando com ativação de células da glia e que, em resposta, essas células ativadas liberariam moléculas inflamatórias, como TNF- α , IL-1, levando a um circuito neuroinflamatório (BARRES, 2008), fizemos a análise de expressão proteica por *western blotting* objetivando estudar as respostas celulares em relação à reatividade dos astrócitos (GFAP), da microglia (Iba-1), inflamação (NF- κ Bp65, IL-1, TNFr) e quantidade de sinapses (sinaptofisina).

No hipocampo observou-se que a expressão de GFAP, Iba-1, IL-1, TNFr e sinaptofisina foram semelhantes entre os grupos, traduzindo uma situação não inflamatória, sem gliose ou perda sináptica. Esses resultados em conjunto, demonstram que, o alprazolam não desencadeou ativação e consequentes respostas advindas das células da glia, mesmo sendo administrado no período crítico dos neonatos. Comumente, não foi visto alteração nos na quantidade de capilares no hipocampo dos filhotes; visto que, a angiogênese anormal, ocorre devido á inflamação (VAGNUCCI; LI, 2003; WINKLER; SAGARE; ZLOKOVIC, 2014).

Em contrapartida, observou-se um aumento na expressão de NF- κ Bp65 nos grupos T1 e T2 quando comparados ao grupo CT. O NF- κ B consiste em um fator de transcrição (BALTIMORE et al., 2009) que regula a transcrição da expressão gênica, fornecendo a base que capacita as células a responder aos estímulos externos.

A ponte entre a estimulação e a transcrição é formada por uma rede complexa de vias de sinalização que atuam para ativar fatores de transcrição, que translocam para o

núcleo e iniciam programas de transcrição discretos (DORRINGTON; FRASER, 2019). Como dito no início desse parágrafo, foi evidenciado que o uso do medicamento, independente da dose, aumentou o nível de NF- κ B no hipocampo. Considerando que haja o aumento concomitante da expressão de genes, esse resultado corrobora com o aumento da proporção de eucromatina. Isso, considerando que, fatores transcricionais ativados translocam para o núcleo e geram um aumento da transcrição de genes, o que caracteriza a eucromatina.

O fator de transcrição nuclear NF- κ B está envolvido na regulação das respostas de neurônios para a ativação de várias vias de sinalização diferentes em uma variedade de ambientes patológicos. Durante o desenvolvimento do SN, o NF- κ B é ativado em neurônios imaturos por fatores neurotróficos e podem induzir a expressão de genes envolvidos com a diferenciação e sobrevivência celular. No SN maduro, o NF- κ B é ativado nas sinapses em resposta à transmissão sináptica excitatória e pode desempenhar um papel fundamental em processos como aprendizagem e memória (MATTSON, 2005).

Dentre os estímulos que podem ativar o NF- κ B estão os neurotransmissores, as citocinas, as proteínas neurotóxicas e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (SU et al., 2019). Além de que, o NF- κ B é ativado em neurônios e células gliais em condições neurodegenerativas agudas, como acidente vascular cerebral e lesão traumática, bem como em doenças neurodegenerativas, como a DA.

A ativação de NF- κ B em neurônios pode promover sua sobrevivência induzindo a expressão de genes que codificam proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e ainda, na contramão, induzindo a expressão de genes que codificam fatores pró-apoptóticas da mesma família. Sugerimos, portanto, que haja uma correlação positiva entre o aumento NF- κ B e a diminuição das células no grupo T2, uma vez que, a overdose pode ter culminado com ativação de vias celulares relacionadas à ativação do NF- κ B, causando a expressão de genes que codificam fatores como Bax e Bak, ditos fatores pró-apoptóticos da família do Bcl-2, gerando assim uma diminuição de células nesse grupo. A diversidade de funções do NF- κ B pode explicar diferentes respostas para diferentes estímulos, no caso dose e overdose. São necessários mais estudos, a fim de entender o papel do NF- κ B nesse contexto.

MASCARENHAS; ZANON (2020), ao analisar a expressão proteica dessas mesmas proteínas, na prole de ratas tratadas também com alprazolam durante a gestação,

não viu alteração em nenhuma delas na região do bulbo olfatório e, no cerebelo foi visto aumento do NF- κ B e Iba-1, somente no grupo T1.

Com relação as análises do balanço redox através da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro (FRAP), indicadores de estresse oxidativo pela análise da peroxidação lipídica (TBARS) e proteínas carboniladas no hipocampo dos neonatos de mãe tratadas com alprazolam, não encontramos alterações significativamente diferentes em relação ao grupo controle. No estudo de MASCARENHAS; ZANON (2020), ao analisar o balanço redox no cerebelo e bulbo olfatório da prole de animais tratadas com alprazolam, não foram verificadas alterações no FRAP em nenhuma das duas regiões; em relação a proteínas carboniladas houve diferença entre os grupos CT e T1 (1,25 mg de alprazolam) do cerebelo, mas não no bulbo olfatório, e, com relação a peroxidação lipídica houve diferença entre os grupos T1 e T2 (30 mg de alprazolam) em ambas as regiões.

Nesse contexto, podemos notar que cada área do SNC responde a um mesmo estímulo de maneira diferente. Considerando o estudo de MASCARENHAS; ZANON (2020), o cerebelo se mostrou uma região mais plausível de alteração após a administração do alprazolam durante a gestão. O hipocampo por sua vez, assim como o bulbo olfatório, se trata de uma área diferente, tendo capacidade de neurogênese mesmo no tecido maduro (KOHL et al., 2017; KETTENMANN et al., 2011) o que poderia culminar com respostas diferenciadas frente a determinados estímulos.

7 CONCLUSÃO

Diante de nossos achados concluímos que o uso de alprazolam durante a gestação de ratas podem promover alterações no hipocampo dos filhotes:

- redução da quantidade de células na overdose;
- aumento da eucromatina, indicando uma maior síntese proteica;
- aumento da expressão de NF- κ B que pode estar envolvido em diversos processos, desde plasticidade e sobrevivência neuronal até inflamação e morte celular.

Estudos complementares podem ser realizados para entender o papel do NF- κ B nesse contexto. Por enquanto, não temos resultados que suportam indícios ou sinais precoces que poderiam indicar relação com desenvolvimento de inflamação ou degeneração.

8 REFERÊNCIAS

1. AMARAL, B. D. A.; MACHADO, K. L. Benzodiazepínicos: uso crônico e dependência. Monografia (Especialização em Farmacologia). Centro Universitário da Filadélfia. Londrina, 2012.
2. AMIEVA, H. et al. Prodromal Alzheimer's disease: successive emergence of the clinical symptoms. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, v. 64, n. 5, p. 492-498, 2008. doi.org/10.1002/ana.21509
3. ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F. D.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, 2012. doi.org/10.1590/S0102-67202012000100011
4. BALTIMORE, D. Descobrimo NF-κB. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** v. 1, n. 1, 2009.
5. BARRES, B. A. O mistério e a magia da glia: uma perspectiva sobre seus papéis na saúde e na doença. **Neuron**, v. 60, n. 3, pág. 430-440, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.013>
6. BITZER-QUINTERO, O. K.; GONZÁLEZ-BURGOS, I. Immune system in the brain: a modulatory role on dendritic spine morphophysiology?. **Neural plasticity**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/348642>
7. BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 302-310, 1978.. [doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
8. 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. doi.org/10.1016/j.ajog.2009.06.061
9. CASTELLANI, R. J. et al. Neuropathology of Alzheimer disease: pathognomonic but not pathogenic. **Acta neuropathologica**, n. 111, v. 6, p. 503-509, 2006. doi.org/10.1007/s00401-006-0071-y
10. CLOPATH, C. Consolidação sináptica: uma abordagem para a aprendizagem de longo prazo. **Neurodinâmica cognitiva**, v. 6, n. 3, pág. 251-257, 2012. [10.1007/s11571-011-9177-6](https://doi.org/10.1007/s11571-011-9177-6)
11. COOK, J. M.; BIYANOVA, T.; MASCI, C.; COYNE, J. C. Older patient perspectives on long-term anxiolytic benzodiazepine use and discontinuation: a qualitative study. **J Gen Intern Med**, v. 22, n. 8, p. 1094-1100, 2007. doi.org/10.1007/s11606-007-0205-5

12. CUNNINGHAM, C. M.; HANLEY, G. E.; MORGAN, S. Patterns in the use of benzodiazepines in British Columbia: examining the impact of increasing research and guideline cautions against long-term use. **Health Policy**, v. 97, n. 2-3, p. 122-129, 2010. doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.03.008
13. DE ALMEIDA, M. S. S. **Benzodiazepinas: da terapêutica ao abuso e dependência**. Dissertação de Mestrado, Mestrado Integrado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2015. hdl.handle.net/10316/30452
14. DE AZEVEDO, A. P.; ALÓE, F.; HASAN, R. Hipnóticos. **Revista Neurociências**, v. 12, n. 4, p. 198-208, 2004.
15. DE GAGE, S. B. et al. Benzodiazepine use and risk of dementia: prospective population based study. **Bmj**, v. 345, p. e6231, 2012. doi.org/10.1136/bmj.e6231
16. DE GAGE, S. B. et al. Benzodiazepine use and risk of Alzheimer's disease: case-control study. **Bmj**, v. 349, p. g5205, 2014. doi.org/10.1136/bmj.g5205
17. DE LAS CUEVAS, C.; SANZ, E.; DE LA FUENTE, J. Benzodiazepines: more "behavioural" addiction than dependence. **Psychopharmacology**, v. 167, n. 3, p. 297-303, 2003. doi.org/10.1007/s00213-002-1376-8
18. DIAS, I. Efeito dos benzodiazepínicos diazepam e midazolam na memória espacial e morfologia de hipocampo de ratos wistar submetidos à privação de sono. 2017. hdl.handle.net/1884/49049
19. DORRINGTON, M.; FRASER, I. Sinalização de NF-κB em macrófagos: dinâmica, diafonia e integração de sinal. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 705, 2019.
20. FANG, S. Y, et al. Predictors of the incidence and discontinuation of long-term use of benzodiazepines: a population-based study. **Drug Alcohol Depend**, v. 104, n. 1-2, p. 140-146, 2009. doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2009.04.017
21. FERRARI, C. K. B. et al. Falhas na prescrição e dispensação de medicamentos psicotrópicos: um problema de saúde pública. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 109-116, 2013.
22. 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. doi.org/10.1042/bj1210587
23. FIOCRUZ. **Manual de utilização de animais**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: http://www.castelo.fiocruz.br/vpplr/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf. Acesso em: 07/12/2019.

24. FIORELLI, K.; ASSINI, F. L. A prescrição de benzodiazepínicos no Brasil: uma análise da literatura. **ABCS Health Sciences**, v. 42, n. 1, 2017. doi.org/10.7322/abcshs.v42i1.948
25. 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. doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002
26. GEHLEN, Karine de Almeida. Avaliação toxicológica dos benzodiazepínicos diazepam e maleato de midazolam sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos wistar. Monografia. Porto Alegre, 2003.
27. GHONEIM, M. M.; MEWALDT, S. P. Benzodiazepine and human memory: a review. **Anesthesiology**, v. 72, p. 926-938, 1990. doi.org/10.1097/00000542-199005000-00024
28. GRUBER, A. J.; MCDONALD, R. J. Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. 50, 2012. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00050>
29. GUEDES, J. M. F. S. **Consumo de Benzodiazepinas em Portugal**. 75p. Trabalho de Conclusão de Curso, Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Fernando Pessoa, 2008.
30. HAN, X. et al. O enxerto do antebraço por células progenitoras gliais humanas aumenta a plasticidade sináptica e o aprendizado em camundongos adultos. **Célula-tronco celular**, v. 12, n. 3, pág. 342-353, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.015>
31. IQBAL, M. M.; SOHHAN, T.; MAHMUD, S. Z. The effects of lithium, valproic acid, and carbamazepine during pregnancy and lactation. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 39, n. 4, p. 381-392, 2001. doi.org/10.1081/CLT-100105159
32. JERROTT, S. B.; STEWART, S. H. Cognitive and sedative effects of benzodiazepine use. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 1, p. 45-58, 2002. doi.org/10.2174/1381612023396654
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. 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>

35. KOREN, G.; PASTUSZAK, A.; ITO, S. Drogas na gravidez. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 16, p. 1128-1137, 1998. [doi.org/10.1056 / NEJM199804163381607](https://doi.org/10.1056/NEJM199804163381607)
36. LADER, M. Effectiveness of benzodiazepines: do they work or not?. **Expert review of neurotherapeutics**, v. 8, n. 8, p. 1189-1191, 2008. doi.org/10.1586/14737175.8.8.1189
37. 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. doi.org/10.1055 / s-2008-1071305
38. LEITE, J. P.; CAVALHEIRO, E. A. Neurobiologia da esclerose medial temporal. Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos: São Paulo: Lemos Editorial, p. 129-136, 1998.
39. LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M.; OLIVEIRA, A. C. C. Benzodiazepínicos e seus Efeitos no Sistema Nervoso Central. **Revista Saúde em Foco**. n. 9, p. 684-690, 2017.
40. LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990. [doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)
41. LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In: **Methods in enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994. [doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
42. LISTER, R. G. The amnesic action of benzodiazepines in man. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 9, n. 1, p. 87-94, 1985. [doi.org/10.1016/0149-7634\(85\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0149-7634(85)90034-X)
43. 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. doi.org/10.1002/phar.2170
44. LYKETSOS, C. G. et al. Prevalence of neuropsychiatric symptoms in dementia and mild cognitive impairment: results from the cardiovascular health study. **Jama**, v. 288, n. 12, p. 1475-1483, 2002. doi.org/10.1001 / jama.288.12.1475
45. MALTA, D. C.; MERHY, E. E. O percurso da linha do cuidado sob a perspectiva das doenças crônicas não transmissíveis. **Interface-Comunicação, Saúde, Educação**, v. 14, n. 34, p. 593-606, 2010.

46. MATTSON, M. P. NF- κ B in the survival and plasticity of neurons. **Neurochemical research**, v. 30, n. 6, p. 883-893, 2005. [10.1007/s11064-005-6961-x](https://doi.org/10.1007/s11064-005-6961-x)
47. MASCARENHAS, F. N. A. P.; ZANON, R. G. Efeitos do alprazolam no desenvolvimento do Sistema Nervoso Sensorial e Motor da prole. 2020.
48. MELO, S. C. C. S. D.; PELLOSO, S. M.; CARVALHO, M. D. D. B.; OLIVEIRA, N. L. B. Uso de medicamentos por gestantes usuárias do Sistema Único de Saúde. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 1, p. 66-70, 2009. doi.org/10.1590/S0103-21002009000100011
49. MENGUE, S. S.; SCHENKEL, E. P.; DUNCAN, B. B.; SCHMIDT, M. I. Uso de medicamentos por gestantes em seis cidades brasileiras. **Revista de Saúde Pública**. v.35, n.5, 2001. doi.org/10.1590/S0034-89102001000500002
50. MOBLEY, A. S. **Neural Stem Cells and Adult Neurogenesis**. Academic Press, 2019.
51. NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE (NICE). Antenatal and postnatal mental health: Clinical management and service guidance (CG192). **The British Psychological Society**, p. 1-8. 2014.
52. NEUTEL, C. I. The epidemiology of long-term benzodiazepine use. **Int Rev Psychiatry**, v.17, n. 3, p. 189-197, 2005. doi.org/10.1080/09540260500071863
53. NORDON, D. G.; AKAMINE, K.; FERREIRA, N. N.; HÜBNER, C. K. Características do uso de benzodiazepínicos por mulheres que buscavam tratamento na atenção primária. **Rev Psiquiatr**, v. 31, n. 3, p. 152-58, 2009. doi.org/10.1590/S0101-81082009000300004
54. 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.
55. OMS, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Relatório Sobre a Saúde no Mundo. Saúde Mental: nova concepção, nova esperança, 2001. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2001/en/whr01_djmessage_po.pdf>. Acesso em: 07 dez 2020.
56. OBERHEIM, N. A. et al. Características exclusivamente homínidas de astrócitos humanos adultos. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 10, pág. 3276-3287, 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>
57. PARR, J. M., KAVANAGH, D. J.; YOUNG, R. M.; MCCAFFERTY, K. Views of general practitioners and benzodiazepine users on benzodiazepines: a

- qualitative analysis. **Soc Sci Med**, v. 62, n 5, p. 1237-1249, 2006. doi.org/10.1016/j.socscimed.2005.07.016
58. PFIZAR, 2019. Bula Frontal®. Disponível em: <LLD_Bra_CDSv11.0_20Nov2018_v4_FXRCLL_16_VPS> Acesso em: 03 fev 2020.
59. PHEULA, G. F.; BANZATO, C. E. M.; DALGALARRONDO P. Mania e gravidez: implicações para o tratamento farmacológico e proposta de manejo. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v.52, n.2, p.97-107, 2003.
60. PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 1998. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-PT&lr=&id=0prYfdDbh58C&oi=fnd&pg=PP1&dq=PAXINOS,+G.%3B+WATSON,+C.+The+rat+brain+in+stereotaxic+coordinates.+2.+ed.+San+Diego:+Elsevier+Academic+Press,+1998.&ots=-9cuBWUIDl&sig=dJrD6iCHOXPbYlGO0nIkGZnGJVc#v=onepage&q&f=false>> Acesso em: 02 dez 2020.
61. REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, p. 357-363, 1994. [doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33041-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33041-7)
62. RHEIN, V.; ECKERT A. Effects of Alzheimer's amyloid-beta and tau protein on mitochondrial function: role of glucose metabolism and insulin signaling. **Arch Physiol Biochem**, v. 113, p. 131-141, 2007. doi.org/10.1080/13813450701572288
63. ROSENBERG, P. B. et al. Neuropsychiatric symptoms in MCI subtypes: the importance of executive dysfunction. **International journal of geriatric psychiatry**, v. 26, n. 4, p. 364-372, 2011. doi.org/10.1002/gps.2535
64. 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. doi.org/10.3389/fphar.2019.00906
65. SUTULA, T. et al. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. **Science**, v. 239, n. 4844, p. 1147-1150, 1988. [10.1126 / science.2449733](https://doi.org/10.1126/science.2449733)
66. SCHAFER, D. P.; LEHRMAN, E. K.; STEVENS, B. A sinapse "quadripartite": interações da sinapse Microglia no SNC maduro e em desenvolvimento. **Glia**, v. 61, n. 1, pág. 24-36, 2013. <https://doi.org/10.1002/glia.22389>
67. TARAGANO, F. E. et al. Mild behavioral impairment and risk of dementia. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 584, 2009.

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. doi.org/10.13140/RG.2.2.24094.64322
69. VAGNUCCI, J. A. H.; LI, W. W. Alzheimer's disease and angiogenesis. **The Lancet**, v. 361, n. 9357, p. 605-608, 2003. [doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12521-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12521-4)
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. doi.org/10.1097/00006534-200003000-00038
71. WAKE, H.; MOORHOUSE, A. J.; NABEKURA, J. Funções da microglia no sistema nervoso central - além da resposta imunológica. **Neuron glia biology**, v. 7, n. 1, pág. 47-53, 2011. <https://doi.org/10.1017/S1740925X12000063>
72. WEISMANN, D. N. et al. Use of psychoactive medication during pregnancy and possible effects on the fetus and newborn. **Pediatrics**, v. 105, n. 4 I, p. 880-887, 2000. doi.org/10.1542/peds.105.4.880
73. WILLIAMSON, L. L. et al. Microglia e memória: modulação por infecção precoce. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 43, pág. 15511-15521, 2011. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3688-11.2011>
74. WINKLER, E. A; SAGARE, A. P; ZLOKOVIC, B. V. The Pericyte: A Forgotten Cell Type with Important Implications for Alzheimer's Disease?. **Brain pathology**, v. 24, n. 4, p. 371-386, 2014. doi.org/10.1111/bpa.12152
75. WHITE, N. M.; MCDONALD, R. J. Vários sistemas de memória paralela no cérebro do rato. **Neurobiologia da Aprendizagem e da Memória**, v. 77, n. 2, pág. 125-184, 2002. <https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4008>
76. YATES, T.; CATRIL, P. Tendencias en la utilización de benzodiazepinas en farmacia privada. **Revista chilena de neuro-psiquiatria**, v. 47, n. 1, p. 9-15, 2009. doi.org/10.4067/S0717-92272009000100002
77. ZHANG, Y.; BARRES, B. A. Um camundongo mais inteligente com astrócitos humanos. **Bioessays**, v. 35, n. 10, pág. 876-880, 2013. <https://doi.org/10.1002/bies.201300070>